



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

**FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE MELO**

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO CENTRAL DO CARVACROL EM MODELOS DE  
ANSIEDADE, DEPRESSÃO E CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS E  
POSSÍVEIS MECANISMOS FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS.**

**FORTALEZA**

**2010**

**FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE MELO**

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO CENTRAL DO CARVACROL EM MODELOS  
ANIMAIS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO E CONVULSÃO EM  
CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS MECANISMOS FARMACOLÓGICOS  
ENVOLVIDOS.**

Dissertação 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 Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

**FORTALEZA**

**2010**

M485i Melo, Francisca Helvira Cavalcante

Investigação da ação central do carvacrol em modelos de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos e possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos / Francisca Helvira Cavalcante Melo – Fortaleza, 2010.

133 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2010

1. Óleos Voláteis 2. Ansiedade 3. Depressão 4. Ácido Gama-Aminobutírico I. Sousa, Francisca Cléa Florenço de (orient.) II. Título

CDD: 615.321

**FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE MELO**

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO CENTRAL DO CARVACROL EM MODELOS DE  
ANSIEDADE, DEPRESSÃO E CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS E  
POSSÍVEIS MECANISMOS FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS**

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

**Aprovada em** / /

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)**

**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisela Costa Camarão**

**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Silveira Macêdo**

**Universidade Federal do Ceará**

*Agradeço a Deus por ter tornado possível  
a realização deste trabalho e por ter mudado  
a minha vida com o seu amor incondicional*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, **Alyson dos Santos Melo**, que é para mim o maior presente que Deus me concedeu. Meu amor, obrigada pela paciência, dedicação e carinho que você tem por mim, por ser a parte que me faltava e que hoje me faz muito feliz!

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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Francisca Cléa Florenço de Sousa**, por ter me acompanhado, apoiado e por ter acreditado na minha capacidade.

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> **Gisela Costa Camarão** e **Danielle Silveira Macêdo**, por terem gentilmente aceito participar da minha banca examinadora de mestrado.

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> **Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** e **Gisela Costa Camarão**, por terem gentilmente aceito participar da minha banca de qualificação.

Ao **Prof. Dr Damião Pergentino de Sousa**, por ter cedido a substância em estudo.

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

Aos amigos de graduação e mestrado, **Nayrton** e **Emiliano**, pelas conversas, brincadeiras e por terem me ajudado tantas vezes.

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

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

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e farmacologia: **Aura, Alana, Fernando, Chiquinho e Íris, Seu Carlos, Haroldo** e **Dr. Armando**.

Às amigas da graduação, **Márcia, Renata** e **Lívia**, pela consideração e apoio durante todos esses anos.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

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

**Obrigada!!**

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima."  
(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. Este trabalho apresenta as ações comportamentais do carvacrol em modelos animais de ansiedade, depressão, sedação e convulsão, tais como labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, *rota rod*, tempo de sono induzido por pentobarbital, convulsão induzida por pentilenotetrazol, nado forçado e suspensão da cauda. Carvacrol (CVC) foi administrado oralmente, em camundongos machos, em doses únicas de 12,5; 25 e 50 mg/kg. Os resultados mostraram que o CVC, nas três doses estudadas, não alterou a atividade motora no teste do *rota rod* nem o número de cruzamentos no teste do campo aberto. Entretanto, CVC diminuiu o número de *grooming* no teste do campo aberto. No LCE, CVC nas doses estudadas aumentou todos os parâmetros observados, sugerindo um possível efeito ansiolítico. O flumazenil, um antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico, foi capaz de reverter esse efeito. CVC não alterou a latência de sono e a duração do sono no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital. CVC também apresenta um efeito antidepressivo, pois o tratamento agudo desta substância diminuiu o tempo de imobilidade nos testes do nado forçado e da suspensão da cauda, sem apresentar mudanças da ambulação no teste do campo aberto. Este efeito do CVC (25 mg/kg) não foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com p-clorofenilalanina (PCPA, um inibidor da síntese de serotonina), prazosina (um antagonista dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos) e ioimbina (um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos). Em contrapartida, o pré-tratamento dos animais com SCH23390 (um antagonista dos receptores D<sub>1</sub>-dopaminérgicos) ou sulpirida (um antagonista dos receptores D<sub>2</sub>-dopaminérgicos) reverteu completamente o efeito antidepressivo do CVC (25 mg/kg) no teste do nado forçado. No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, CVC não foi capaz de proteger os animais das convulsões ou diminuir a latência de morte. Os dados obtidos sugerem que o CVC apresenta efeitos ansiolíticos, provavelmente relacionados com o sistema GABAérgico e efeitos antidepressivos, que parecem depender da sua interação com o sistema dopaminérgico, mas não com os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico.

**Palavras-chave:** Carvacrol. Efeito Ansiolítico. GABA. Efeito Antidepressivo. Sistema Dopaminérgico.



## ABSTRACT

Carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) is a monoterpene phenol present in the essential oil of many plants. It is the major component of the essential oil fraction of oregano and thyme. This work presents the behavioral effects of carvacrol in animal models of anxiety, depression, sedation and convulsion, such as, elevated plus maze (EPM), open field, rota rod, barbiturate-induced sleeping time, pentilene-tetrazole-induced seizures, forced swimming and tail suspension tests. Carvacrol (CVC) was administered orally, to male mice, at single doses of 12.5; 25 and 50 mg/kg. The results showed that CVC had no effect on the spontaneous motor activity in the rota rod test nor in the number of squares crossed in the open field test. However, CVC decreased the number of groomings in the open field test. In the plus maze test, CVC increased all the observed parameters in the EPM test, suggesting a possible anxiolytic effect. Flumazenil, an antagonist of GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepinic receptors, was able to reverse these effects of CVC. Therefore, CVC did not alter the sleep latency and sleeping time in the barbiturate-induced sleeping time test. CVC also presented an antidepressant activity since that the acute treatment of this substance 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 CVC (25 mg/kg) was not prevented by pre-treatment of mice with p-chlorophenylalanine (PCPA, an inhibitor of serotonin synthesis), prazosin (an  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist) and yohimbine ( $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist). On the other hand, the pre-treatment of mice with SCH23390 (a dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist) or sulpiride (a dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist) completely blocked the antidepressant-like effect of CVC (25 mg/kg) in the forced swimming test. In the pentilene-tetrazole induced seizures test CVC was not able to protect the animals from seizures nor increase the death time. The data suggest that CVC presents anxiolytic effects, probably related with GABAergic system and antidepressant effects that seems to be dependent on its interaction with the dopaminergic system, but not with the serotonergic and noradrenergic systems.

**Keywords:** Carvacrol. Anxiolytic Effect. GABA. Antidepressant Effect. Dopaminergic System.

## LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química do carvacrol	19
2	Estrutura química do timol	19
3	Receptor GABA <sub>A</sub>	26
4	Vias dopaminérgicas no encéfalo	29
5	Vias da noradrenalina no encéfalo	31
6	Vias da 5-hidroxitriptamina no encéfalo	33
7	Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos	58
8	Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre o percentual de entrada nos braços abertos (PEBA%) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos	59
9	Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos	60
10	Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre a percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA%) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos	61
11	Efeito do carvacrol e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos	63
12	Efeito do carvacrol e diazepam sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto em camundongos	64

13	Efeito do carvacrol e diazepam sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos	65
14	Efeito do carvacrol e diazepam sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 5 rpm, no teste do rota rod em camundongos	67
15	Efeito do carvacrol e diazepam sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 15 rpm, no teste do rota rod em camundongos	68
16	Efeito do carvacrol e diazepam sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 40 rpm, no teste do rota rod em camundongos	69
17	Efeito do carvacrol e imipramina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos	71
18	Efeito do carvacrol e imipramina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste da suspensão da cauda em camundongos	73
19	Efeito do carvacrol e fluoxetina, sozinhos ou associados ao PCPA sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos	75
20	Efeito do carvacrol associado a prazosina ou ioimbina sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos	77
21	Efeito do carvacrol e bupropiona associados a sulpirida ou SCH23390 sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos	79
22	Efeito do carvacrol e diazepam sobre a latência de sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos	81
23	Efeito do carvacrol e diazepam sobre a duração do sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos	82
24	Efeito do carvacrol e diazepam sobre a latência da convulsão (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos	84
25	Efeito do carvacrol e diazepam sobre a latência de morte (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos	85

## LISTA DE QUADROS

1	Distribuição dos subtipos de receptores adrenérgicos	30
2	Principais subtipos de receptores 5-HT	32
3	Drogas e reagentes	42
4	Equipamentos.	43
5	Teste do campo aberto em camundongos	46
6	Teste do labirinto em cruz elevado em camundongos	48
7	Teste do <i>rota rod</i> em camundongos	49
8	Teste do nado forçado em camundongos	50
9	Teste da suspensão da cauda em camundongos	52
10	Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos	53
11	Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos	54

## LISTA DE TABELAS

1	Ocorrência do carvacrol em óleos essenciais de plantas aromáticas	20
2	Alimentos flavorizados com óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (ppm)	20
3	Efeito da administração oral de carvacrol e diazepam nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos	86

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Ansiedade</b>	<b>23</b>
<b>1.3</b>	<b>Depressão</b>	<b>26</b>
<b>1.4</b>	<b>Epilepsia e convulsão</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Drogas e reagentes</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais</b>	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das drogas</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Tratamento dos grupos experimentais</b>	<b>44</b>
<b>4.5</b>	<b>Protocolo Experimental</b>	<b>44</b>
4.5.1	Avaliação da atividade locomotora	45
4.5.1.1	Teste do campo aberto	45
4.5.2	Avaliação da atividade ansiolítica	46
4.5.2.1	Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	46
4.5.3	Avaliação da atividade relaxante muscular	48

4.5.3.1	Teste do <i>rota Rod</i>	48
4.5.4	Avaliação da atividade antidepressiva	49
4.5.4.1	Teste do nado forçado	49
4.5.4.2	Avaliação do sistema noradrenérgico	50
4.5.4.3	Avaliação do sistema serotoninérgico	51
4.5.4.4	Avaliação do sistema dopaminérgico	51
4.5.4.5	Teste da suspensão da cauda	51
4.5.5	Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica e Anticonvulsivante	52
4.5.5.1	Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital	52
4.5.5.2	Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol	53
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Avaliação da atividade ansiolítica</b>	<b>56</b>
5.1.1	Teste do labirinto em cruz elevado	56
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da Atividade Locomotora e Relaxante Muscular</b>	<b>62</b>
5.2.1	Teste do Campo Aberto	62
5.2.2	Teste do <i>Rota Rod</i>	66
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da atividade Antidepressiva</b>	<b>70</b>
5.3.1	Teste do Nado Forçado	70
5.3.2	Teste da Suspensão da Cauda	72
5.3.3	Investigação do possível mecanismo envolvido no efeito antidepressivo do carvacrol no teste do nado forçado	74

5.3.3.1	Envolvimento do sistema serotoninérgico	74
5.3.3.2	Envolvimento do sistema noradrenérgico	76
5.3.3.3	Envolvimento do sistema dopaminérgico	78
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da Atividade Sedativo/Hipnótica e Anticonvulsivante</b>	<b>80</b>
5.4.1	Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital	80
5.4.2	Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol	83
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>102</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>126</b>



## **INTRODUÇÃO**

---

---

# 1 INTRODUÇÃO

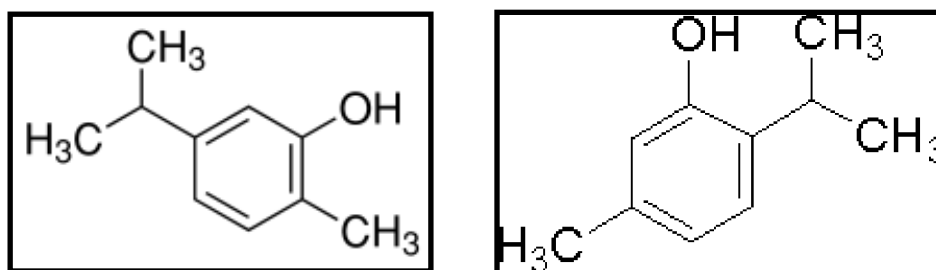
## 1.1 Carvacrol

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 anti-hipertensivos, 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 monoterpene de peso molecular 150,21 g/mol (fig. 1) é o principal componente dos óleos essenciais de orégano e thyme (tabela 1) (ARREBOLA et al., 1994; LAROUGI et al., 1993; MULINACCI et al., 1996; BIMCZOK et al., 2008). O gênero *Thymus* (thyme), 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).



**Figuras 1 e 2.** Estruturas químicas do carvacrol e timol  
 Fonte: <http://www.sigmaldrich.com>

Já tem sido descrito que thyme 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 thyme 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 thyme 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 meticilina. 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).

As aplicações dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos usados em alimentos é desencorajada devido à perda da atividade antimicrobiana em decorrência da sua volatilidade e lipolicidade. 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-cymene, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em linfócitos humanos. O uso de timol e carvacrol em concentrações abaixo de 100 µM juntamente com 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu significativamente o dano ao DNA. Aparentemente, baixas concentrações de timol e carvacrol são capazes de prevenir o dano oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outro estudo sugere uma ação protetora contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (ZEYTINOGLU 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 (ZEYTINOGLU 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.

Recentemente foi feito um estudo onde aortas isoladas de ratos, pré-contraídas 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).

## **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).

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 frequência 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).

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).

Os benzodiazepínicos (BDZ) são as drogas mais frequentemente 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).

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), tendo sua ação mediada pelos receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub> (SMITH; SIMPSON, 2003).

Os receptores GABA<sub>A</sub> (fig. 3) são receptores ionotrópicos (ligados a canais iônicos), formados por múltiplas combinações de subunidades. Estudos moleculares



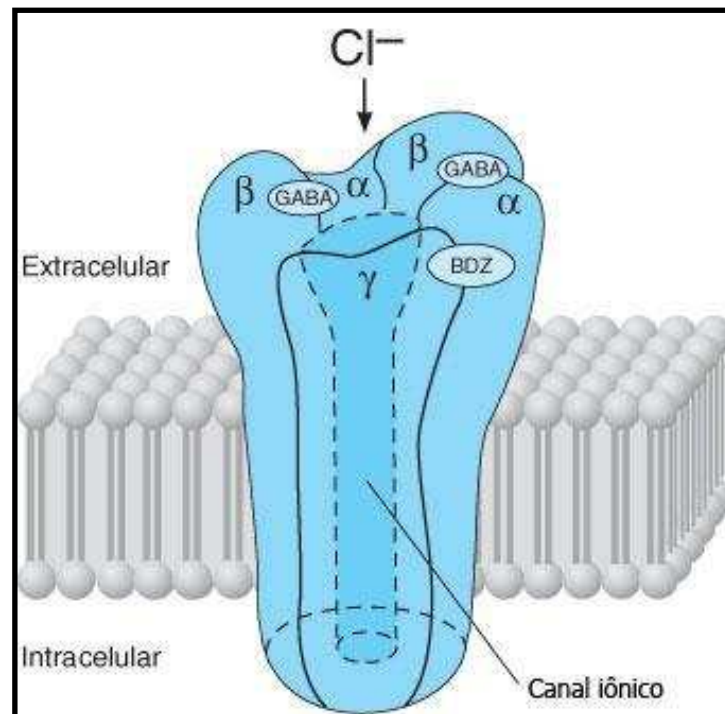
revelaram que o receptor GABA<sub>A</sub> é uma estrutura pentamérica com canal de cloreto, formada a partir de uma gama de diferentes classes de subunidades, atualmente 19 subunidades ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\rho_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ) (ALLEN et al., 2009).

Existe uma forte associação entre o GABA<sub>A</sub> 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<sub>A</sub> 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<sub>A</sub>, causando uma mudança conformacional no receptor e aumentando a afinidade entre o GABA e o seu sítio receptor na subunidade  $\beta$ . 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, 2008).

Diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> parecem mediar diferentes efeitos farmacológicos, com o subtipo  $\alpha_1$  associado a sedação, amnésia e propriedades anticonvulsivantes, enquanto as subunidades  $\alpha_2$  estão envolvidas com as ações ansiolíticas e miorrelexantes. 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, 2008).

O receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub> 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<sub>B</sub> existe como uma combinação de duas subunidades, heterodímero GABA<sub>BR1</sub> e GABA<sub>BR2</sub> (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<sub>B</sub> utilizado no tratamento da espasticidade. Os antagonistas GABA<sub>B</sub> ainda não têm aplicação clínica (RANG et al., 2007).

O receptor GABA<sub>C</sub> é um receptor ionotrópico com canal de cloreto. Trata-se de um receptor homoligomérico, composto de múltiplas unidades  $\rho$ , ou seja, não se encontram as subunidades mais comuns dos receptores GABA:  $\delta$ ,  $\gamma$  e  $\varepsilon$ . 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<sub>A</sub>  
Fonte: Katzung (2008)

### 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).

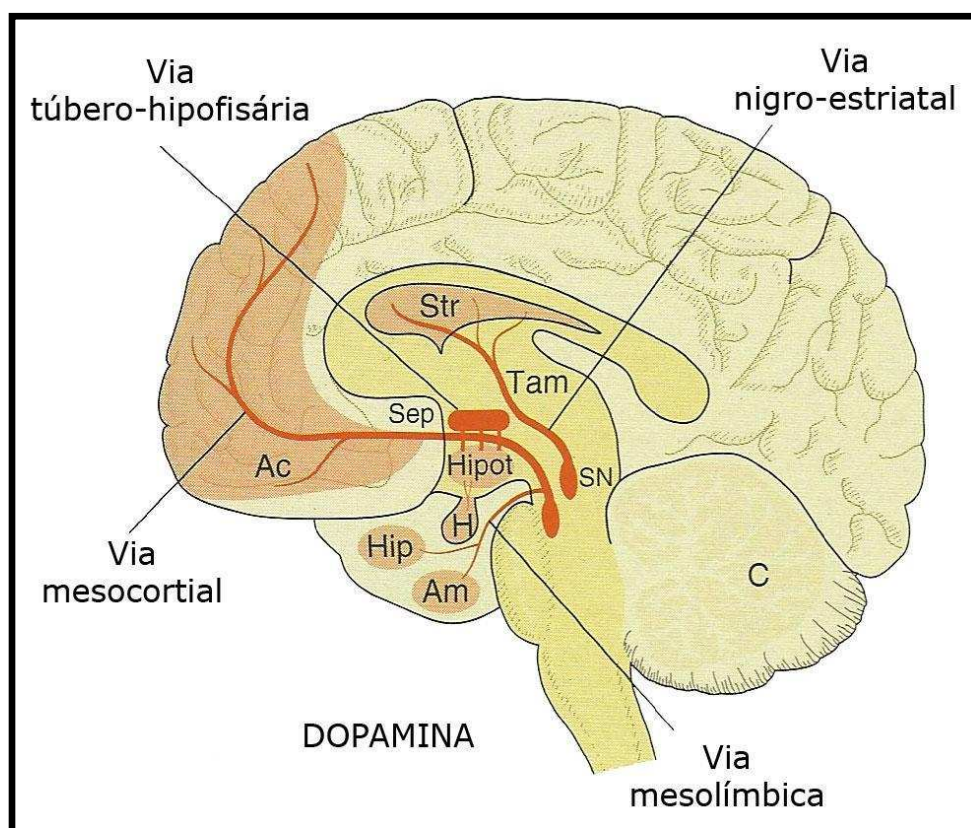
As monoaminas incluem as catecolaminas (dopamina e noradrenalina) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) (KATZUNG, 2008).

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- $\beta$ -hidroxilase (RANG et al., 2007).

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, 2008).

Foram identificados cinco tipos de receptores dopaminérgicos: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>. Esses receptores são distribuídos em duas famílias distintas, os grupos dos receptores semelhantes a D<sub>1</sub> e semelhantes a D<sub>2</sub> (KATZUNG, 2008). O receptor D<sub>1</sub> 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 D<sub>5</sub>, que também atua ativando a adenilato ciclase e é encontrado no hipocampo e hipotálamo. O receptor D<sub>2</sub>

atua inibindo os canais de cálcio e abrindo os canais de potássio, sendo encontrado tanto pré quanto pós-sinapticamente em neurônios no caudado putame, núcleo *accumbens* e tubérculo olfatório. Um segundo membro dessa família é o receptor D<sub>3</sub>, que atua inibindo a adenilato ciclase e localiza-se no córtex frontal, medula oblonga e mesencéfalo. O terceiro membro dessa família é o receptor D<sub>4</sub>, que também atua inibindo a adenilato ciclase. Todos os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos (BRUNTON, 2006; KATZUNG, 2008).



**Figura 4.** Vias dopaminérgicas no encéfalo

**Fonte:** Rang et al. (2007)

**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

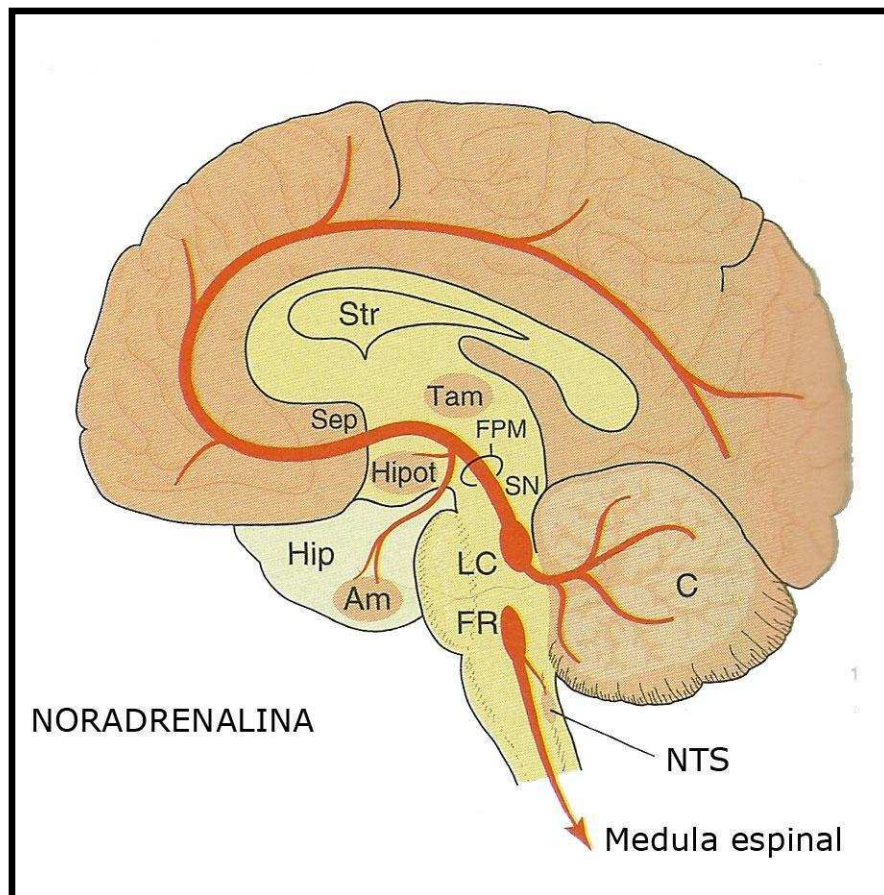
Os neurônios noradrenérgicos localizam-se, em sua maioria, no *locus ceruleus* ou na área tegmentar lateral da formação reticular (fig. 5). Existem descritos cinco subtipos de receptores noradrenérgicos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Quadro 1). Todos os subtipos de receptores noradrenérgicos são metabotrópicos. Os receptores  $\alpha_1$  atuam ativando a fosfolipase C, com conseqüente produção de trifosfato de inositol e diacilglicerol como segundos mensageiros, enquanto os receptores  $\alpha_2$  inibem a adenilato ciclase e diminuem

a produção de AMPc. Todos os tipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos estimulam a adenilato ciclase e a produção de AMPc (RANG et al., 2007; KATZUNG, 2008).

**Quadro 1.** Distribuição dos subtipos de receptores adrenérgicos

<b>Receptor</b>	<b>Tecido</b>	<b>Ações</b>
$\alpha_1$	Músculo liso vascular;	Contração;
	Músculo dilatador pupilar;	Contração;
	Músculo liso pilomotor;	Ereção dos pêlos;
	Próstata;	Contração
	Coração	Efeito inotrópico +
$\alpha_2$	SNC;	Múltiplas;
	Plaquetas;	Agregação;
	Terminações nervosas;	Inibe liberação de transmissores
	Músculo liso vascular;	Contração;
	Células adiposas	Inibição da lipólise
$\beta_1$	Coração	Efeitos inotrópicos e cronotrópicos +
$\beta_2$	Músculo liso respiratórios, uterino e vascular;	Relaxamento;
	Músculo esquelético;	Captação de potássio;
	Fígado	Ativa a glicogenólise
$\beta_3$	Células adiposas	Ativa a lipólise

Fonte: Katzung (2008)



**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. (2007)

**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-HT<sub>3</sub>, 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 <sup>a</sup>	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 <sub>3</sub> /DAG
2B	Fundo gástrico	Contração	↑IP <sub>3</sub> /DAG
2C	SNC; plexo coróide	Secreção de LCR	↑IP <sub>3</sub> /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

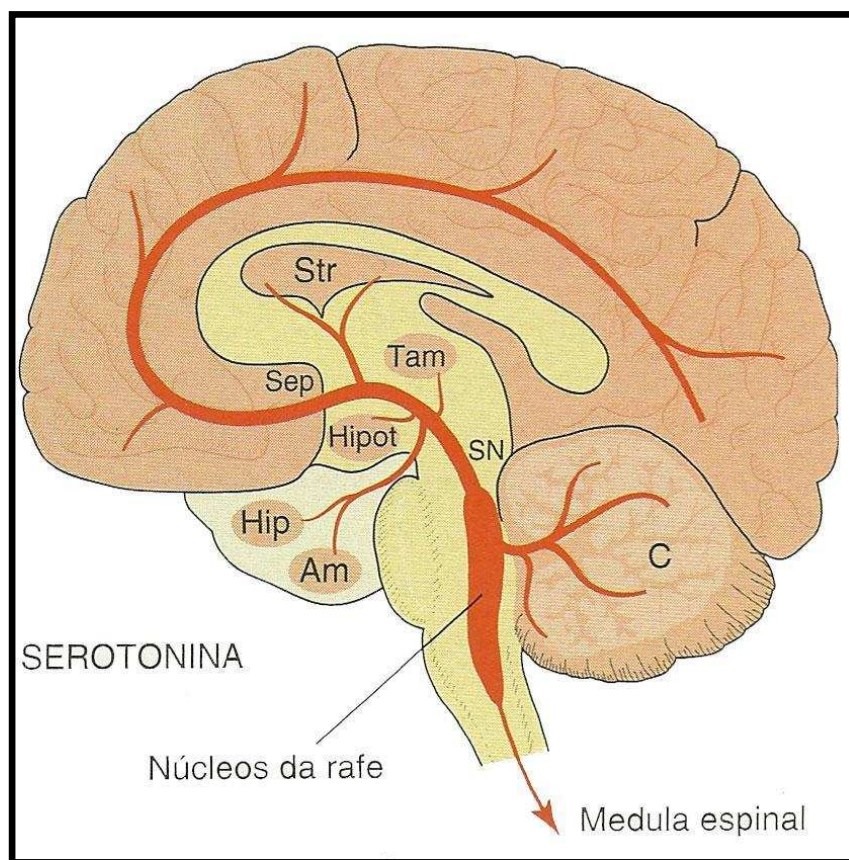
**Fonte:** Rang et al. (2007)

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. (2007)

**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<sub>1B</sub> 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).

Além da hipótese monoaminérgica, existe o estudo do fator neurotrópico derivado do cérebro. O fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF) é uma pequena proteína dimérica neuroprotetora e um membro da família das neurotrofinas, largamente expressas no cérebro adulto dos mamíferos. O BDNF desempenha um papel crítico no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central e periférico, na sobrevivência e proliferação neuronal. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que o estresse e a depressão levam a redução do volume total do hipocampo e perda celular

no sistema límbico. Outros estudos indicam que a depressão em modelos animais está associada com redução de níveis de BDNF no cérebro e a administração central de BDNF reverte tais estados (YULUG et al., 2009).

#### **1.4 Epilepsia e convulsão**

O termo *convulsão* refere-se à alteração transitória do comportamento recorrente do disparo rítmico, sincrônico e desordenado de populações de neurônios cerebrais. Já o termo *epilepsia* refere-se a um distúrbio da função cerebral caracterizado pela ocorrência periódica e imprevisível de convulsões (BRUNTON, 2006).

A epilepsia é o segundo distúrbio neurológico mais comum depois do acidente vascular cerebral, afetando 0,5 a 1% da população (ALI et al., 2004). Atualmente, uma grande variedade de técnicas visando conter e controlar as convulsões têm sido empregadas, como a yoga, o uso de medicamentos e a cirurgia, embora o uso de medicamentos continue a ser essencial no tratamento da epilepsia (GUPTA; MALHOTRA, 2000). Contudo, os medicamentos antiepilépticos clássicos não são universalmente eficazes ou invariavelmente seguros (DESAI et al., 1995). Em muitos pacientes, substâncias como fenobarbital, fenitoína, benzodiazepínicos, valproato de sódio, carbamazepina, entre outras, são incapazes de controlar as convulsões de maneira eficaz (KASTURE et al., 2002). Além disso, os efeitos adversos associados ao seu uso limitam o tratamento (Mc NAMARA, 1996).

A inibição ou excitação neuronais dependem das concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  e das concentrações extracelulares de  $\text{K}^+$ , assim como do balanço entre as transmissões inibitórias GABAérgicas e adenosinérgicas e a transmissão excitatória glutamatérgica (OZBAKIS-DENGIZ; BAKIRCI, 2009). Até então, a pesquisa em epilepsia tem focado largamente a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica, assim como o envolvimento dos canais iônicos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , visto que os antiepilépticos usados na atualidade atuam em um ou mais desses sistemas (ROGAWSKI, 1998; BONNET et al., 2000).

**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, como já foi citado.

Como também já foi observado, não existem trabalhos publicados sobre atividades do carvacrol no sistema nervoso central. Considerando estudos prévios que revelaram propriedades centrais de alguns monoterpenos (UMEZU; MORITA, 2003; SILVA et al., 2007) e a importância de produtos naturais como fontes de novas drogas, o presente estudo foi realizado para investigar os efeitos do carvacrol em modelos animais de atividade locomotora, ansiedade, depressão e convulsão em camundongos e estudar os mecanismos farmacológicos envolvidos.

## **OBJETIVOS**

---

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi investigar as ações do carvacrol no sistema nervoso central em camundongos. Para isto, foram utilizados modelos experimentais clássicos de ansiedade, depressão, sedação e convulsão.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Estudar a ação do carvacrol em camundongos no modelo comportamental de ansiedade utilizando o teste do labirinto em cruz elevado.
- Avaliar a atividade locomotora espontânea e atividade relaxante muscular utilizando os testes do campo aberto e rota rod, respectivamente.
- Determinar a ação do carvacrol em camundongos nos modelos comportamentais de depressão utilizando os testes do nado forçado e suspensão da cauda.
- Avaliar a atividade Sedativa/Hipnótica e Anticonvulsivante utilizando os testes do tempo de sono induzido por pentobarbital e o teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, respectivamente.
- Verificar as participações dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação antidepressivo do carvacrol.

- Avaliar a participação dos receptores GABA<sub>A</sub> / Benzodiazepínicos no mecanismo de ação ansiolítico do carvacrol.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Drogas e reagentes

**Quadro 3.** Drogas e Reagentes

<b>Drogas/Reagentes</b>	<b>Origem</b>
Água Destilada	Deionizador
Álcool Etílico P.A.	Quimex, Brasil
Carvacrol	Sigma
Bupropiona	Geigy
Imipramina	Geigy
Diazepam	União Química Brasil
Fluoxetina	Geisy
Flumazenil	Sigma
PCPA	Sigma
Prazosina	Sigma
Ioimbina	Sigma
SCH 23390	Sigma
Sulpirida	Sigma
Pentobarbital	Abbot
Pentilenotetrazol	Sigma
Tween 80	Sigma

**Quadro 4.** Equipamentos

<b>Equipamentos</b>	<b>Modelo/Origem</b>
Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Campo aberto	Fabricado pelo laboratório
Labirinto em cruz elevado	Fabricado pelo laboratório
<i>Rota rod</i>	Ugo Basile, Itália
Recipiente do nado forçado	Fabricado pelo laboratório
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Pipetas automáticas	H.E., Dinamarca
Vidrarias	Pirex, Brasil
Estufa de secagem e esterilização	Modelo 315 SE FANEN, 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  $25 \pm 1$  oC 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 15/09 o número do referido protocolo.

### 4.3 Preparo das Drogas

O carvacrol (cvc) foi dissolvido em Tween 80 a 2% e diluído em água destilada, obtendo a concentração final de 1,25; 2,5 e 5 mg/mL, que correspondem as doses de 12,5; 25 e 50 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 (1 e 2 mg/kg), imipramina (10 e 30 mg/kg), bupropiona (30 mg/kg), fluoxetina (35 mg/kg), pentobarbital sódico (40 mg/kg), pentilenotetrazol (80 mg/kg), flumazenil (2,5 mg/kg), prazosina (1 mg/kg), ioimbina (1 mg/kg), SCH23390 (15 mg/kg), sulpirida (50 mg/kg) e p-clorofenilalanina metil ester (PCPA; 100 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 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados agudamente com carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg, por via oral (v.o.). Os animais foram submetidos aos testes 60 minutos (min) após o tratamento oral. Para a avaliação da atividade ansiolítica, foi utilizado diazepam 1 mg/kg i.p., no teste do labirinto em cruz elevado e, diazepam 2 mg/kg i.p., no campo aberto. Diazepam 2 mg/kg i.p. também foi utilizado no teste do *rota rod* como padrão para a atividade relaxante muscular e o diazepam 1 mg/kg i.p também foi utilizado nos modelos de tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol, como padrão para atividade sedativa e anticonvulsivante, respectivamente. Para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizada imipramina 10 e 30 mg/kg i.p. e bupropiona 30 mg/kg i.p., nos testes do nado forçado e da suspensão da cauda, como padrões positivos.

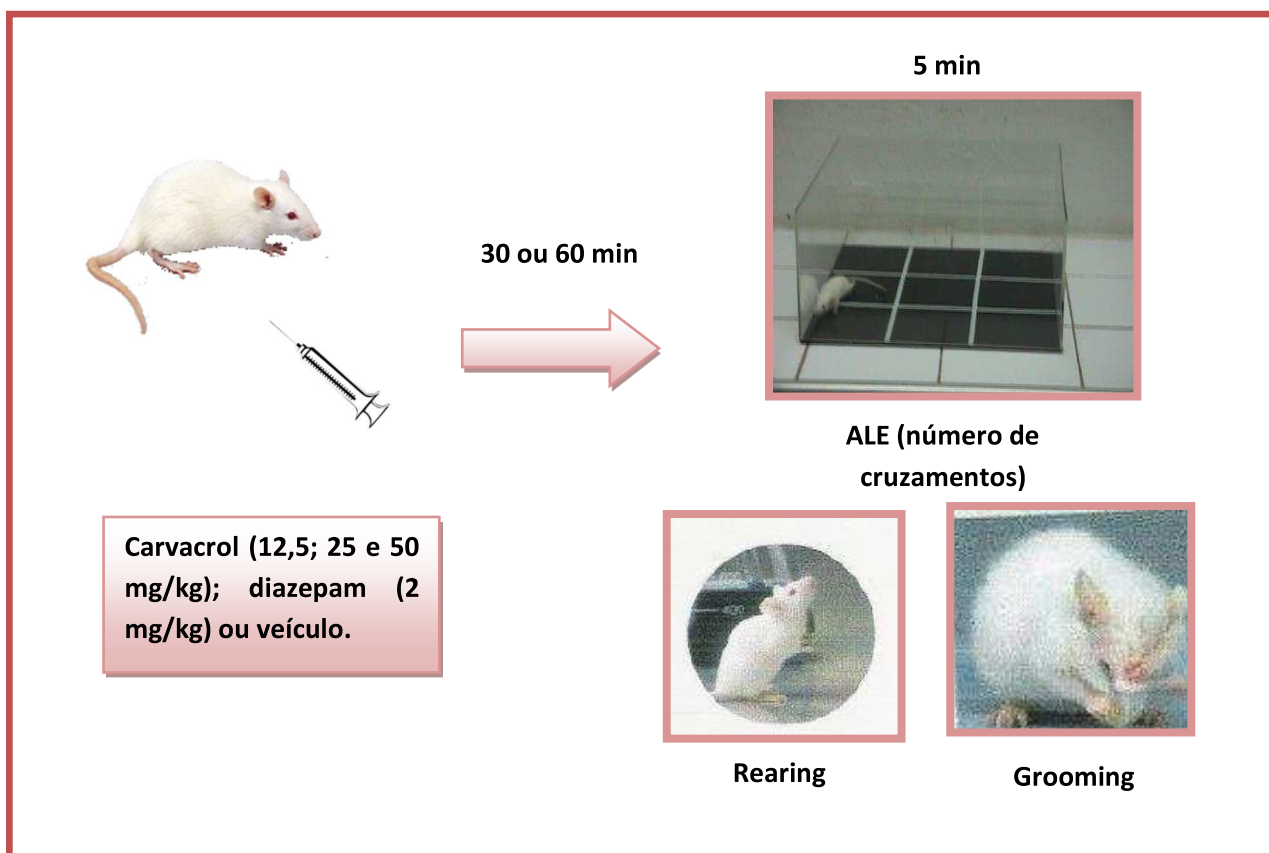
### 4.5 Protocolo Experimental

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  $25\pm 1$  °C. Para o teste do labirinto em cruz elevado foi utilizada uma iluminação de baixa densidade (lâmpada vermelha de 15 W). Os demais experimentos foram realizados com iluminação normal. Todos os testes comportamentais foram realizados com diferentes grupos de animais e em dias distintos. Em todos os testes, com exceção apenas do nado forçado e da suspensão da cauda, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool 70% para a remoção de resíduos e odor do animal.

#### 4.5.1 Avaliação da Atividade Locomotora

##### 4.5.1.1 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 (12,5; 15 e 50) 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 5**).



**Quadro 5.** Teste do campo aberto em camundongos.

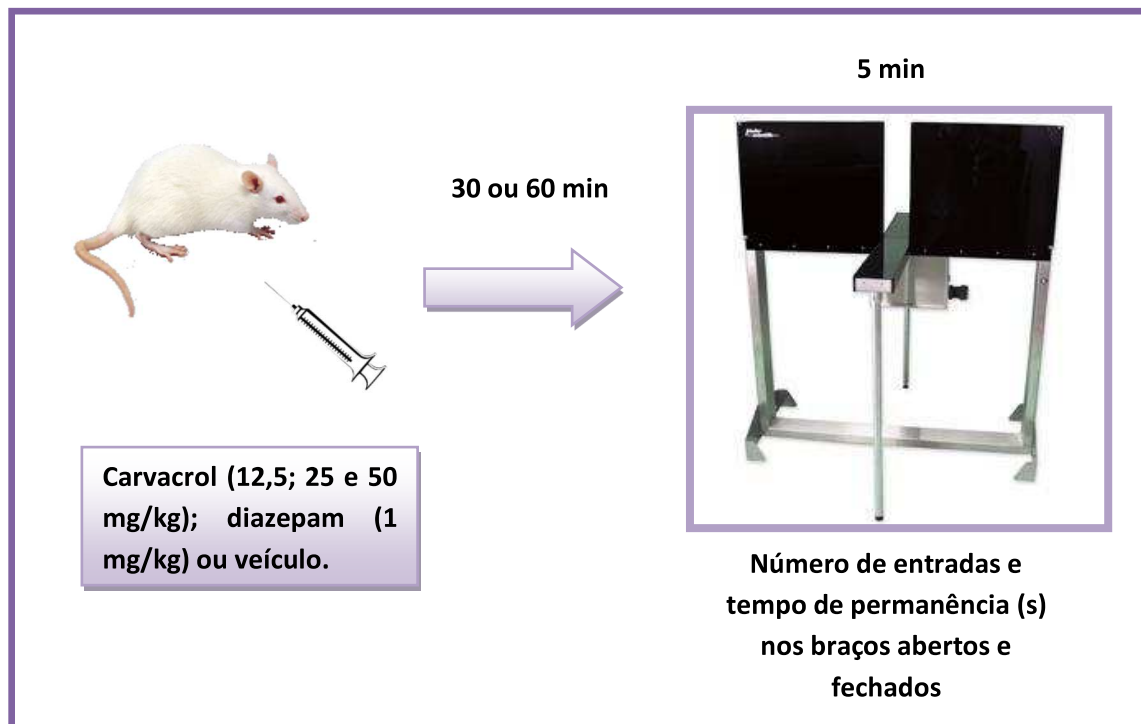
#### 4.5.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica

##### 4.5.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O modelo LCE (PELLOW et al., 1985a; LISTER, 1987) consiste em um aparato de madeira composto por dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz (**Quadro 6**). Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Sessenta minutos após o

tratamento com carvacrol (12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.) e 30 minutos após o tratamento com diazepam (1 mg/kg, i.p.), os animais foram colocados individualmente no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado pelo período de 5 minutos. Os parâmetros comportamentais registrados no LCE foram: número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados. A frequência total de entradas é obtida pela soma das frequências de entradas nos braços abertos e nos braços fechados. Para análise estatística dos dados, é calculada a porcentagem de entrada nos braços abertos dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, sendo este resultado multiplicado por 100. De maneira semelhante é calculado a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos. Desta forma, os parâmetros utilizados para análise estatística são: número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), porcentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

Posteriormente, com o objetivo de investigar o possível mecanismo de ação do carvacrol na ansiedade, foram utilizados dois grupos de animais, sendo o primeiro tratado com flumazenil (FLU) 2,5 mg/kg i.p., um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico e, 15 minutos após o tratamento, foi administrado ao mesmo grupo de animais veículo por via oral (FLU-2,5 + veículo). O segundo grupo de animais também foi tratado com flumazenil 2,5 mg/kg i.p. e, 15 minutos após o tratamento, foi administrado carvacrol 25 mg/kg por via oral (FLU-2,5 + CVC-25). Foi utilizada a dose de 25 mg/kg de carvacrol pois trata-se da menor dose efetiva. Os dois grupos experimentais foram testados no labirinto 60 minutos após a administração de veículo e carvacrol. Para análise estatística, o grupo FLU-2,5 + veículo foi comparado ao grupo FLU-2,5 + CVC-25, enquanto os demais grupos foram comparados aos respectivos controles.



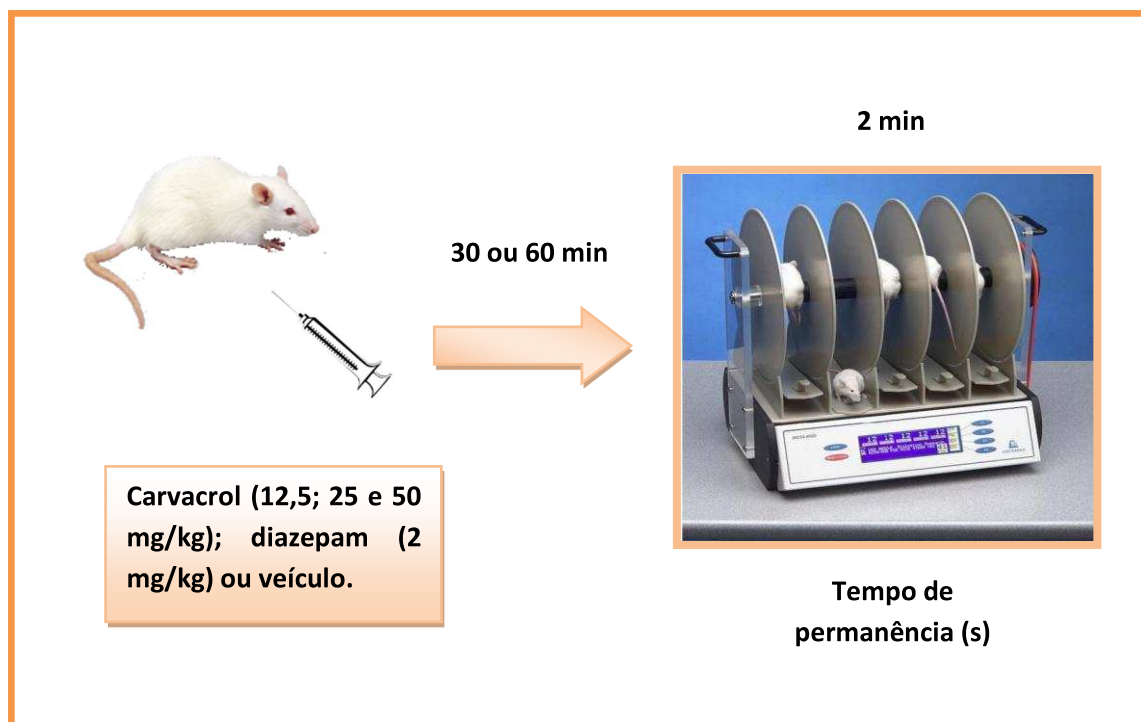
**Quadro 6.** Teste do labirinto em cruz elevado em camundongos

#### 4.5.3 Avaliação da atividade relaxante muscular

##### 4.5.3.1. Teste do *Rota Rod*

O teste do *rota rod* (**Quadro 7**) 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 (12,5; 25 e 50) 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).



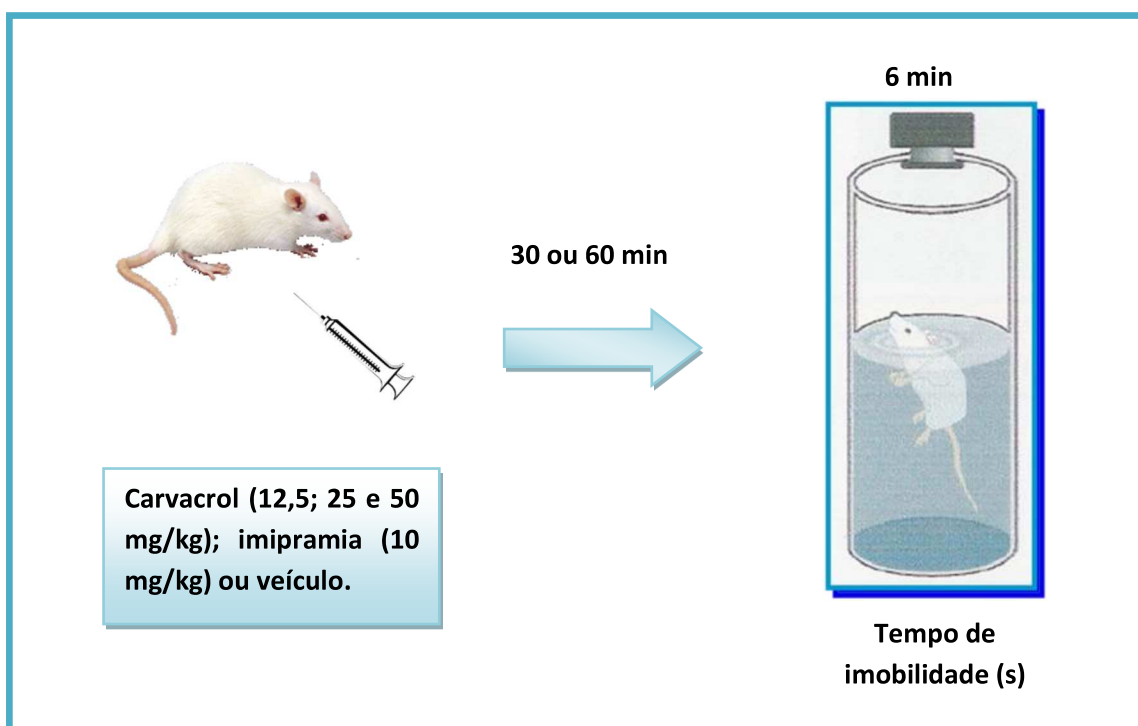


**Quadro 7.** Teste do Rota Rod em camundongos.

#### 4.5.4 Avaliação da Atividade Antidepressiva

##### 4.5.4.1 Teste do Nado Forçado

Para o teste do nado forçado (PORSOLT et al., 1977) foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca na temperatura de aproximadamente  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , na altura de cerca de 20 cm (**Quadro 8**). Sessenta minutos após o tratamento com carvacrol (12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.) e 30 minutos após o tratamento com imipramina (10 mg/kg, i.p.), os animais foram observados individualmente no tanque e foi registrado o tempo de imobilidade, em segundos (s), durante o período de 5 minutos. Os animais foram considerados imóveis quando permaneceram flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves a fim de manter a cabeça acima do nível da água.



**Quadro 8.** Teste do nado forçado em camundongos.

Posteriormente, foram utilizados diferentes grupos de animais com a finalidade de avaliar o mecanismo da ação antidepressiva do carvacrol. Para esta investigação, foi utilizada a dose de carvacrol de 25 mg/kg, pois trata-se da menor dose efetiva. Para elucidar os efeitos do carvacrol sobre os diversos sistemas de neurotransmissores envolvidos na depressão foram utilizadas as seguintes drogas:

#### 4.5.4.2 Avaliação do sistema noradrenérgico

Diferentes grupos de animais foram pré-tratados com o antagonista de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  prazosina (1mg/kg. i.p.) e com o antagonista de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  ioimbina (1mg/kg) e 30 minutos depois, foram tratados com carvacrol (25 mg/kg por v.o.) e veículo (água destilada + 2% de Tween 80, v.o.). Sessenta minutos depois da administração com carvacrol ou veículo, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, onde foi registrado o tempo de imobilidade pelo período de 5 minutos.

#### 4.5.4.3 Avaliação do sistema serotoninérgico

Para a avaliação do sistema serotoninérgico, diferentes grupos de animais foram pré-tratados com PCPA (100 mg/kg, i.p., uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos), um inibidor da síntese de 5-HT, e 30 minutos depois, foram tratados com carvacrol (25 mg/kg por v.o.), veículo (água destilada + 2% de Tween 80, v.o.) e fluoxetina (35 mg/kg, i.p.). Sessenta minutos após a administração de carvacrol e veículo e trinta minutos após a administração com fluoxetina, os animais foram colocados no cilindro com água e o tempo de imobilidade durante o período de 5 minutos foi registrado.

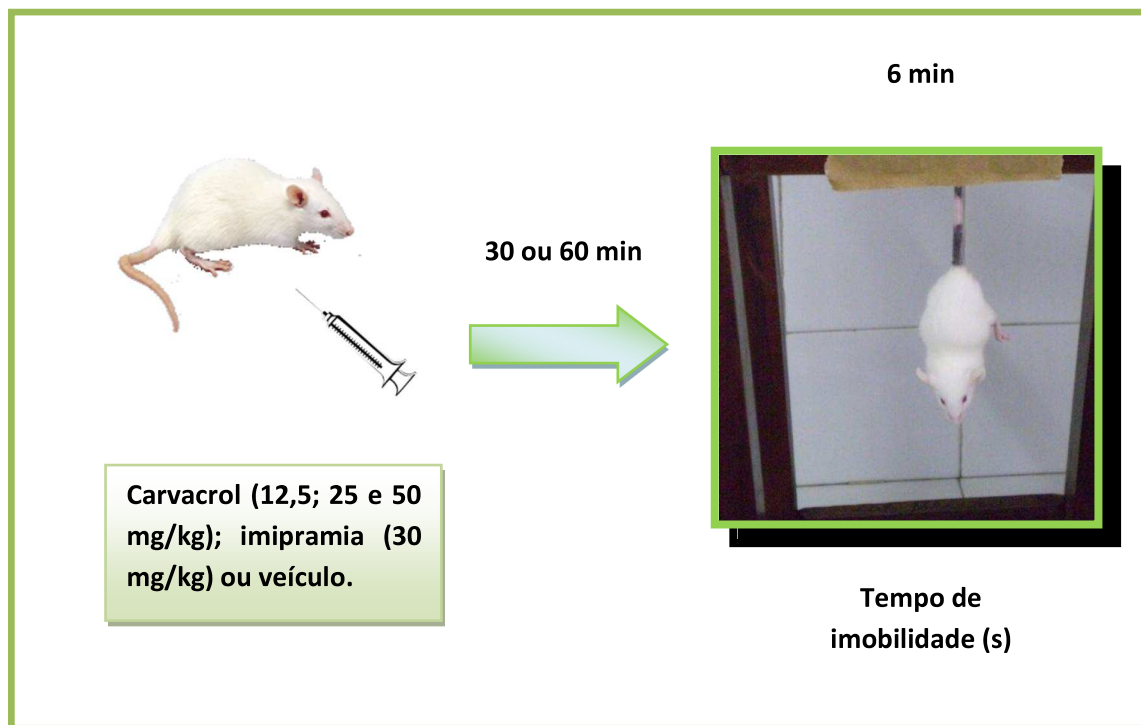
#### 4.5.4.4 Avaliação do sistema dopaminérgico

Diferentes grupos de animais foram pré-tratados com SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.), um antagonista dos receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos e sulpirida (50 mg/kg, i.p.), um antagonista dos receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos trinta minutos antes do tratamento com carvacrol (25 mg/kg por v.o.), veículo (água destilada + 2% de Tween 80, v.o.) e bupropiona (30 mg/kg, i.p.). Sessenta minutos após a administração com carvacrol e veículo e 30 minutos após a administração de bupropiona, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, onde foi registrado o tempo de imobilidade pelo período de 5 minutos

#### 4.5.4.5 Teste da Suspensão da Cauda

Para este teste (**Quadro 9**), sessenta minutos após o tratamento com carvacrol (12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.) e 30 minutos após o tratamento com imipramina (30 mg/kg, i.p.), os animais foram suspensos, um a cada vez, numa plataforma 58 cm acima da bancada, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda (STERU et

al., 1985). Foi observado o tempo de imobilidade do animal em segundos (s) durante o período de 6 minutos.



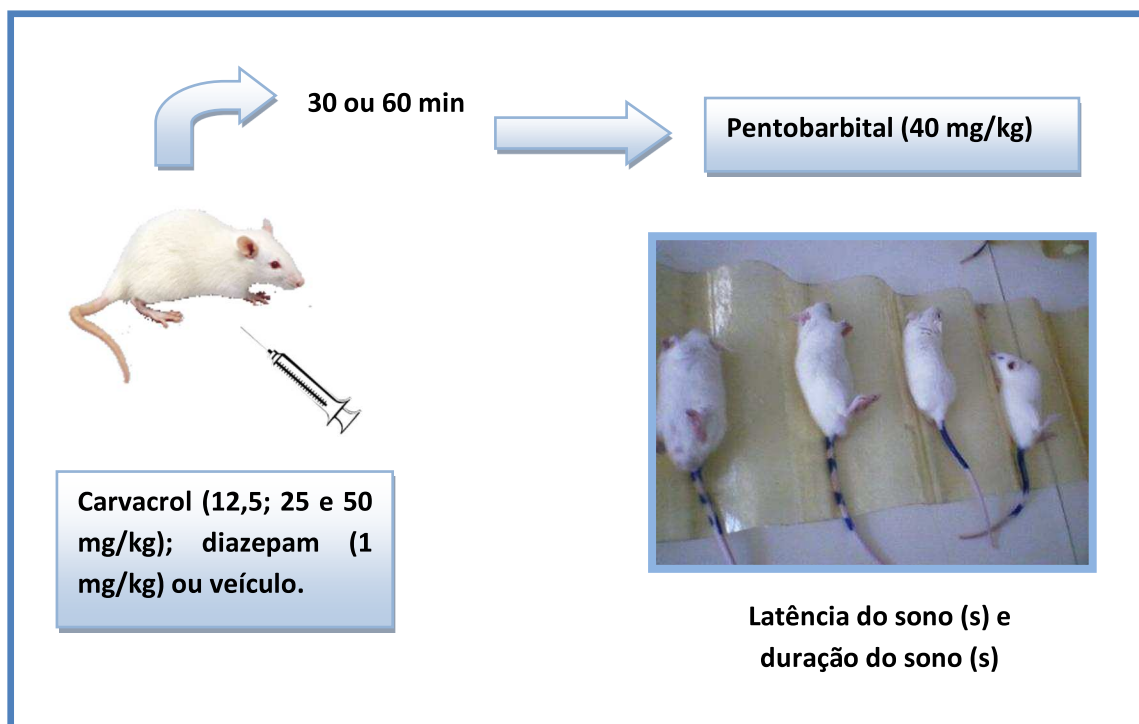
**Quadro 9.** Teste da suspensão da cauda em camundongos

#### 4.5.5 Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica e Anticonvulsivante

##### 4.5.5.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

Sessenta minutos após a administração de carvacrol (12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.) e 30 min após o tratamento com diazepam (1 mg/kg, i.p. ), foi administrado pentobarbital sódico (PTB) na dose de 40 mg/kg, via i.p. O tempo desde a administração do PTB até a perda do reflexo de endireitamento foi registrado como latência do sono, em segundos. Após terem adormecido, os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal, e o tempo decorrido entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento foi registrado como duração do sono, em segundos (WAMBEBE, 1985; ROLLAND et al., 1991). A perda do reflexo de endireitamento é a incapacidade que o animal apresenta de

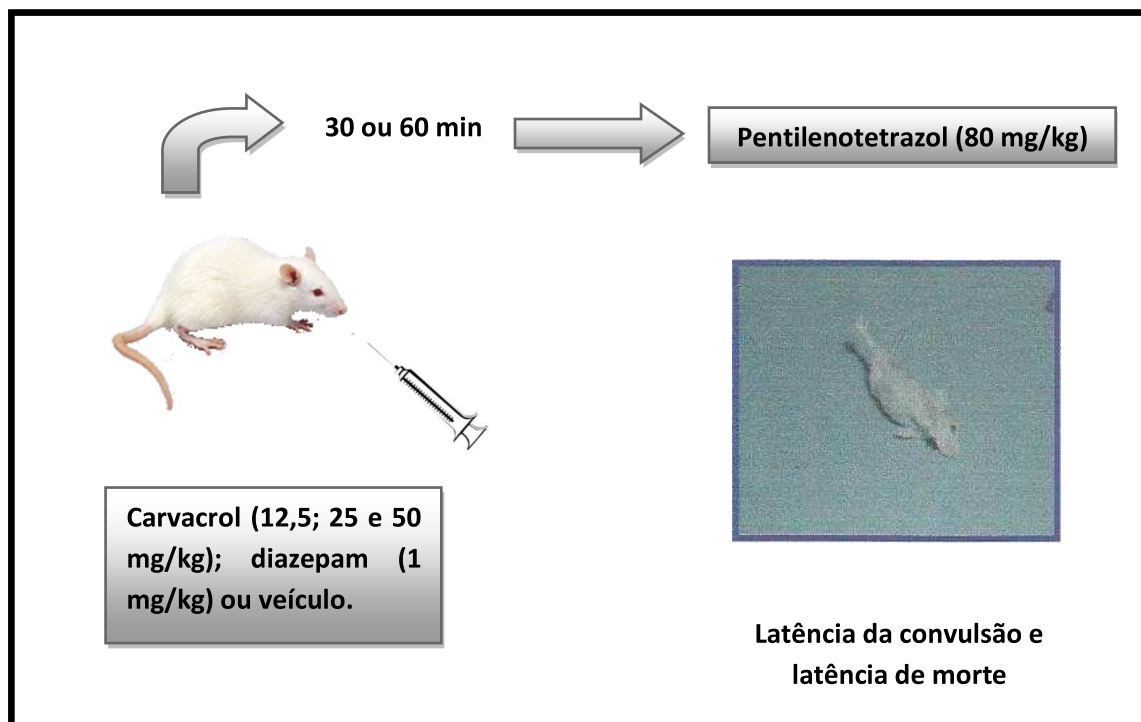
voltar à posição normal quando colocado em decúbito dorsal. O critério para a recuperação do reflexo de endireitamento foi fixado quando o animal saiu da imposição por três vezes consecutivas (CARLINI et al., 1986; MATTEI et al., 1998). Portanto, os parâmetros usados neste teste são a latência do sono e a duração do sono (**Quadro 10**).



**Quadro 10.** Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

#### 4.5.5.2 Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol

Neste teste, foi administrado pentilenotetrazol (PTZ) 80 mg/kg i.p. 60 minutos após a administração de carvacrol (12,5; 25 e 50 v.o.) e 30 minutos após a administração de diazepam (1 mg/kg, i.p.). Logo após a administração de PTZ, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados pelo período de 20 minutos (**Quadro 11**). Os parâmetros analisados foram a latência da convulsão (tempo decorrido desde a administração do PTZ até a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica), em segundos e a latência de morte dos animais (tempo decorrido da administração do PTZ até a morte), em segundos (SWINYARD et al., 1952).



**Quadro 11.** Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.

#### 4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*).

Os valores foram representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

---

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da Atividade Ansiolítica

#### 5.1.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O número de entrada nos braços abertos (NEBA), a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) foram os parâmetros analisados. Todas as doses de carvacrol aumentaram, significativamente, o NEBA, comparados ao grupo controle [CVC 12,5 mg/kg:  $7,071 \pm 0,7222$  (10); CVC 25 mg/kg:  $9,357 \pm 0,9412$  (9); CVC 50 mg/kg:  $7,786 \pm 0,8064$  (9); cont.:  $4,214 \pm 0,4591$  (9)] (**Fig. 7**).

A **figura 8** mostra que o carvacrol aumentou, significativamente, o PEBA em todas as doses estudadas, quando comparado ao grupo controle [CVC: 12,5 mg/kg:  $44,29 \pm 3,402$  (10); CVC: 25 mg/kg:  $51,36 \pm 2,447$  (9); CVC: 50mg/kg:  $43,37 \pm 3,101$  (10); cont.:  $30,68 \pm 2,962$  (10)].

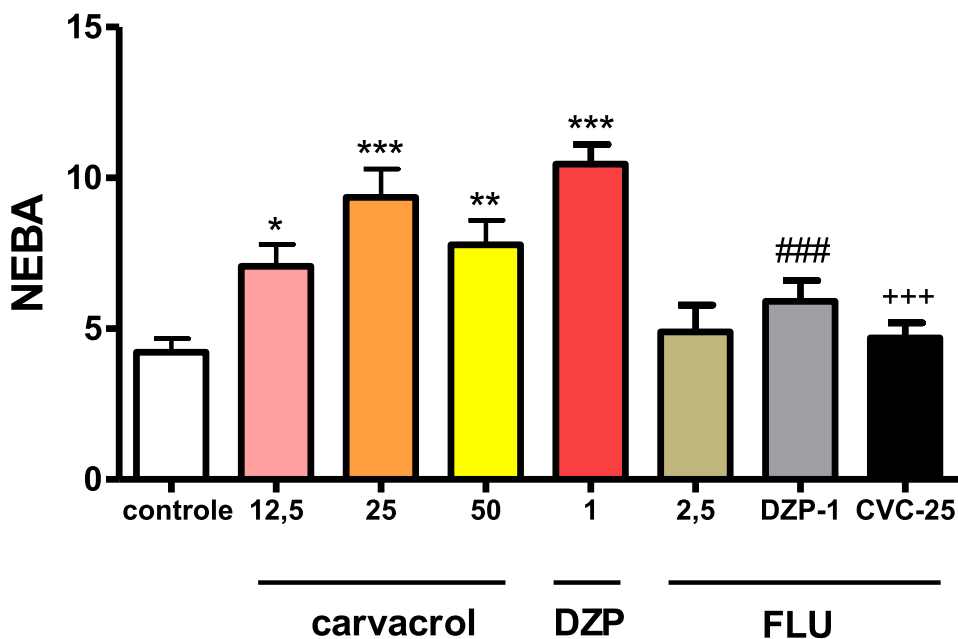
O parâmetro TPBA foi aumentado, significativamente, com todas as doses de carvacrol quando comparados com o grupo controle [CVC 12,5 mg/kg:  $86,13 \pm 8,486$  (9); CVC 25 mg/kg:  $104,0 \pm 9,044$  (9); CVC 50 mg/kg:  $87,74 \pm 8,413$  (9); cont.:  $52,00 \pm 7,760$  (7)] (**Figura 9**).

O carvacrol aumentou, significativamente, o PTBA com todas as doses quando comparado ao grupo controle [CVC 12,5 mg/kg:  $39,09 \pm 3,882$  (10); CVC 25 mg/kg:  $49,14 \pm 3,990$  (9); CVC 50 mg/kg:  $44,00 \pm 3,647$  (10); cont.:  $23,61 \pm 3,201$  (10)] (**Figura 10**).

Diazepam 1mg/kg aumentou todos os parâmetros: NEBA [DZP-1:  $10,46 \pm 0,6466$  (13)]; TPBA [DZP-1:  $168,7 \pm 5,366$  (12)]; PEBA [DZP-1:  $63,56 \pm 2,594$  (11)] e PTBA [DZP-1:  $61,27 \pm 2,974$  (11)] em relação ao grupo controle (**Figuras 7, 8, 9 e 10**).

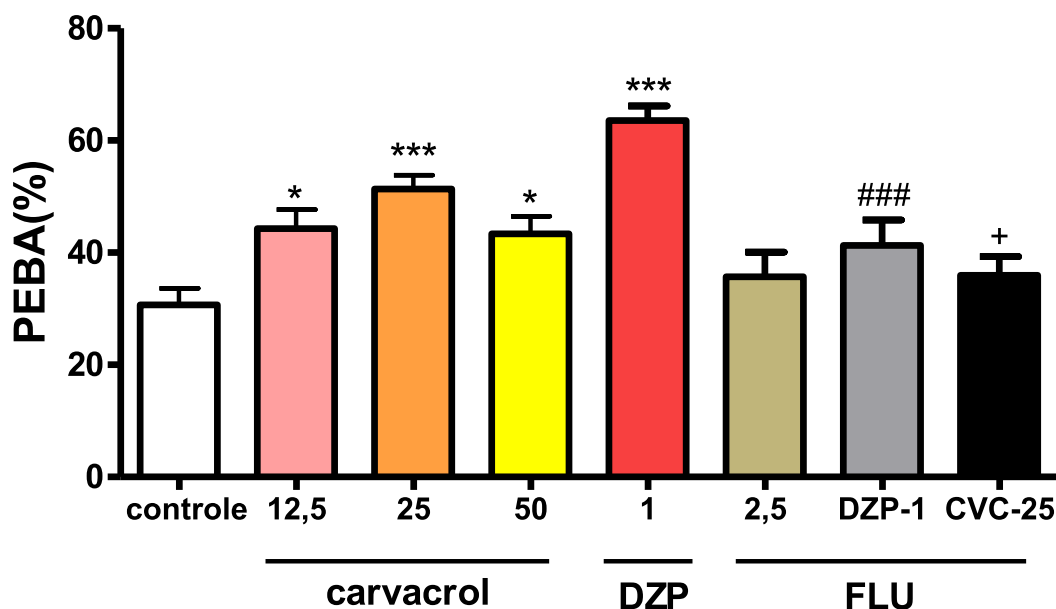


A análise do envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito ansiolítico do carvacrol mostrou que o grupo (FLU-2,5+veículo v.o.) não alterou os parâmetros analisados [NEBA:  $4,889 \pm 0,8889$  (9); TPBA:  $63,50 \pm 4,424$  (8); PEBA:  $35,73 \pm 4,392$  (9); PTBA:  $24,11 \pm 2,205$  (9)]. Entretanto, no grupo tratado com flumazenil 15 min antes da administração de carvacrol 25 mg/kg (FLU-2,5+CVC-25) foi observado uma supressão do efeito ansiolítico do carvacrol em todos os parâmetros analisados: NEBA [ $4,700 \pm 0,4955$  (10); TPBA [ $67,17 \pm 10,70$  (10); PEBA [ $35,96 \pm 3,347$  (10); PTBA [ $30,80 \pm 4,836$  (10)] quando comparado com o grupo tratado apenas com carvacrol 25 mg/kg [CVC-25 NEBA:  $9,357 \pm 0,9412$  (10); TPBA:  $104,0 \pm 9,044$  (9); PEBA:  $51,36 \pm 2,447$  (9); PTBA:  $49,14 \pm 3,990$  (10)]. Do mesmo modo, a associação (FLU-2,5+DZP-1) também reverteu o efeito ansiolítico do diazepam em todos os parâmetros analisados [NEBA:  $5,900 \pm 0,6904$  (10); TPBA:  $77,33 \pm 6,829$  (9); PEBA:  $41,31 \pm 4,532$  (9); PTBA:  $29,41 \pm 2,476$  (10)] quando comparado com o grupo DZP-1 [NEBA:  $10,46 \pm 0,6466$  (10); TPBA:  $168,7 \pm 5,366$  (10); PEBA:  $63,56 \pm 2,594$  (10); PTBA:  $61,27 \pm 2,974$  (10)] (**Figuras 7, 8, 9 e 10**).



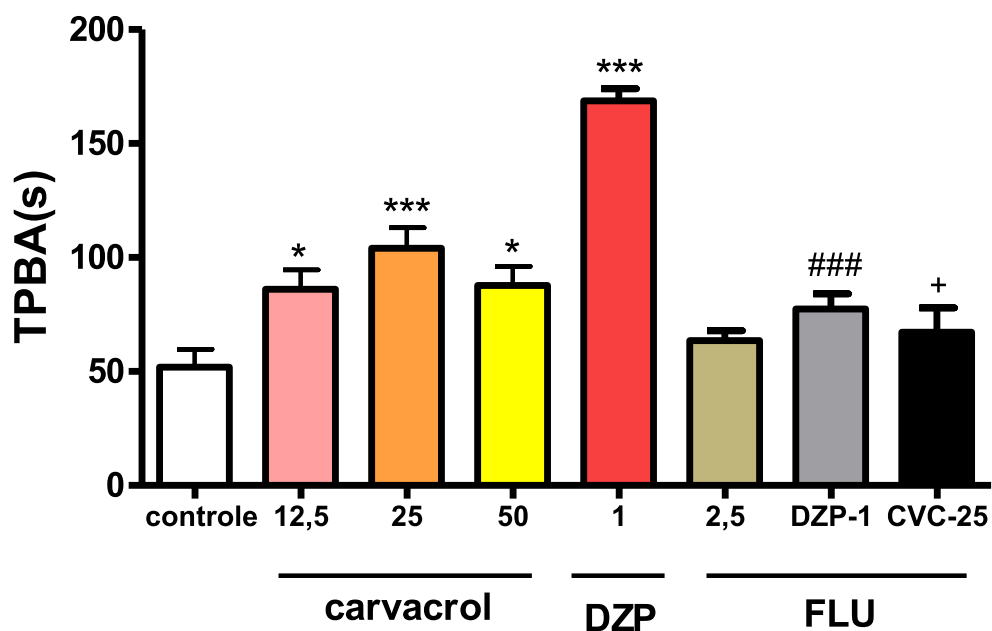
**Figura 7 - Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 15 min após administração de flumazenil (FLU 2,5 mg/kg, i.p.) e 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) min depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média ± EPM do número de entradas nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; +++ $p < 0,001$  vs CVC-25; ### $p < 0,001$  vs DZP-1.



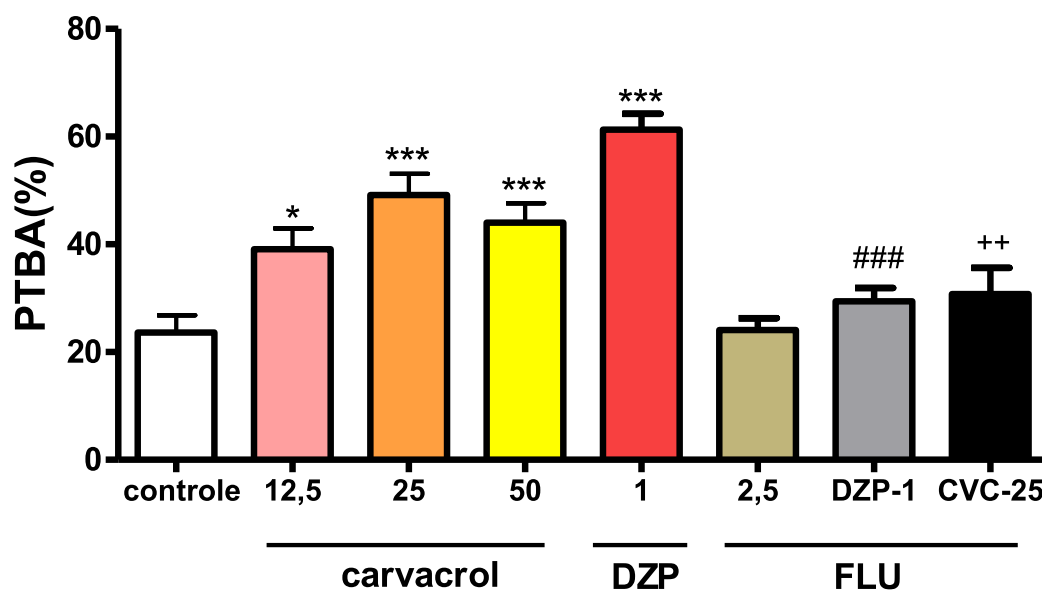
**Figura 8 - Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre o percentual de entrada nos braços abertos (PEBA%) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 15 min após administração de flumazenil (FLU 2,5 mg/kg, i.p.) e 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) min depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média ± EPM do percentual de entrada nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; + $p < 0,05$  vs CVC-25; ### $p < 0,001$  vs DZP-1.



**Figura 9 - Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 15 min após administração de flumazenil (FLU 2,5 mg/kg, i.p.) e 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) min depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de permanência nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; + $p < 0,05$  vs CVC-25; ### $p < 0,001$  vs DZP-1.



**Figura 10 - Efeito do carvacrol e diazepam, sozinhos ou associados a flumazenil sobre a percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA%) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 15 min após administração de flumazenil (FLU 2,5 mg/kg, i.p.) e 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) min depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da percentagem de tempo nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; ++ $p < 0,01$  vs CVC-25; ### $p < 0,001$  vs DZP-1.

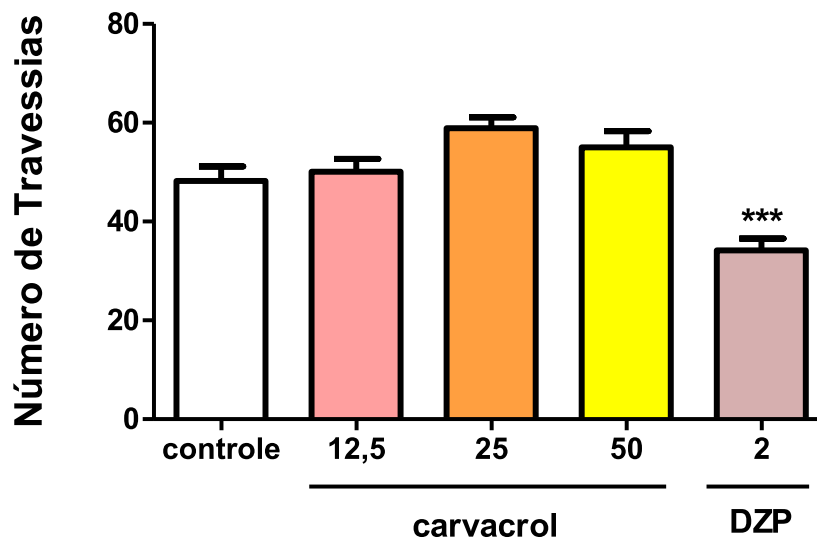
## 5.2 Avaliação da Atividade Locomotora e Relaxante Muscular

### 5.2.1 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 administrado por via oral não alterou a atividade locomotora em nenhuma das doses estudadas (**Figura 11**) [CVC 12,5 mg/kg:  $50,13 \pm 2,560$  (8); CVC 25 mg/kg:  $58,88 \pm 2,224$  (8); CVC 50mg/kg:  $55,00 \pm 3,317$  (8)] comparando com o controle [cont.:  $48,25 \pm 2,908$  (8)]. O diazepam 2 mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora em relação ao controle [DZP-2:  $34,15 \pm 2,425$  (7)].

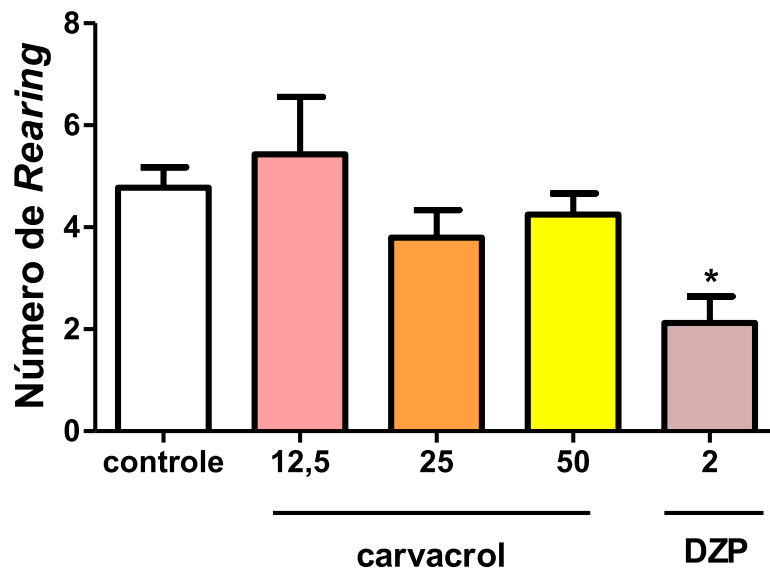
O *rearing* (**Figura 12**) não foi alterado em nenhuma das doses utilizadas [CVC 12,5 mg/kg:  $5,429 \pm 1,131$  (7); CVC 25 mg/kg:  $3,800 \pm 0,5333$  (10); CVC 50mg/kg:  $4,250 \pm 0,4119$  (8)] comparando com o controle [cont.:  $4,778 \pm 0,4006$  (9)]. O diazepam 2 mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *rearing* em relação ao controle [DZP-2:  $2,700 \pm 0,5588$  (10)].

O *grooming* (**Figura 13**) teve uma diminuição significativa com o uso do carvacrol nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg [CVC 25 mg/kg  $0,5000 \pm 0,1667$  (10); CVC 50mg/kg  $0,6000 \pm 0,1633$  (10)] em relação ao controle [cont.:  $1,300 \pm 0,1528$  (10)] enquanto a dose de 12,5 mg/kg não apresentou nenhuma alteração significativa [CVC 12,5 mg/kg  $1,100 \pm 0,1000$  (10)]. O diazepam 2 mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *grooming* em relação ao controle [DZP-2:  $0,9000 \pm 0,2769$  (10)].



**Figura 11 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.**

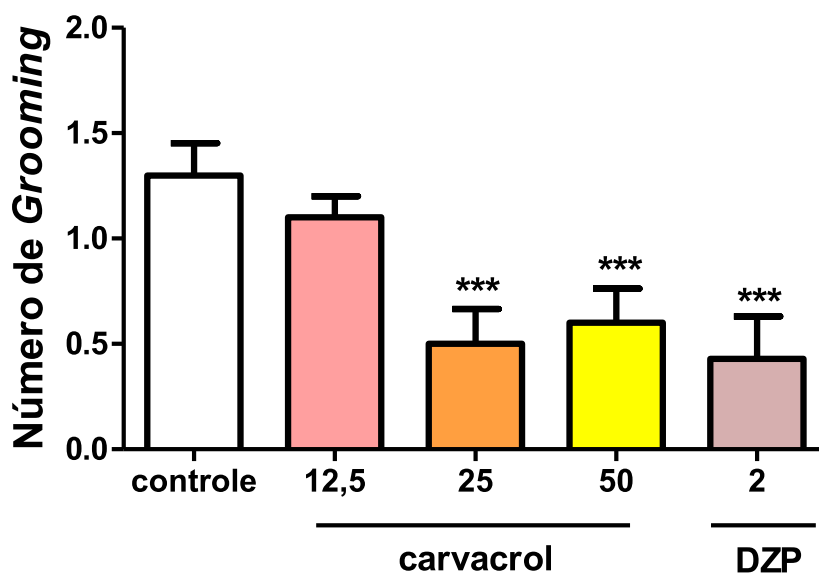
Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.



**Figura 12 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$  vs controle





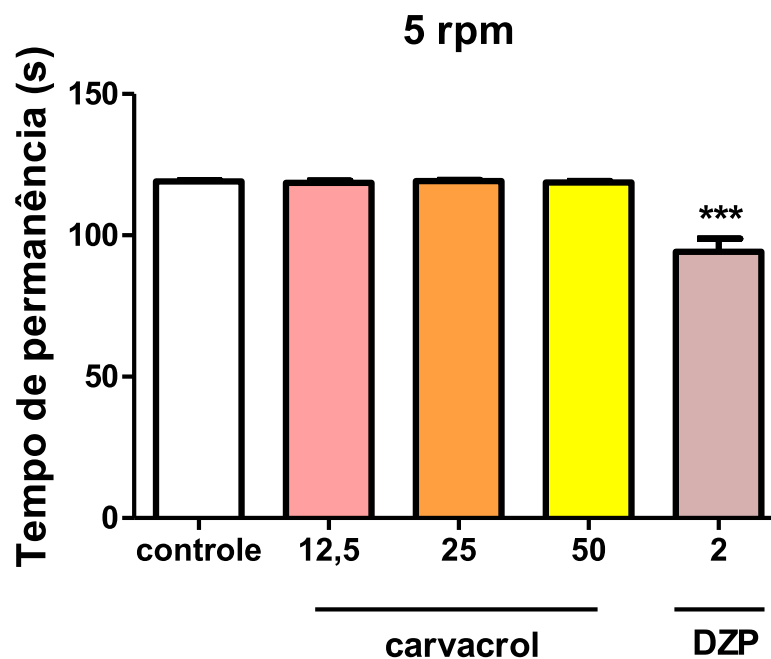
**Figura 13 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média ± EPM do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### 5.2.2 Teste do *Rota Rod*

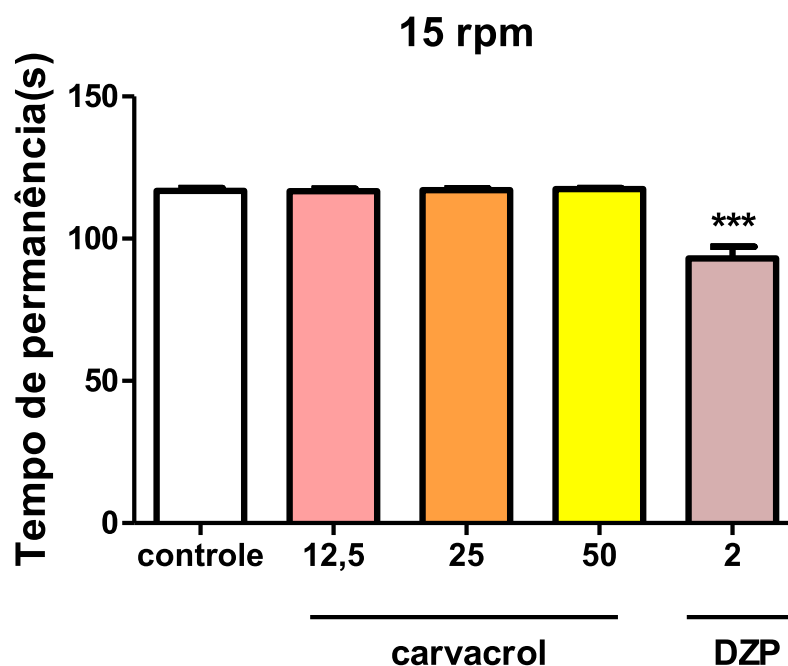
Neste teste o parâmetro analisado é o tempo de permanência na barra durante o período de 2 minutos nas rotações de 5, 15 e 40 rpm.

Carvacrol nas respectivas rotações não alterou o tempo de permanência na barra em nenhuma das doses estudadas em comparação ao grupo controle. 5 rpm [CVC 12,5 mg/kg 118,5±0,8534 (8); CVC 25 mg/kg 119,2±0,4353 (8); CVC 50 mg/kg 118,6±0,5710 (8); cont.: 119,0±0,3803 (8)] (**Figura 14**). 15 rpm [CVC 12,5 mg/kg 116,7±0,7656 (8); CVC 25 mg/kg 117,1±0,6213 (8); CVC 50 mg/kg 117,4±0,4481(8); cont.: 116,8±0,9683(8)] (**Figura 15**). 40 rpm [CVC 12,5 mg/kg 84,97±2,529 (8); CVC 25 mg/kg 89,04±1,851 (8); CVC 50 mg/kg 89,52±3,742 (8); cont.: 85,84±3,264 (8)] (**Figura 16**). O diazepam foi usado como padrão positivo e diminuiu significativamente o tempo de permanência na barra nas três rotações estudadas. 5 rpm [DZP-2: 94,13±4,696 (8)]; 15 rpm [DZP-2: 93,00±4,166 (8)]; 40 rpm [DZP-2: 71,75±4,419 (8)] (**Figuras 14, 15 e 16**).



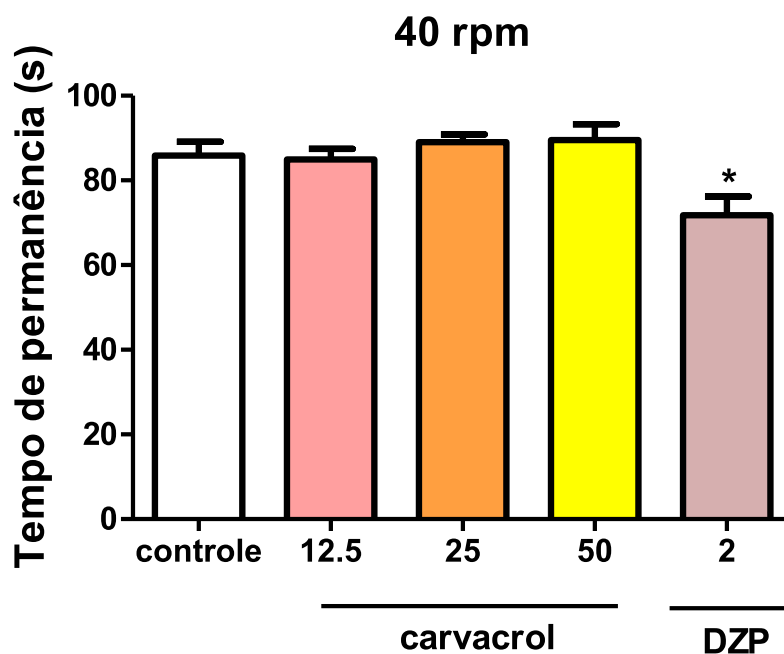
**Figura 14 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 5 rpm, no teste do rota rod em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de permanência na barra giratória durante 2 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.



**Figura 15 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 15 rpm, no teste do rota rod em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de permanência na barra giratória durante 2 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.



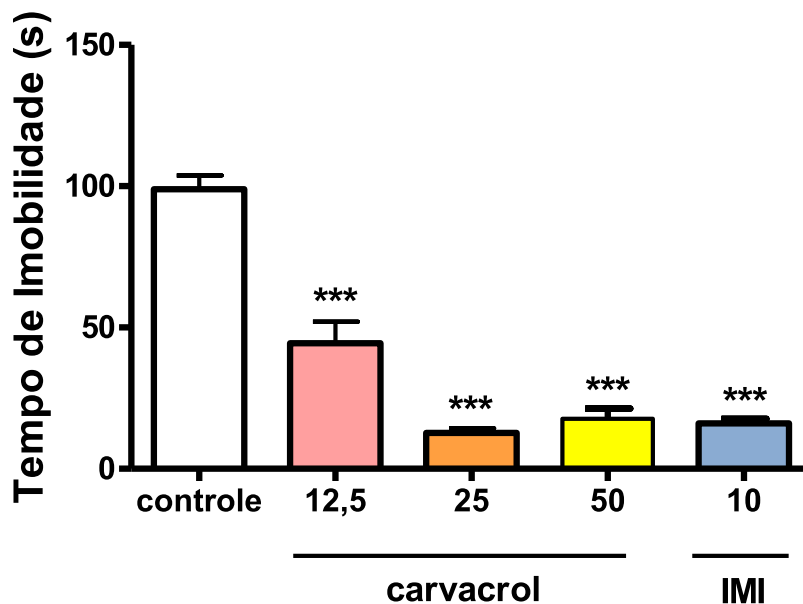
**Figura 16 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 40 rpm, no teste do rota rod em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de permanência na barra giratória durante 2 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$  vs controle.

### 5.3 Avaliação da Atividade Antidepressiva

#### 5.3.1 Teste do Nado Forçado

Neste teste, carvacrol, por via oral, diminuiu o tempo de imobilidade nas três doses estudadas (12,5; 25 e 50 mg/kg) em comparação ao grupo controle [CVC 12,5 mg/kg  $44,50 \pm 7,607$  (8); CVC 25 mg/kg  $12,70 \pm 1,630$  (8); CVC 50 mg/kg  $17,74 \pm 3,587$  (8); cont.:  $98,88 \pm 4,987$  (8)]. A imipramina (10mg/kg i.p.) é utilizada como droga padrão neste teste e diminuiu significativamente o tempo de imobilidade se comparado ao grupo controle [IMI  $16,08 \pm 1,603$  (8)] (**Figura 17**).



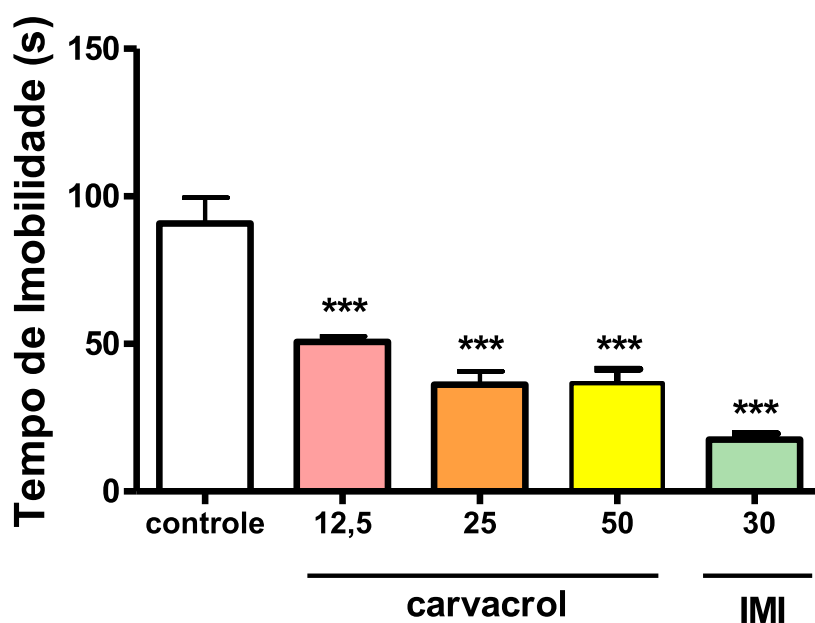
**Figura 17 - Efeito do carvacrol e imipramina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), imipramina (IMI; 10 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### 5.3.2 Teste da Suspensão da Cauda

No teste da suspensão da cauda, carvacrol por via oral diminuiu o tempo de imobilidade nas três doses estudadas em comparação ao grupo controle [CVC 12,5 mg/kg  $50,64 \pm 1,899$  (9); CVC 25 mg/kg  $36,21 \pm 4,538$  (8); CVC 50 mg/kg  $36,64 \pm 4,786$  (7); cont.:  $90,86 \pm 8,678$  (11)]. A imipramina (30 mg/kg i.p.) é utilizada como droga padrão e diminuiu significativamente o tempo de imobilidade se comparado ao grupo controle [IMI  $17,57 \pm 1,984$  (7)] (**Figura 18**).





**Figura 18 - Efeito do carvacrol e imipramina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste da suspensão da cauda em camundongos.**

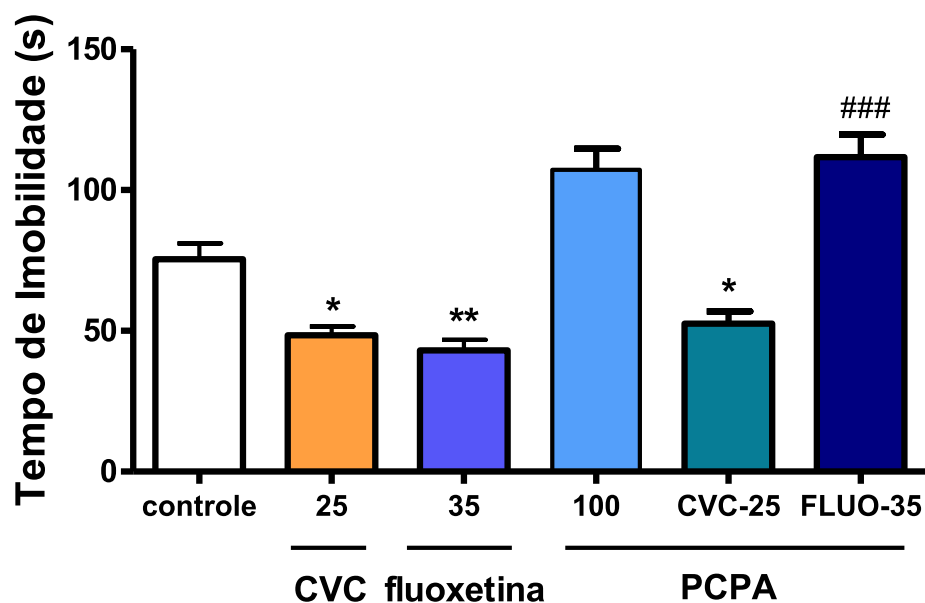
Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), imipramina (IMI; 30 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### 5.3.3 Investigação do possível mecanismo envolvido no efeito antidepressivo do carvacrol no teste do nado forçado

Visto que a dose de 25 mg/kg foi a dose que apresentou melhor potencial antidepressivo, todos os experimentos seguintes foram realizados utilizando esta dose.

#### 5.3.3.1 Envolvimento do sistema serotoninérgico

**Fig 19** mostra que o pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos), um inibidor da síntese de 5-HT, não afetou o efeito antidepressivo do carvacrol (25 mg/kg v.o.), mas reverteu a ação antidepressiva da fluoxetina (35 mg/kg, i.p.), comparada ao grupo controle [controle:  $75,50 \pm 5,622$  (8); CVC 25:  $48,48 \pm 3,079$  (7); FLU-35:  $43,02 \pm 3,778$  (10); PCPA:  $107,1 \pm 7,583$  (10); CVC-25+PCPA:  $52,57 \pm 4,368$ (10); FLU-35+PCPA:  $111,7 \pm 7,978$ (10)].

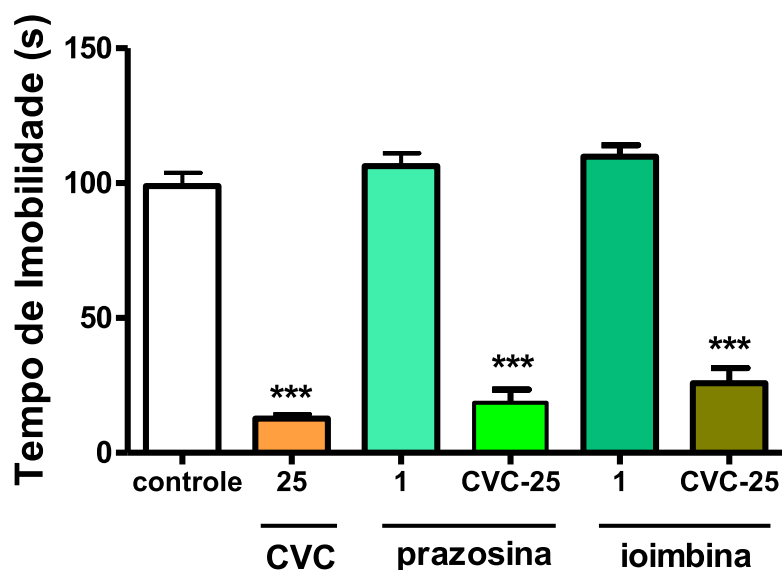


**Figura 19 - Efeito do carvacrol e fluoxetina, sozinhos ou associados ao PCPA sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC 25 mg/kg, v.o.), fluoxetina (FLU; 35 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 30 min após administração de PCPA (PCPA 100 mg/kg, i.p.) e 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) min depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs controle; ### $p < 0,001$  vs FLUO-35.

### 5.3.3.2 Envolvimento do sistema noradrenérgico

Os resultados mostrados na **Fig. 20** revelam que o pré-tratamento dos animais com o antagonista de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  prazosina (1mg/kg. i.p.) e com o antagonista de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  ioimbina (1mg/kg) não foi capaz de reverter o efeito antidepressivo de carvacrol (25 mg/kg, v.o.) no teste do nado forçado, comparado com o grupo controle [controle:  $98,88 \pm 4,987$  (8); CVC 25:  $12,70 \pm 1,630$  (8); PRZ-1:  $106,3 \pm 4,770$  (9); IOIM-1:  $109,8 \pm 4,329$  (9); CVC-25+PRZ-1:  $18,53 \pm 4,871$  (8); CVC25+IOIM1:  $25,83 \pm 5,581$  (8)].

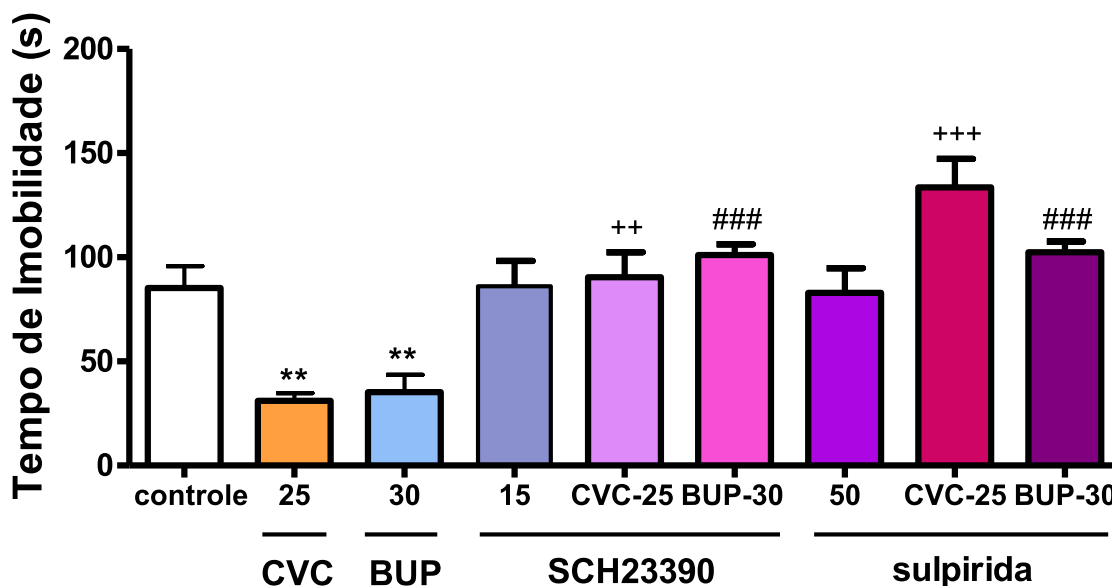


**Figura 20 - Efeito do carvacrol associado a prazosina ou ioimbina sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo) e carvacrol (CVC 25 mg/kg, v.o.) foram administrados 60 min (v.o.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 30 min após administração de prazosina (PRZ 1 mg/kg, i.p.) ou ioimbina (IOIM 1 mg/kg, i.p.) e 60 min depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### 5.3.3.3 Envolvimento do sistema dopaminérgico

A **Fig. 21** demonstra que o pré-tratamento dos animais com SCH23390 (0,05 mg/kg, i.p.), um antagonista dos receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos e sulpirida (50 mg/kg, i.p.), um antagonista dos receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos reverteu significativamente o efeito antidepressivo do carvacrol (25 mg/kg, i.p.) e da bupropiona (30 mg/kg, i.p.), em comparação ao grupo controle [controle: 85,24±10,47 (8); CVC 25: 31,10±3,657 (7); Sulp-50: 82,95±11,86 (8); SCH-0,05: 86,06±12,21 (7); BUP-30: 35,29±8,294 (7); CVC-25+Sulp-50: 133,5±13,71 (10); CVC-25+SCH-0,05: 90,49±11,91 (7); BUP-30+Sulp-50: 102,4±5,137 (8); BUP-30+SCH-0,05: 101,0±5,220 (8)].



**Figura 21 - Efeito do carvacrol e bupropiona associados a sulpirida ou SCH23390 sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC 25 mg/kg, v.o.) e bupropiona (BUP 30 mg/kg i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento. Quando associados, foram administrados 30 min após administração de sulpirida (SULP 50 mg/kg, i.p.) ou SCH 23390 (SCH 0,05 mg/kg, i.p.) e 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\* $p < 0,01$  vs controle; ++ $p < 0,01$ ; +++ $p < 0,001$  vs CVC-25; ### $p < 0,001$  vs BUP-30.

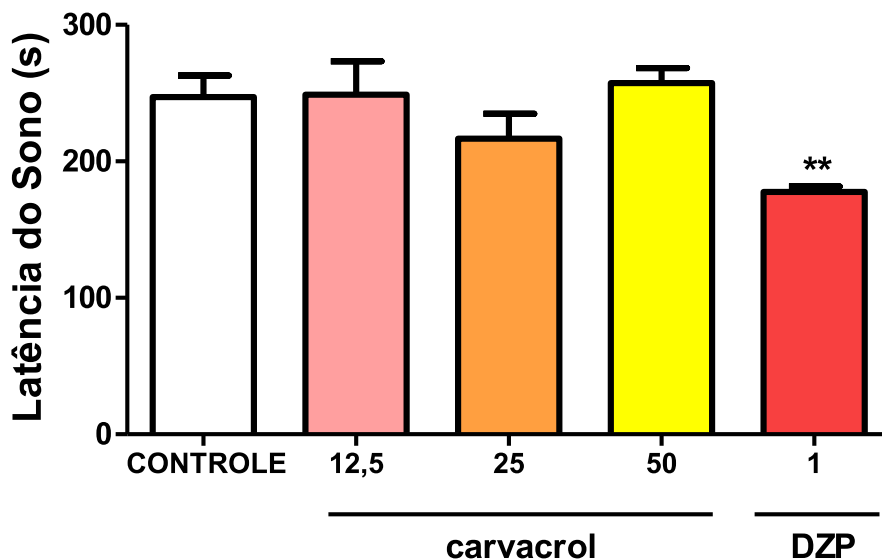
## 5.4 Avaliação da Atividade Sedativo/Hipnótica a Anticonvulsivante

### 5.4.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

Uma hora após o tratamento com carvacrol (12,5; 25 e 50 mg/kg), veículo ou diazepam (1mg/kg), é administrado aos animais pentobarbital (40 mg/kg) intraperitonealmente. A latência e a duração do sono são os parâmetros utilizados neste teste. Carvacrol não alterou significativamente estes parâmetros nas três doses estudadas em comparação ao grupo controle.

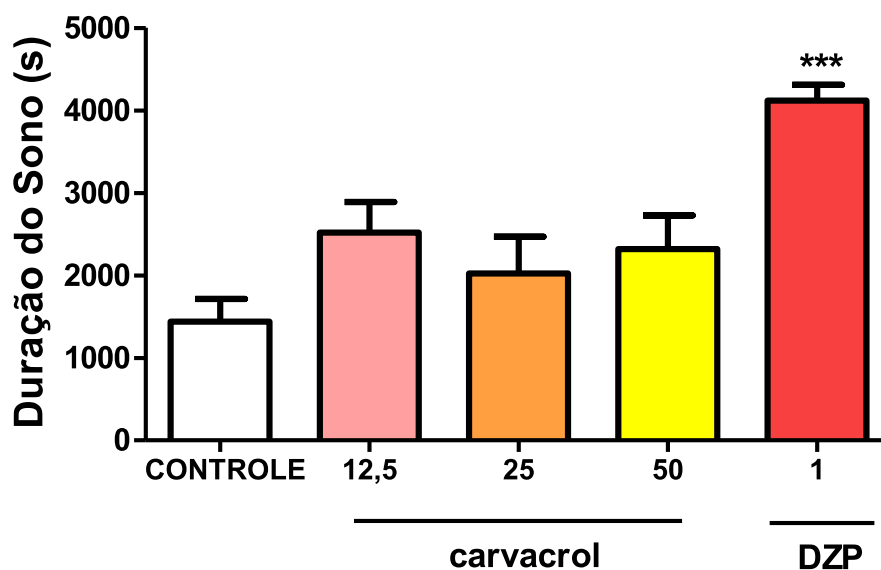
Latência [CVC 12,5 mg/kg 249,0±24,33 (7); CVC 25 mg/kg 216,5±18,27 (10); CVC 50 mg/kg 257,4±11,06 (7); cont.: 247,2±15,62 (9)]. **(Figura 22)**. Duração do sono [CVC 12,5 mg/kg 2520±370,4 (8); CVC 25 mg/kg 2023±447,4 (7); CVC 50 mg/kg 2321±406,6 (9); cont.: 1441±272,8 (8)] **(Figura 23)**. O diazepam, usado como padrão positivo, diminuiu a latência e aumentou o tempo de sono significativamente em relação ao grupo controle. Latência [DZP-1: 177,7±4,042 (10)]; Tempo de sono [DZP-1: 4118±192,8 (10)] **(Figuras 22 e 23)**.





**Figura 22 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre a latência de sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da latência do sono (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\* $p < 0,01$  vs controle.



**Figura 23 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre a duração do sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.**

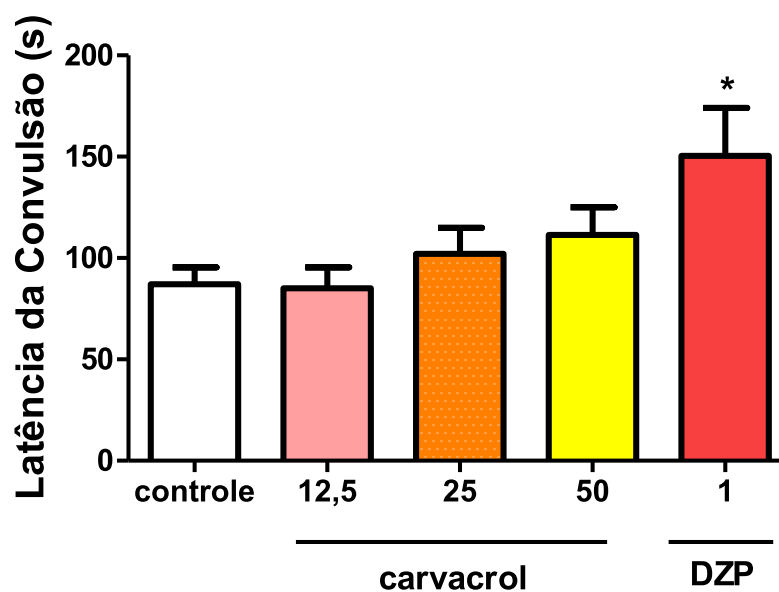
Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da duração do sono (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

#### 5.4.2 Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol

No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol foram avaliados a latência da convulsão (LC), em segundos, a latência de morte (LM), em segundos, e a porcentagem de sobrevivência. Os animais tratados com carvacrol, via oral, nas doses de 12,5; 25 e 50 não apresentaram alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados (**Figuras 24 e 25; Tabela 7**).

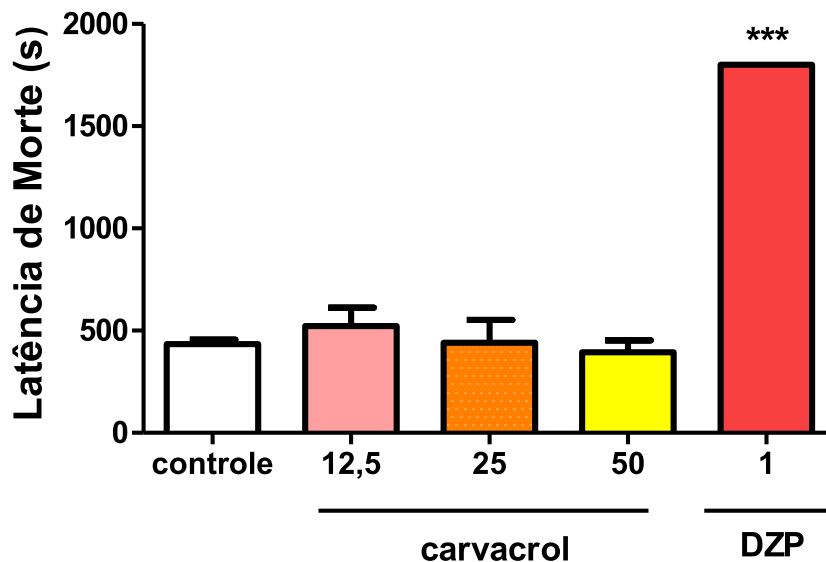
O diazepam 1 mg/kg, usado como padrão positivo, aumentou a latência da convulsão [DZP-1:  $150,4 \pm 23,73$  (7)] comparado ao grupo controle [cont.:  $87 \pm 8,462$  (9)] (**Figura 24; Tabela 7**).

A porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com carvacrol por via oral nas três doses estudadas foi de 0. Entretanto, 100% dos animais tratados com diazepam sobreviveram (**Figura 25; Tabela 7**).



**Figura 24 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre a latência da convulsão (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da latência da convulsão (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \* $p < 0,05$  vs controle.



**Figura 25 - Efeito do carvacrol e diazepam sobre a latência de morte (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.**

Controle (veículo), carvacrol (CVC-12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.), diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (via i.p.) antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da latência de morte (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

**Tabela 3 – Efeito da administração oral de carvacrol e diazepam nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos**

<i>Grupo (mg/kg)</i>	<i>Latência da convulsão (s)</i>	<i>Latência de morte (s)</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
Controle	87±8,462 (9)	434,8±21,22 (9)	0
CVC-12,5	85,14±10,21 (7)	522,3±90,03 (7)	0
CVC-25	102±12,86 (7)	441,6±111,2 (7)	0
CVC-50	111,3±13,75 (9)	393,7±58,14 (9)	0
DZP-1	150,4±23,73 (7)*	-	100

Os valores representam a média  $\pm$  EPM da latência da convulsão e latência de morte. O número de animais está representado entre parêntese. Para análise estatística foi realizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls com teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,05$  vs controle.

## **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).

Baseado em tais estudos, este trabalho apresenta uma investigação das possíveis ações centrais do carvacrol. Para isto, os efeitos do carvacrol foram estudados utilizando-se vários modelos de comportamento animal, tais como o labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, *rota rod*, tempo de sono induzido por pentobarbital, nado forçado, suspensão da cauda e convulsão induzida por pentilenotetrazol. Estes testes são modelos clássicos para *screening* de atividades no sistema nervoso central, fornecendo informações sobre desempenho psicomotor, ansiolítico, antidepressivo atividade miorelaxante, sedativo/hipnótica, e anticonvulsivante (de-PARIS et al., 2000; SOUSA et al., 2004).

É comumente aceito que o estresse, a ansiedade e a depressão são fenômenos relacionados. O estresse é tipicamente implicado na etiologia da depressão e ansiedade ou como consequência de tais desordens, levando em consideração o fato de que a maior fonte de estímulos estressantes em humanos é de natureza social (ANISMAN; ZACHARKO, 1982; BROWN, 1996; PALANZA, 2001). Devido a esta correlação entre transtornos de humor em humanos e estresse social, os modelos animais de ansiedade e depressão são baseados na exposição dos animais a condições estressantes (PALANZA, 2001).

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi originalmente desenvolvido por Pellow e colaboradores (1985a) e se tornou um modelo para o estudo do comportamento de ansiedade em ratos e, subsequentemente, em camundongos (LISTER, 1987; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009; BUCKMAN et al., 2009; GRUNDMANN et al., 2009). É baseado na aversão natural que os roedores apresentam a áreas abertas e elevadas (CAROLA et al., 2002; RABBANI et al., 2008; RAUPP et al., 2008), sendo o



teste mais utilizado para a procura de novos agentes ansiolíticos semelhantes a benzodiazepínicos (PELLOW et al., 1985b; LAPIN, 1995; CHEN et al., 2004).

Este teste apresenta algumas vantagens se comparado a outros modelos animais de ansiedade. É de fácil manuseio, econômico, rápido e não é necessário fazer um treino prévio com os animais (TORRES; ESCARABAJAL, 2002). Durante o teste do LCE, os roedores são normalmente cautelosos ao explorar os espaços abertos. Após uma exploração inicial geral, os animais evitam os espaços abertos e tendem a permanecer nos dois braços fechados do labirinto (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000). Sabendo de tal fato, observou-se que a diminuição na ocupação dos braços abertos e a redução do número de entradas nos braços abertos, em relação ao número total de entradas, é indicativo de um estado de ansiedade. Esse comportamento é atenuado pelo uso de drogas ansiolíticas e exacerbado pelo uso de drogas ansiogênicas (SONAVANE et al., 2002; BUCKMAN et al., 2009).

No presente estudo, o diazepam na dose de 1 mg/kg foi utilizado como padrão positivo e, como esperado, produziu significativo aumento em todos os parâmetros analisados. Estes parâmetros são o número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentual do número de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA). Isto indica que o diazepam provocou um comportamento ansiolítico nos animais, pois diminuiu o medo natural a espaços desprotegidos e elevados. O carvacrol foi administrado por via oral nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg e, assim como o diazepam, aumentou significativamente todos os parâmetros analisados, sugerindo um efeito ansiolítico similar ao diazepam.

Como dito anteriormente o LCE é o teste mais utilizado para a procura de novos agentes ansiolíticos semelhantes a benzodiazepínicos (PELLOW et al., 1985b; CHEN et al., 2004). O mecanismo de ação dos fármacos benzodiazepínicos é bem descrito na literatura. Estas drogas são moduladores alostéricos do ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $GABA_A$ ), que resulta em aumento da hiperpolarização da célula (SONAVANE et al., 2002; DALVI; RODGERS, 1996; SCHMIDT-MUTTER et al., 1998). O flumazenil é um reconhecido antagonista do receptor benzodiazepínico e foi utilizado no presente trabalho para esclarecer o possível mecanismo pelo qual o carvacrol está atuando no LCE. Para este teste, foi escolhida a dose de 25 mg/kg do carvacrol, por ser a dose que

apresentou uma ação ansiolítica mais significativa no LCE. Os resultados mostraram que o flumazenil reverteu não apenas o efeito ansiolítico do diazepam, mas também o efeito ansiolítico do carvacrol, indicando que as duas substâncias podem apresentar um mecanismo de ação similar. Desta forma, é possível que a atividade ansiolítica do carvacrol esteja relacionada com uma ação no receptor GABA<sub>A</sub>/ Benzodiazepínico.

De acordo com a literatura, os benzodiazepínicos, tais como diazepam, apresentam efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes em doses mais baixas e, em doses mais altas, produzem também sedação e relaxamento muscular (ONAIVI et al., 1992; WOLFFGRAMM et al., 1994). É por esta razão que no presente trabalho foram utilizadas doses de 1 mg/kg de diazepam para os testes do LCE e convulsão induzida por pentilenotetrazol. Já nos testes do campo aberto, *rota rod* e tempo de sono induzido por pentobarbital, foram utilizados doses de diazepam de 2mg/ kg.

Alguns autores sugerem que substâncias que alteram a atividade locomotora podem atuar no teste do LCE fornecendo um resultado falso-positivo (SILVA et al., 2007; GOMES et al., 2008). Para confirmar este resultado do efeito ansiolítico per si e não de alteração da atividade locomotora pelo carvacrol foi realizado o teste do campo aberto, que é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. Neste teste, é observado que roedores tem uma tendência natural a permanecer na periferia ao explorar um ambiente novo (ARCHER, 1973; CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002). Efeitos ansiolíticos são observados quando o animal passa mais tempo no centro do aparelho, na ausência de alterações concomitantes na atividade locomotora geral (MENARD; TREIT, 1999). 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.

Estudos sugerem que uma redução do número de *rearing e grooming* está associado a um comportamento de ansiedade, que é atenuado por drogas ansiolíticas e potencializado por agentes ansiogênicos (NOVAS et al., 1988; BHATTACHARYA, 1994). Tal afirmativa é controversa, visto que alguns autores sugerem que agentes ansiolíticos tendem a diminuir o número de *grooming e rearing* (STOUT; WEISS, 1994; BARROS et al., 1994).

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 25 e 50 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 apresenta uma ação ansiolítica não sedativa, pois não alterou a atividade locomotora ou o número de *rearing* e diminuiu o número de *grooming* nas doses de 25 e 50 mg/kg. Já o diazepam alterou todos os três parâmetros analisados, o que confirma a suas propriedades ansiolítica e sedativa.

Com a intenção de confirmar a ação não sedativa do carvacrol, foi realizado o teste do tempo de sono induzido por pentobarbital. Já é bem descrito na literatura que a diminuição da latência do sono e a potencialização da duração do sono, observados com o uso do pentobarbital, ocorrem devido a propriedades sedativas e hipnóticas envolvidas com mecanismos centrais de regulação do sono (ACHLIYA et al., 2004).

Este é um teste considerado sensível para agentes depressores do SNC (HELLION-IBARROLA et al., 1999), embora não seja específico pois compostos que interferem com a biotransformação do pentobarbital pelo complexo enzimático do citocromo P-450 podem apresentar os mesmo efeitos de drogas depressoras do SNC (de-PARIS et al., 2000). Desta forma, uma alteração dos parâmetros estudados neste teste pode indicar tanto um prolongamento da ação sedativo-hipnótica do pentobarbital devido a uma alteração do seu metabolismo ou um efeito de sinergismo do pentobarbital com uma droga também depressora do SNC.

O carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg não alterou os parâmetros latência de sono e duração do sono, o que é mais uma evidência de que esta substância não apresenta ação sedativa. Em contrapartida, o diazepam na dose de 1 mg/kg diminuiu a

latência de sono e aumentou a duração do sono, o que está de acordo com o seu potencial sedativo e hipnótico.

Dando continuidade a investigação dos efeitos do carvacrol que demonstrou no LCE atividade ansiolítica similar ao diazepam resolvemos analisar os efeitos do carvacrol na coordenação motora, considerando que drogas como o diazepam apresentam efeito ansiolítico, mas em doses mais altas alteram a coordenação motora.

Quando um roedor é colocado repetidamente em um cilindro em rotação constante, o animal rapidamente se adapta à rotação. Entretanto, após a administração de um depressor do SNC, o animal facilmente cai da haste giratória. Este processo é chamado de teste do *rota rod* e foi desenvolvido por Dunham e Miya (1957). Com a finalidade de avaliar uma possível atividade miorelaxante do carvacrol, foi utilizado o teste do *rota rod*, um modelo animal clássico usado para determinar o efeito de drogas na coordenação motora de roedores (KURIBARA et al., 1977; BOHLEN et al., 2009).

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 nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg não apresenta bloqueio neuromuscular periférico, diferenciando-se do diazepam, que na dose de 2 mg/kg apresenta um conhecido efeito relaxante muscular.

Pentilenotetrazol (PTZ) é um agente farmacêutico que apresenta atividade como estimulante do sistema nervoso central. É considerado um antagonista não-competitivo do ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $GABA_A$ ), agindo nos canais de cloreto e bloqueando a ação inibitória central do neurotransmissor GABA, provocando crise convulsiva tônico-clônica generalizada. O PTZ afeta também os sistemas neurotransmissores adenosinérgico e glutamatérgico (PATSOUKIS et al., 2004). Outros estudos demonstraram que o PTZ pode atuar alterando a permeabilidade da membrana celular ao potássio, através de um mecanismo dependente de voltagem (ROCHA et al., 1996).

O PTZ tem sido utilizado experimentalmente em modelos de convulsão em animais, visando a descoberta de novos agentes anticonvulsivantes (LOWSON et al., 1991).

Em geral, a eficácia dos agentes anticonvulsivantes está relacionada à potenciação de mecanismos inibitórios centrais (como o sistema GABAérgico) ou à inibição de mecanismos excitatórios centrais (sistema glutamatérgico). Além disso, tais compostos podem agir inibindo a excessiva descarga da membrana via canais de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{1+}$  e  $K^{1+}$ . Muitos desses agentes possuem múltiplas ações, contribuindo para a sua eficácia (MALAWSKA, 2003).

Baseado na possível ação do carvacrol a nível de sistema gabaérgico, decidimos investigar os efeitos desta droga no modelo de convulsão induzida por PTZ. Neste teste, os parâmetros analisados foram a latência da convulsão e a latência de morte. O carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg não alterou nenhum destes parâmetros. O diazepam (1 mg/kg), utilizado como padrão positivo, aumentou a latência da convulsão e obteve 100% de sobrevivência dos animais. Este efeito se deve à sua ação no receptor  $GABA_A$ /Benzodiazepínico, sendo um fármaco com conhecida ação anticonvulsivante.

Apesar de o carvacrol ter apresentado uma possível interação com o receptor  $GABA_A$ /Benzodiazepínico, visualizado no teste do labirinto em cruz elevado, não proporcionou uma ação anticonvulsivante no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol.

Como já foi observado, o receptor  $GABA_A$  é um canal iônico regulado por ligante formado por diferentes subunidades (FEREN et al., 2006; KATZUNG, 2008). Foi proposto que os receptores  $GABA_A$  contendo diferentes subunidades apresentam diferentes distribuições no cérebro, resultando em diferentes propriedades fisiológicas quando ativados. Estudos utilizando camundongos “knock in” e “knock out” sugerem que as propriedades sedativas, anticonvulsivantes e amnésicas dos benzodiazepínicos são conferidas por receptores  $GABA_A$  que contêm subunidades  $\alpha_1$ . Outros estudos sugerem que as propriedades amnésicas dos benzo Diazepínicos também parecem estar relacionadas à presença de subunidades  $\alpha_5$ . Já as ações ansiolíticas e miorelaxantes dos benzodiazepínicos estão associados a receptores  $GABA_A$  que contêm subunidades  $\alpha_2$ . Outros autores também associam a presença da subunidade  $\alpha_3$  com efeitos ansiolíticos (CHRISTMAS et al., 2008).

De acordo com tais estudos, podemos sugerir que o fato do carvacrol ter apresentado ações ansiolíticas sem apresentar efeitos sedativos, miorelaxantes ou

anticonvulsivantes pode estar relacionado à sua interação com receptores GABA<sub>A</sub> que contêm subunidades que estejam associadas a efeitos ansiolíticos, mas que não estejam relacionados com ações sedativas, miorrelaxantes ou anticonvulsivantes.

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; HENNINGSEN et al., 2009).

Os testes da suspensão da cauda e do nado forçado são modelos animais amplamente empregados para a investigação de atividade antidepressiva (LUO et al., 2000; YAN et al., 2004; BASSO et al., 2009; FRANKOWSKA et al., 2007). São testes que apresentam facilidade de uso, confiabilidade, especificidade e sensibilidade ao uso agudo de antidepressivos (CRYAN et al., 2002; DUARTE et al., 2007).

Nestes testes, os animais são submetidos a um estresse o qual não é possível escapar. Após um período de luta inicial, os animais se tornam imóveis, assemelhando-se a um estado de desespero e depressão mental (MAO et al., 2008). Embora a relação entre a imobilidade observada nestes dois testes e a depressão em humanos permaneça controversa, uma grande variedade de compostos antidepressivos e compostos que apresentam potencial antidepressivo reduzem o tempo de imobilidade nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado (BILKEI-GORZO et al., 2002; DHIR & KULKARNI, 2007; YAO et al., 2009). Neste sentido, um estudo prévio mostrou que uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste do nado forçado foi observado em ratos geneticamente modificados que apresentavam supressão da enzima monoamino oxidase (MAO) (CASES et al., 1995).

Outro teste utilizado para investigar drogas com potencial antidepressivo é o teste da suspensão da cauda. Este teste baseia-se no fato de que camundongos, quando suspensos pela cauda a uma altura considerável, alternam entre períodos de atividade (luta inicial) e imobilidade (passividade), refletindo um estado de “desespero comportamental” (PORSOLT et al., 1978). Neste teste, os animais foram considerados imóveis quando demonstraram passividade e nenhum tipo de movimento. Drogas antidepressivas tendem a diminuir o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda, caracterizando um aumento do comportamento de luta.

Os resultados do presente trabalho mostraram que os animais tratados com carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda, fato observado também com o uso da imipramina (30 mg/kg), um antidepressivo tricíclico usado como padrão positivo. Este resultado sugere que o carvacrol apresenta atividade antidepressiva.

Para confirmar essa possível atividade, foi realizado o teste do nado forçado. Este teste também é baseado no “desespero comportamental”, onde os animais são forçados a nadar em um espaço confinado (MORA et al., 2005; SAKI et al., 2009). Neste teste, drogas antidepressivas diminuem o tempo de imobilidade, aumentando o tempo de nado e o comportamento de luta ante o estresse (PALANZA, 2001; WANG et al., 2009). No teste do nado forçado, os camundongos foram considerados imóveis quando não demonstraram nenhuma tentativa de escapar, apresentando apenas movimentos necessários para manter sua cabeça fora da água.

O teste do nado forçado parece ser mais sensível que o teste da suspensão da cauda, pois é observado que doses menores de drogas antidepressivas, como a imipramina, são suficientes para demonstrar uma ação antidepressiva (THIERRY et al., 1986; CRYAN et al., 2005).

Os resultados deste trabalho mostraram que os animais tratados com carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg tiveram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade, confirmando a ação antidepressiva observada no teste da suspensão da cauda. A imipramina (10 mg/kg), um antidepressivo tricíclico, foi usada como padrão positivo e também apresentou uma diminuição no tempo de imobilidade.

Assim como em relação ao teste do LCE, substâncias que alteram a atividade locomotora podem ocasionar um resultado falso/positivo nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado, onde a diminuição do tempo de imobilidade estaria relacionada ao uso de um agente estimulante do sistema nervoso central (YU et al., 2002; YAO et al., 2009; LAMBÁS-SEÑAS et al., 2009). Como foi visto anteriormente, o carvacrol não alterou a atividade locomotora dos animais tratados com as doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg. Esse resultado sugere que a diminuição do tempo de imobilidade provocado pelo carvacrol nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado não está

relacionado com um aumento da atividade locomotora, mas sim com uma ação antidepressiva.

Como visto anteriormente, os efeitos do carvacrol foram estudados em dois modelos animais de depressão, o teste da suspensão da cauda e o teste do nado forçado. Após observar um possível efeito antidepressivo do carvacrol nesses testes, foi investigado o envolvimento do sistema monoaminérgico nessa ação antidepressiva.

Para isso, foi utilizado o teste do nado forçado e a administração combinada do carvacrol com antagonistas específicos de receptores das principais monoaminas envolvidas na fisiopatologia da depressão. As drogas usadas foram a prazosina (1 mg/kg, um antagonista  $\alpha_1$ - adrenérgico), ioimbina (1 mg/kg, um antagonista  $\alpha_2$ - adrenérgico), SCH23390 (0.5 mg/kg, um antagonista  $D_1$  dopaminérgico), sulpirida (50 mg/kg, um antagonista  $D_2$  dopaminérgico) e para-cloro-fenilalanina (100 mg/kg, um inibidor da síntese de serotonina), também conhecido como PCPA. A dose de carvacrol escolhida para estes testes foi a de 25 mg/kg, por ter sido a dose que apresentou efeito mais significativo nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado.

A hipótese monoaminérgica, baseada na deficiência funcional de uma ou mais monoaminas transmissoras, é comumente evocada para explicar a fisiopatologia da depressão (KULKARNI et al., 2008; MACHADO et al., 2009; ELHWUEGI, 2004). Esta hipótese foi inicialmente baseada na deficiência de noradrenalina e serotonina, sendo posteriormente considerada a importância da dopamina (MACHADO et al., 2008; POSSER et al., 2009). A maioria dos antidepressivos usados corriqueiramente exercem seus efeitos primários através da regulação das concentrações sinápticas desses neurotransmissores (ANDREASEN et al., 2009, MACHADO et al., 2009).

O PCPA, um inibidor da enzima triptofano-hidroxilase, foi administrado por quatro dias consecutivos, na dose de 100 mg/kg. Estudos tem demonstrado que a administração de PCPA em camundongos depleta os estoques endógenos de serotonina em 60%, sem alterar os níveis de noradrenalina e dopamina (REDROBE et al., 1998; WANG et al., 2008).

No nosso estudo, o pré-tratamento dos animais com PCPA não alterou a atividade antidepressiva do carvacrol no teste do nado forçado. Entretanto, o pré-tratamento com PCPA impediu completamente a ação antidepressiva da fluoxetina, que



foi a droga usada como padrão positivo, por ser um conhecido antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Este resultado sugere que a ação antidepressiva do carvacrol no teste do nado forçado não está envolvida com a ativação central de receptores serotoninérgicos.

Para a avaliação do envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antidepressivo do carvacrol, os animais foram pré-tratados com a prazosina, um antagonista dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ou com a ioimbina, um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, e posteriormente tratados com o carvacrol. Os resultados demonstraram que tanto a prazosina quanto a ioimbina não foram capazes de reverter o efeito antidepressivo do carvacrol no teste do nado forçado. Este resultado sugere que a ação antidepressiva do carvacrol não está envolvida com a ativação central de receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos.

Para verificar se o mecanismo de ação do efeito antidepressivo do carvacrol no teste do nado forçado está envolvido com o sistema dopaminérgico, os animais foram pré-tratados com o SCH23390, um antagonista dos receptores  $D_1$  dopaminérgicos ou com a sulpirida, um antagonista dos receptores  $D_2$  dopaminérgicos, e posteriormente tratados com o carvacrol. Os resultados mostraram que tanto o SCH23390 quanto a sulpirida foram capazes de reverter o efeito antidepressivo do carvacrol no teste do nado forçado.

Da mesma forma, o pré-tratamento dos animais com SCH23390 ou com sulpirida bloqueou a ação antidepressiva da bupropiona, um antidepressivo atípico com potente ação inibidora da recaptação de dopamina e, em menor grau, de noradrenalina. Estas evidências sugerem que o efeito antidepressivo do carvacrol nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado pode estar envolvido com a ativação de receptores  $D_1$  e  $D_2$  dopaminérgicos.

Diversos estudos têm demonstrado um envolvimento da dopamina na fisiopatologia da depressão. Sabe-se que drogas que aumentam os níveis de dopamina, como cocaína e anfetamina, produzem uma exaltação do humor, enquanto drogas que reduzem os níveis de dopamina, como a reserpina, ou drogas que bloqueiam os receptores dopaminérgicos, como os neurolépticos, podem produzir disforia e depressão (D'AQUILA et al., 2000).

Além disso, neurônios dopaminérgicos originados na área ventral tegumentar e projetados no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens, estão envolvidos na sensação de motivação e recompensa (PLANETA; CRUZ, 2005). Estudos têm demonstrado que o uso de agonistas dopaminérgicos tem um efeito antidepressivo em modelos animais de depressão (BASSO et al., 2005).

Através dos experimentos comportamentais apresentados, demonstrou-se que o carvacrol exibiu efeitos ansiolíticos sem exprimir uma ação sedativa/hipnótica ou relaxante muscular. Em contrapartida, o carvacrol não apresentou ação anticonvulsivante, por não alterar a convulsão induzida por PTZ. Na depressão, o carvacrol exibiu ação antidepressiva que não parece estar relacionada com a neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica, mas com a transmissão dopaminérgica, através da estimulação dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>.

Este estudo fornece evidências experimentais para a eficácia terapêutica do carvacrol para o tratamento de desordens psiquiátricas, como a ansiedade e depressão. Entretanto, é necessário verificar os níveis de monoaminas, assim como seus respectivos metabólitos, em animais pré-tratados com o carvacrol, através da técnica do HPLC. Também é necessária a realização de estudos da interação droga-receptor, através do método do binding, para confirmar os possíveis mecanismos de ação do carvacrol sugeridos neste trabalho.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

---

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos efeitos da administração aguda de carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg em modelos animais de ansiedade, depressão, atividade locomotora, sedação e convulsão levou às seguintes considerações:

- ✓ No teste do campo aberto, carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais. As doses de 25 e 50 mg/kg diminuíram o número de *grooming*. O comportamento de *grooming* pode estar associado com a estimulação de receptores dopaminérgicos, o que sugere que o carvacrol possa agir ativando tais receptores.
- ✓ No teste do labirinto em cruz elevado, carvacrol nas três doses estudadas aumentou todos os parâmetros analisados, sugerindo uma possível ação ansiolítica.
- ✓ O mecanismo de ação ansiolítico do carvacrol parece estar relacionado com o receptor GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico, pois no teste do labirinto em cruz elevado a ação ansiolítica do carvacrol foi revertida pelo flumazenil, um já conhecido antagonista deste receptor.
- ✓ No teste do *rota rod*, a coordenação motora dos animais não foi alterada, sugerindo que o carvacrol nas doses estudadas não apresenta efeito miorrelaxante.
- ✓ No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, carvacrol nas três doses estudadas não alterou nenhum dos parâmetros analisados, sugerindo que a substância não apresenta efeito sedativo/hipnótico.
- ✓ No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg não alterou as latências de convulsão e de morte, não apresentando ação anticonvulsivante.

- ✓ Nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, carvacrol nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg apresentou efeito antidepressivo. Este efeito foi confirmado pelo teste do campo aberto, descartando-se hiperatividade, pois carvacrol não alterou a atividade locomotora espontânea neste teste.
  
- ✓ O mecanismo de ação antidepressivo do carvacrol, analisado no teste do nado forçado, parece estar envolvido com o sistema dopaminérgico, possivelmente pela ativação dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>.

**CONCLUSÃO**

---

---

## 8 CONCLUSÃO

Em suma, por meios dos experimentos comportamentais realizados, podemos sugerir que o carvacrol apresenta efeito ansiolítico, mas não apresenta efeito sedativo ou miorrelaxante. Este efeito ansiolítico está provavelmente relacionado com o sistema gabaérgico. Além disso, o carvacrol apresenta efeito antidepressivo, que parece estar relacionado com o sistema dopaminérgico, especificamente envolvendo os receptores  $D_1$  e  $D_2$ .

## **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.

ACHLIYA G.S.; WADODKAR S.G.; AVINASH K.D. Neuropharmacological actions of panchagavya formulation containing *Emblica officinalis* Gaerth and *Glycyrrhiza glabra* Linn in mice. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 42, p. 499-503, 2004.

AESCHBACH, R. *et al.* Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32, p. 31-36, 1994.

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.

ALI, A. *et al.* Evidence of the antiepileptic potential of amiloride with neuropharmacological benefits in rodent models of epilepsy and behavior. **Epilepsy Behav.**, v. 5, p. 322-328, 2004.

ALLEN, K.L. *et al.* Cannabinoid (CB<sub>1</sub>), GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. **J. Chem. Neuro.**, v. 37, p. 266-281, 2009

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.

ANISMAN, H.; ZACHARKO, R.M. Stimulus change influences escape performance: deficits induced by uncontrollable stress and by haloperidol. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 17, p. 263-269, 1982.

ANSSEAU, M. *et al.* Objective: remission of depression in primary care: The Oreon Study. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 19, p. 169-176, 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.

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.

BARROS, H. M. *et al.* The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 74, p. 339-344, 1994.

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.

BASSO, A.M. *et al.* Behavioral profile of P2X<sub>7</sub> receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: Relevance for neuropsychiatric disorders. **Behav. Brain Res.**, v. 198, p. 83-90, 2009.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 108, p. 197-203, 2000.

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

BHATTACHARYA, S. K. Behavioural studies on BR-16A (Mentat), a herbal psychotropic formulation. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 32, p. 37-43, 1994.

BILKEI-GORZO, A. *et al.* Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the *Tac1* gene. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 10046-10052, 2002.

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.

BOHLEN, M. *et al.* Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. **J. Neurosci. Methods**, v. 178, p. 10-14, 2009.

BONNET, U.; BINGMANN, D.; WIEMANN, M. Intracellular pH modulates spontaneous and epileptiform bioelectric activity of hippocampal CA3-neurons. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 97, p. 97-103, 2000.

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.

BROWN, G.W. Psychosocial factors and depression and anxiety disorders-some possible implications for biological research. **J. Psychopharmacol.**, v. 10, p. 23-30, 1996.

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

BUCKMAN, S. G. *et al.* Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. **Behav. Brain Res.**, v. 197, p. 454-456, 2009.

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. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 942, p. 223-253, 2004.

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.

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.

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 clorobenzapam. **Rev. Assoc. Bras. Psiquiatr.**, v.1, p. 25-31, 1979.

CAROLA, V. *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav. Brain Res.**, v. 21, p. 49-57, 2002.

CARVALHO-FREITAS, M. I.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 12, p. 1629-1633, 2002.

CASES, O. *et al.* Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. **Science**, v. 268, p. 1763-1766, 1995.

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

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.

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, 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.

CHEN, S.W. *et al.* Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. **Life Sci.**, v. 75, p. 1503-1511, 2004.

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.

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.

CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, v. 96, p. 440-447, 2009.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 335-344, 2005.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behavior in mice. **Psychopharmacology**, v. 128, p. 380-397, 1996.

D'AQUILA, P. S. *et al.* The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 405, p. 365-373, 2000.

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.

de-PARIS, F. *et al.* Osiopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng (Amaranthaceae) in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 261-269, 2000.

DESAI, C. K. *et al.* Comparative evaluation of anticonvulsant activity of calcium channel blockers in experimental animals. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 33, p. 931-940, 1995.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 568, p. 177-185, 2007.

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 D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-deficient mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 125-131, 1999.

DUARTE, F. S. *et al.* Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like action of two 4-amine derivatives of 10, 11-dihydro-5H-dibenzo [*a,d*] cycloheptane in mice evaluated in the tail suspension test. **Progress in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 32, p. 368-374, 2008.

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.

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.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 28, p. 435-451, 2004.

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.

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.

FRANKOWSKA, M.; FILIP, M.; PRZEGALINSKI, E. Effects of GABA<sub>B</sub> receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. **Pharmacol. Rep.**, v. 59, p. 645-655, 2007.

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.

GALOFRÉ, M.; BABOT, Z.; GARCÍA, D. A.; IRAOLA, S.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; FORSBY, A.; SUÑOL, C. GABA<sub>A</sub> 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.



GOMES, P. B. *et al.* Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.120, p. 209-214, 2008.

GRUNDMANN, O. *et al.* Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 295-302, 2009.

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.

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.

GUPTA, Y. K.; MALHOTRA, J. Antiepileptic drug therapy in the twenty-first century. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 44, p. 8-23, 2000.

HELLION-IBARROLA, M. C. *et al.* Acute toxicity and general pharmacological effect on central nervous system of the crude rhizome extract of *Kyllinga brevifolia* Rottb. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 271-276, 1999.

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.

HOENCAMP, E. *et al.* A 3.5-year naturalistic follow-up study of depressed out-patients. **J. Affect. Disord.**, v. 66, p. 267–271, 2001.

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.

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.

KASTURE, V. S.; KASTURE, S. B.; CHOPDE, C.T. Anticonvulsive activity of *Butea monosperma* flowers in laboratory animals. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 72, p. 965-972, 2002.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

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

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.; LEICHSENRING, 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.

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

KULKARNI, S. K.; BHUTANI, M. K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. **Psychopharmacology**, v. 201, p. 435-442, 2008.

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

KURIBARA, H.; HIGUCHI, Y.; TADOKORO, S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 27, p. 117-126, 1977.

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.

LAMBÁS-SEÑAS, L. *et al.* Functional correlates for 5-HT<sub>1A</sub> receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. **Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 33, p. 262-268, 2009.

LAPIN, I. P. Only Controls: Effect of Handling, Sham Injection, and Intraperitoneal Injection of Saline on Behavior of Mice in an Elevated Plus-Maze. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.34, p. 73-77, 1995.

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

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.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180–185, 1987.

LOWSON, S.; GENT, J. P.; GOODCHILD, C.S. Convulsive thresholds in mice during the recovery phase from anaesthesia induced by propofol, thiopentone, methohexitone and etomidate. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 879-882, 1991.

LUO, L. *et al.* Antidepressant effects of Banxia Houpu decoction, a traditional Chinese medicinal empirical formula. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 277, 281, 2000.

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

MACHADO, D. G. 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.**, v. 587, p. 163-168, 2008.

MALAWSKA, B.; SCATTURIN, A. Application of pharmacophore models for the design and synthesis of new anticonvulsant drugs. **Mini Rev. Med. Chem.**, v, 3, p. 341-348, 2003.

MAO, Q. *et al.* Antidepressant-like effect of ethanol extract from *Paeonia lactiflora* in mice. **Phytoter. Res.**, v. 22, p. 1496-1499, 2008.

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.

MATTEI, R. *et al.* Guaraná (*Paulinea cupana*): toxic behavior effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 111-116, 1998.

Mc NAMARA, J.O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: HARDMAN, L. E.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R.W. (Ed.). **Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. New York: Pergamon, 1996. p. 461-466.

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.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administrated anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 591-613, 1999.

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.

MORA, S. et al. Central nervous system activity of hidroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 191-197, 2005.

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

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  $\beta$ -cyclodextrin complexes. **Int. J. Pharm.**, v. 128, p. 81-88, 1996.

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.

NHU-TRANG, T. T.; CASABIANCA, H.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol,  $\gamma$ -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. 1/2, p. 219-227, 2006.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 191-195, 2004.

NOVAS, M. L. *et al.* Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl-h-carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 30, p. 331–6, 1988.

ONAIVI, E. S. *et al.* Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 825-831, 1992.

OZBAKIS-DENGIZ, G.; BAKIRCI, A. Anticonvulsant and hypnotic effects of amiodarone. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v. 10, p. 317-322, 2009.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 219-233, 2001.

PATSOUKIS, N.; ZERVOUDAKIS, G.; GEORGIU, C. D.; ANGELATOU, F.; MATSOKIS, N. A.; PANAGOPOULOS, N. T. Effect of pentylentetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. **Epilepsy Res.**, v. 62, n. 1, p. 65-74, 2004.

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.**, Aug. 2009. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arms entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985a.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? **Neurosci. Lett.**, v. 55, p. 5-9, 1985b.

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.

PLANETA, C. F.; CRUZ, F. C. Bases neurofisiológicas da dependência do tabaco. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, v. 32, p. 251-258, 2005.

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.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 229, p. 327-336, 1977.

POSSER, T. *et al.* Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 602, p. 85-91, 2009.

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, 2007.

RAUPP, I. M. *et al.* Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, p. 295-299, 2008.



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.

REDROBE, J. P. *et al.* Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 138, p. 1–8, 1998.

ROCHA, L. *et al.* Pentylentetrazo-induced by kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. **Epilepsy Res.**, v. 26, p. 105-113, 1996.

ROGAWSKI, M. A. Mechanism-specific pathways for new antiepileptic drug discovery. **Adv. Neurol.**, v. 76, p. 11-27, 1998.

ROLLAND, A. *et al.* Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. **Planta Med.**, v. 57, p. 212–6, 1991.

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.

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

SAKI, G.; FAKHER, R.; ALIZADEH, K. Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. **J. Hum. Reprod. Sci.**, v. 2, p. 72-75, 2009.

SCHMIDT-MUTTER, C. *et al.* The anxiolytic effect of hydroxybutyrate in the elevated plus-maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 342, p. 21-27, 1998.

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.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Neoplasma**, v. 55, p. 394-9, 2008.

SMITH, A.J.; SIMPSON, P.B. Methodological approaches for the study of GABA<sub>A</sub> 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.* Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 78, p. 27-33, 2004.

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.

STERU, L. *et al.* Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-70, 1985.

STOUT, J.C.; WEISS, J.M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and anxiolytic manipulations. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 47, p. 459-465, 1994.

SWINYARD, E. A.; BROWN, W. C.; GOODMAN, L. S. Comparative assay of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 116, p. 319-330, 1952.

THIERRY, B. *et al.* The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology**, v. 90, p. 284-285, 1986.

TORRES, C.; ESCARABAJAL, M. D. Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. **Life Sci.**, v. 70, p. 1751-1762, 2002.

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.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 84, p. 185–191, 1985.

WANG, H. J. *et al.* Synthesis and evaluation on anticonvulsant and antidepressant activities of 5-alkoxy-tetrazolo[1,5-a]quinazolines. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, v. 342, p. 671-675, 2009.

WANG, R. *et al.* The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 578, p. 43-50, 2008.

WOLFFGRAMM, J.; MIKOLAICZY, K. C.; COPER, H. Acute and sub-chronic benzodiazepine-barbiturate-interactions on behavioral and physiological response of the mouse. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 349, p. 279-286, 1994.

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

YAN, B. *et al.* The antidepressant effect of ethanol extract of radix puerariae in mice exposed to cerebral ischemia reperfusion. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 78, p. 319-325, 2004.

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.

YAO, C.Y. *et al.* Laetispicine, an amide alkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 823-829, 2009.

YU, Z. F.; KONG, L. D.; CHEN, Y. Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 161-165, 2002.

YULUG, B. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor, stress and depression: A minireview. **Brain Res. Bull.**, v. 78, p. 267-269, 2009.

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, 2003.

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

**APÊNDICE**

---

---

ORIGINAL  
ARTICLEAnxiolytic-like effect of Carvacrol  
(5-isopropyl-2-methylphenol) in mice:  
involvement with GABAergic transmissionFrancisca Helvira Cavalcante Melo<sup>a,\*</sup>, Edith Teles Venâncio<sup>a</sup>,  
Damião Pergentino de Sousa<sup>b</sup>, Marta Maria de França Fonteles<sup>a</sup>,  
Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos<sup>a</sup>, Glauce Socorro Barros Viana<sup>a</sup>,  
Francisca Cléa Florenço de Sousa<sup>a</sup><sup>a</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60430-270 Fortaleza, Brazil<sup>b</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe CEP 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil**Keywords**anxiolytic effect,  
carvacrol,  
monoterpene**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. This work presents the behavioral effects of carvacrol in animal models of elevated plus maze (EPM), open field, Rotarod and barbiturate-induced sleeping time tests in mice. Carvacrol (CVC) was administered orally, in male mice, at single doses of 12.5; 25 and 50 mg/kg while diazepam 1 or 2 mg/kg was used as standard drug and flumazenil (2.5 mg/kg) was used to elucidate the possible anxiolytic mechanism of CVC on the plus maze test. The results showed that CVC, at three doses, had no effect on the spontaneous motor activity in the Rotarod test nor in the number of squares crossed in the open-field test. However, CVC decreased the number of groomings in the open-field test. In the plus maze test, CVC, at three doses significantly increased all the observed parameters in the EPM test and flumazenil was able to reverse the effects of diazepam and CVC. Therefore, CVC did not alter the sleep latency and sleeping time in the barbiturate-induced sleeping time test. These results show that CVC presents anxiolytic effects in the plus maze test which are not influenced by the locomotor activity in the open-field test.

Received 06 April 2009;  
revised 19 September 2009;  
accepted 05 October 2009\*Correspondence and reprints:  
helvira83@hotmail.com**INTRODUCTION**

Anxiety disorders are among the most common forms of psychopathology worldwide [1]. This psychological problem negatively impacts the functioning of daily activities and increases the risk for other types of disorders [2]. Benzodiazepines are the most frequently used drugs for the treatment of anxiety. The use of these drugs is associated with many side-effects, including sedation, muscle relaxation, anterograde amnesia and its continued use leads to dependence and tolerance [3,4].

Since ancient times, natural products have consistently been an important source of therapeutic agents. Currently, approximately 25–30% of all drugs available

as therapeutics are derived from natural products (plants, microbes and animals) or are natural product derivatives [5]. Many studies have demonstrated that plant-derived essential oils exhibit a variety of centrally active properties [6–9], including anxiolytic properties [9,10] that may be used as therapeutic alternatives for the treatment of anxiety. Several of these described effects are frequently attributed to monoterpenes, which are the major chemical components of those essential oils [8].

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) (Figure 1) is a monoterpenic phenol present in the essential oil of Labiatae including *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus*, and *Corydolithymus* [11]. It is the major

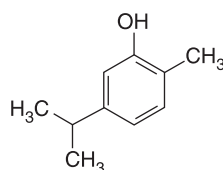


Figure 1 Structure of carvacrol.

component of the essential oil fraction of oregano and thyme [12] and it has a characteristic pungent warm taste and odor [13].

Carvacrol has been used on a large scale in the food and cosmetic industries, being a common ingredient of the human diet [14]. It was reported that CVC has antibacterial, antifungal, antihelmintic, analgesic, antioxidant, antimutagenic, antigenotoxic, antispasmodic, antiinflammatory, angiogenic, and hepatoprotective activities [15]. Studies on human cell lung cancer demonstrated that carvacrol may have anticancerogenic properties [11].

There are no published studies on the central actions of CVC, but previous studies have demonstrated central nervous properties of monoterpenes [8,16]. In the present study, we performed a pharmacological investigation of CVC on anxiety using the elevated plus maze (EPM), a behavioral test for anxiolytic drugs [17]. In addition to EPM, we also analyzed the effects of CVC on animal models of locomotor, sedative, and myorelaxant activities. To compare the effects of CVC with an anxiolytic standard, mice were treated with diazepam and evaluated in the same behavioral tasks described before.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male Swiss mice (25–30 g) were used only once in each experiment. The animals were provided by the Animal House of the Federal University of Ceará (Brazil) and maintained at a controlled temperature ( $23 \pm 1$  °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

We have previously reported [8] that isopulegol, a monoterpene alcohol demonstrated antianxiety effects on the EPM at doses of 25 and 50 mg/kg. As CVC is also

a monoterpene, we decided to use doses of 25 and 50 mg/kg on the EPM to investigate the anxiolytic effect of this drug. Additionally we tested a dose of 12.5 mg/kg, which was the lowest dose to demonstrate anxiolytic effects in our study.

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

Carvacrol was emulsified with 0.2% Tween 80 (Sigma) 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. All controls received 0.2% Tween 80 (Sigma, USA) dissolved in distilled water at the same volume as the treated groups (10 mL/kg). Diazepam (DZP) 1 and 2 mg/kg (União Química, São Paulo, SP, Brazil) and Flumazenil (FLU) 2.5 mg/kg (União Química) both i.p. were used as standard. The doses of the standard drugs were chosen according to previous studies in literature [7–9,18].

### Experimental protocol

The animals were tested during the morning period (between 9 and 12 h am) and observed in a closed room with constant temperature ( $23 \pm 1$  °C) and poorly illuminated with a 15-V red light, except in the rotarod test and pentobarbital-induced sleeping time test which was illuminated with normal light. All tests were performed in different days with distinct groups of animals.

### Elevated plus maze test (EPM)

The EPM for mice [19] consisted of two perpendicular open arms ( $30 \times 5$  cm) and two closed arms ( $30 \times 5 \times 25$  cm) also in perpendicular position. The open and closed arms were connected by a central platform ( $5 \times 5$  cm). The platform and the lateral walls of the closed arms were made of transparent acrylic and the floor of black acrylic. The maze was 45 cm above the floor. One hour later the treatment, the animal was placed at the center of the plus maze facing one of the enclosed arms, and observed for 5 min, according to the following parameters: number of entries into the open and closed arms, and time of permanence in each of them. The ratios 'number of entries into open arms/number of entries into all (i.e., open and closed) arms' and 'time spent in the open arms/time spent in all arms' were calculated and multiplied by 100 to yield the percentages of entries into open arms and the percentage of time of permanence in the open arms. Anxiolytic compounds reduce the animal's aversion to the open



arms and promote the exploration thereof. The animals were divided into five groups with 10–15 per group.

### Open-field test

The open-field area was made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 × 30 × 15 cm) divided into nine squares of equal area. This apparatus was used to evaluate the exploratory activity of the animal [20]. The observed parameters were as follows: number of squares crossed (with the four paws) and number of groomings and rearings. The animals were divided into five groups with 8–10 animals per group.

### Rotarod test

For the Rotarod test [21], animals were divided into 15 groups, with eight mice per group, and were placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor, which was turning at 5, 15, and 40 rpm [8]. The time of permanence on the bar was measured for 2 min for each animal and different groups were used at all rotating speeds.

### Pentobarbital-induced sleeping time

One hour later oral treatment with CVC (12.5; 25 and 50 mg/kg), vehicle or DZP (1 mg/kg), all five groups, with 8–10 animals per group, were received sodium pentobarbital (40 mg/kg) i.p. Since then the injection up

to the loss of the righting reflex is recorded as sleeping latency and the time elapsed between the loss and voluntary recovery of the righting reflex is recorded as sleeping time [22,23].

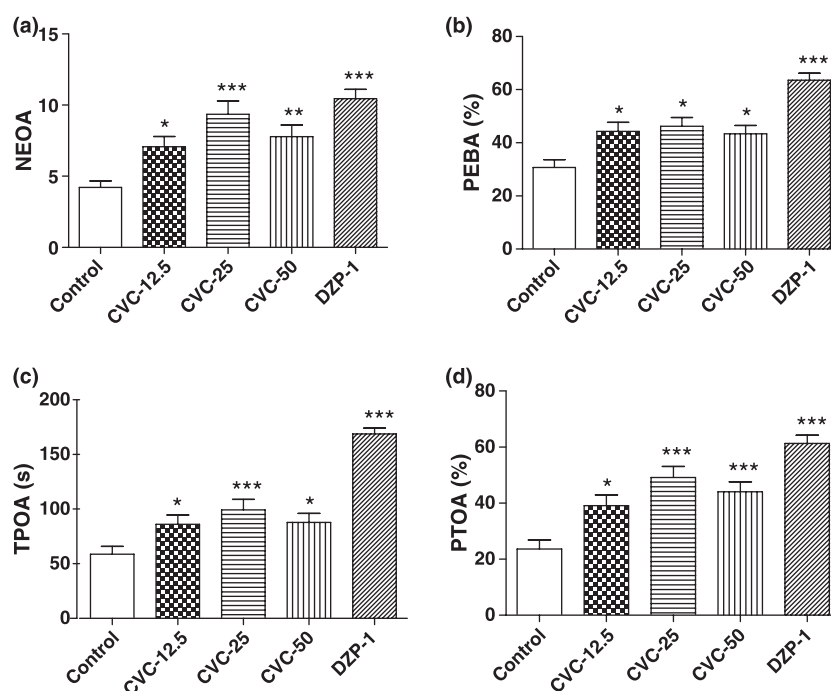
### Statistical analyses

The results are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls post hoc test. For data of the EPM test, one-way ANOVA was used for the comparison between the effects of different doses of drugs with vehicles. Two-way ANOVA followed by Bonferroni as the post-test was used for evaluation of interactions between drugs. Results were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Elevated plus maze test (EPM)

In this test one-way ANOVA revealed (Figure 2) that groups treated with CVC (12.5, 25, and 50 mg/kg) and DZP (1 mg/kg) significantly modified all the observed parameters: the number of entries in the open arms (NEOA) [CVC-12.5, CVC-25, CVC-50, DZP-1:  $F(4,54) = 10.48$ ,  $P < 0.05$ ] and percentage of entries in the open arms (PEOA%) [CVC-12.5, CVC-25, CVC-50, DZP-1:  $F(4,55) = 12.17$ ,  $P < 0.05$ ], as well as the time of



**Figure 2** Plus maze test of groups of mice which received vehicle, carvacrol (12.5, 25, and 50 mg/kg) and DZP (1 mg/kg). (a) NEOA: number of entries in the open arms; (b) PEOA(%): percentage of entries in the open arms; (c) TPOA(s): time of permanence in the open arms; (d) PTOA(%): percentage of time of permanence in the open arms. The results are presented as mean ± SEM. Significant difference compared with control (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). ANOVA and Student–Newman–Keuls as the post hoc test.

permanence in the open arms (TPOA/s) [CVC-12.5, CVC-25, CVC-50, DZP-1:  $F(4,53) = 23.57$ ,  $P < 0.05$ ] and percentage of time of permanence in the open arms (PTOA%) [CVC-12.5, CVC-25, CVC-12.5, DZP-1:  $F(4,53) = 12.48$ ,  $P < .05$ ]. Two-way ANOVA (Figure 3) revealed that flumazenil (2.5 mg/kg) reversed the anxiolytic effect of CVC 25 mg/kg and DZP 1 mg/kg in all parameters analyzed: (NEOA [CVC-25, CVC-25 + FLU-2.5, DZP-1, DZP-1 + FLU-2.5:  $F(4,46) = 12.64$ ,  $P < 0.001$ ]; (PEOA% [CVC-25, CVC-25 + FLU-2.5, DZP-1, DZP-1 + FLU-2.5:  $F(4,42) = 17.55$ ,  $P < 0.01$ ]; (TPOA/s) [CVC-25, CVC-25 + FLU-2.5, DZP-1, DZP-1 + FLU-2.5:  $F(4,44) = 27.44$ ,  $P < 0.05$ ]; (PTOA%) [CVC-25, CVC-25 + FLU-2.5, DZP-1, DZP-1 + FLU-2.5:  $F(4,44) = 19.13$ ,  $P < 0.01$ ].

### Open-field test

In the open-field test (Figure 4), CVC at doses of 12.5, 25, and 50 mg/kg did not significantly alter the number of crossings and rearings compared with respective controls. Carvacrol at doses of 25 and 50 mg/kg, but not at dose of 12.5 mg/kg, significantly decreased the number of groomings as compared with control. Animals treated with DZP (2 mg/kg) decreased the number of crossings [DZP-2:  $F(4,36) = 14.56$ ,  $P < 0.05$ ], groomings [CVC-25, CVC-50, DZP-2:  $F(4,36) = 6.184$ ,  $P < 0.05$ ] and rearings [DZP-2:  $F(4,32) = 3.906$ ,  $P < 0.05$ ] as compared with control group.

### Rotarod

Carvacrol at doses of 12.5, 25, and 50 mg/kg did not alter the time of permanence on the bar at 5, 15, and

40 rpm as compared with control group. Diazepam (2 mg/kg) decreased this parameter: [5 rpm: DZP-1:  $F(4,31) = 26.08$ ,  $P < 0.05$ ; 15 rpm: DZP-1:  $F(4,31) = 29.62$ ,  $P < 0.05$ ; 40 rpm: DZP-1:  $F(4,31) = 4.860$ ,  $P < 0.05$ ] (Figure 5).

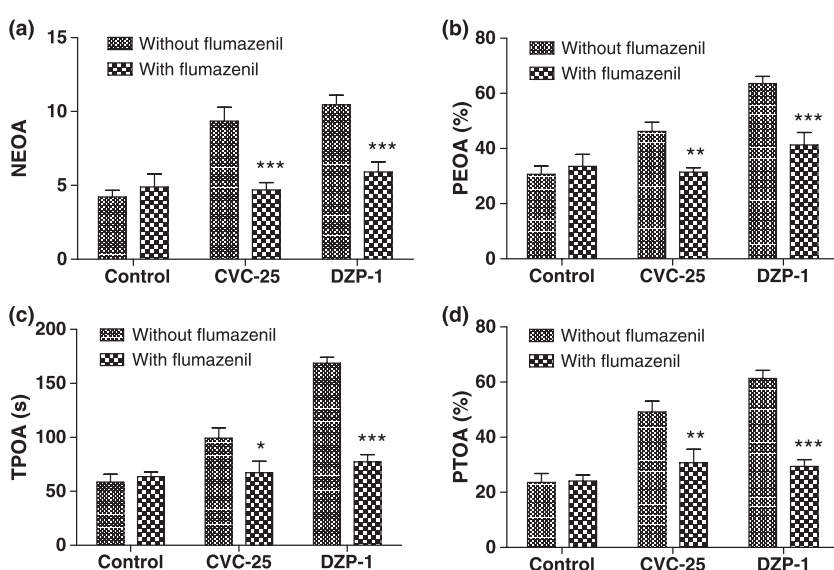
### Pentobarbital-induced sleeping time

Carvacrol at three doses (12.5, 25, and 50 mg/kg) did not alter the parameters of sleeping latency and sleeping time as compared with control group. Animals treated with DZP (1 mg/kg) showed a decrease in sleeping latency [DZP-1:  $F(4,33) = 4.667$ ,  $P < 0.05$ ] and prolongation of pentobarbital-induced sleeping time [DZP-1:  $F(4,33) = 9.599$ ,  $P < 0.05$ ] (Figure 6).

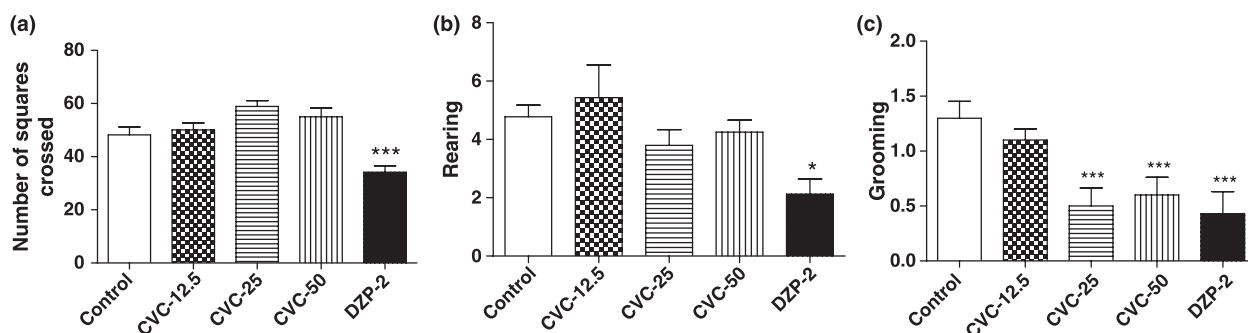
## DISCUSSION

Carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) is a monoterpene phenol present in the essential oil of many plants. Previous studies have demonstrated central nervous actions of monoterpenes such as anxiolytic, antidepressant, and psychostimulant properties [8,16]. Based on these observations, we decided to investigate whether CVC exhibits central nervous system activity as we could not locate any previously published studies.

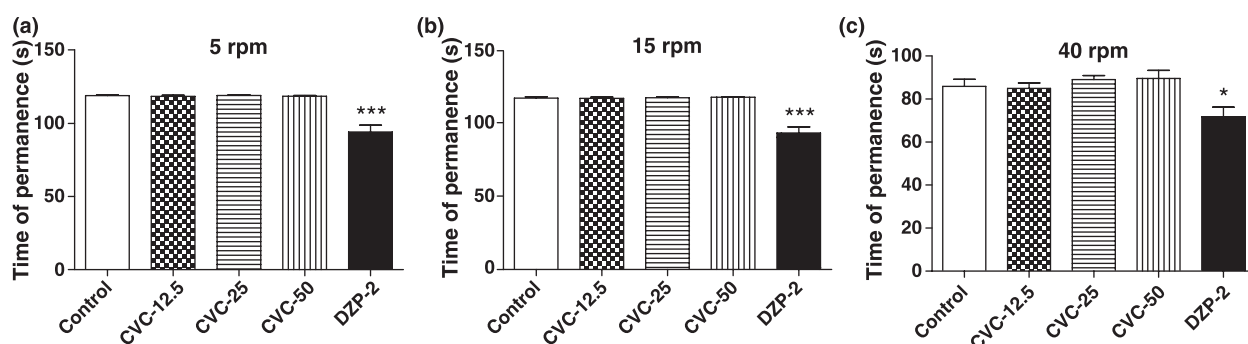
In this work, the effects of CVC were studied in an animal model of anxiety, the EPM. In addition to EPM, we also analyzed the effects of carvacrol on the open field, Rotarod and pentobarbital-induced sleeping time. These tests are classical models for screening central nervous system actions providing information about



**Figure 3** Plus maze test of groups of mice which received vehicle, carvacrol (25 mg/kg), DZP (1 mg/kg) or FLU (2.5 mg/kg). (a) NEOA: number of entries in the open arms; (b) PEOA(%): percentage of entries in the open arms; (c) TPOA(s): time of permanence in the open arms; (d) PTOA(%): percentage of time of permanence in the open arms. The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significant differences compared with control (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Two-way ANOVA and Bonferroni as the post hoc test were used.



**Figure 4** Open-field test of groups of mice which received vehicle, carvacrol (12.5, 25, and 50 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). (a) Number of squares crossed. (b) Rearing. (c) Grooming. The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significant difference compared with control (\* $P$  < 0.05; \*\*\* $P$  < 0.001). ANOVA and Student–Newman–Keuls as the post hoc test.



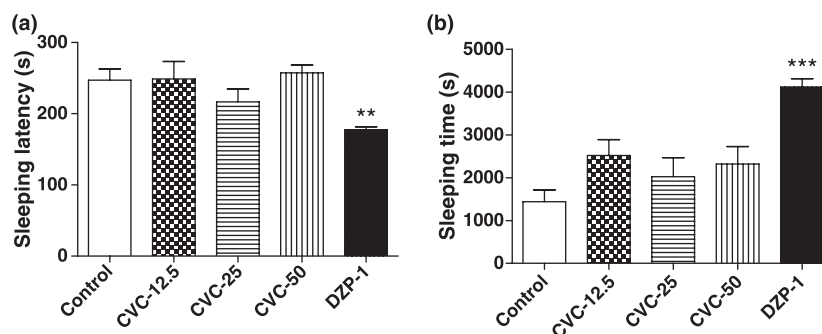
**Figure 5** Rotarod test of groups of mice which received vehicle, carvacrol (12.5, 25, and 50 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). The figure shows time of permanence (s). The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significant difference compared with control (\* $P$  < 0.05; \*\*\* $P$  < 0.001). ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test.

psychomotor performance, myorelaxant activity, sedation effect, and anxiety [18].

The present study showed that the administration of different doses of CVC in mice was able to induce anxiolytic-like effects in the EPM. This test was originally developed by Lister [19] and has become a model for study of anxiety-like behavior in rats and subsequently in mice [24]. It is based on the natural aversion of rodents to open spaces and has been used to study

anxiety and its modulation by drug treatment [25]. In the EPM test, decreased occupancy, in the open arm and reduction in the open-arms entries in relation to the total arm entries, provides a measure of fear-induced inhibition of exploratory activity which is attenuated by anxiolytics and increased by anxiogenic agents [26]. Our results showed that CVC at all three doses decreased the avoidance to open arms, increased the number of entries into open arms (NEOA) and also increased, the

**Figure 6** Effects of mice treatment with carvacrol (12.5, 25, and 50 mg/kg i.p.) and diazepam (1 mg/kg) on sleep latency time (a) and sleeping time (b) caused by pentobarbital (40 mg/kg). The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Significant difference compared with control (\*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001). Student–Newman–Keuls as the post hoc test.



time of permanence in the open arms (TPOA), the percentage of entries into open arms (PEOA), and the percentage of time of permanence in the open arms (PTOA) were similar to the effects observed after administration of the reference anxiolytic drug DZP (1 mg/kg). These data are in agreement with the results of other studies, where DZP at 1 mg/kg has been shown to produce anxiolytic effects in the EPM test [8,9,18].

The mechanism of action of benzodiazepines is well-described in literature. These drugs are allosteric modulators of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA<sub>A</sub>) receptor, which results in increased hyperpolarization of the cell [26]. Flumazenil is a recognized antagonist of benzodiazepine site and was used to elucidate the possible mechanism by which CVC is acting in this model. The results showed that flumazenil reversed not only the anxiolytic effect of DZP but also the anxiolytic effect of CVC, indicating that both drugs might present a similar mechanism of action. A recent study [27] has suggested that CVC may act on alteration of the GABA<sub>A</sub> receptor lipid environment as part of the receptor modulation exerted by phenolic compounds.

Published data have shown that drugs that alter general motor activity may give false positive/negative results in the EPM test [8,9]. So, we decided to study the effects of CVC in the open-field test, a classical animal model used to evaluate autonomic effects of drugs and general activity of animals [28]. Our results showed that all the three doses did not alter the locomotor activity (number of crossings) compared with control group. In contrast, DZP 2 mg/kg, i.p. decreased locomotor activity, grooming and rearing, indicating a sedative effect of the benzodiazepine. However, CVC in doses of 25 and 50 mg/kg decreased the number of groomings. It is described in the literature that grooming can be modulated by various neurotransmitters [29] with dopamine being particularly important [9,30]. However, based only on a decrease in grooming we cannot speculate on the involvement of the dopaminergic system in the effects of CVC. Further studies will be performed to clarify this.

To study a possible myorelaxant activity of CVC, we decided to evaluate the effect of this substance in the Rotarod test, a classical animal model used to assess drug effects on motor coordination in rodents [31]. This test is based on the fact that once an animal placed on a rod which is rotating at a constant speed easily falls from the rod after ingestion of a central depressant drug [32]. Our findings showed that CVC (12.5, 25, and 50 mg/kg), compared with DZP (2 mg/kg), had no significant effect on the motor coordination of the animals on Rotarod

test, suggesting that CVC might not exert myorelaxant effect at doses of 12.5, 25, and 50 mg/kg. Previous studies have demonstrated how an anxiolytic drug, such as DZP in higher doses (2 mg/kg) causes muscular relaxation [7–9,18]. In addition this test is also able to detect drugs that cause alterations in motor coordination. According to Bohlen et al. [31], animals who presented at least two passive rotations were eliminated from the study.

The possible sedative effect of CVC on the central nervous system was evaluated by the potentiation of sodium pentobarbital sleeping time. Our results showed that CVC at doses of 12.5, 25, and 50 mg/kg did not alter the sleeping latency time and sleeping time compared with control group. Diazepam (1 mg/kg) decreased the sleeping latency time and increased the sleeping time compared with control. These results are in agreement with the results of other studies, in which DZP at 1 mg/kg have been shown to decrease the sleeping latency time and increase the sleeping time, indicating a sedative effect of the benzodiazepine [8,9].

In conclusion, our results suggest that acute treatment with CVC at doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg shows anxiolytic effects which are reversed by the use of flumazenil as demonstrated by the EPM test. However, CVC at the three doses that showed anxiolytic activity did not show sedative or myorelaxant properties and did not alter the locomotor activity as demonstrated in sodium pentobarbital sleeping time, Rotarod and open-field tests, respectively.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the Brazilian National Research Council (CNPq) for the financial support, and to Prof. David Woods for reviewing and adequacy of the manuscript to the English language.

## REFERENCES

- 1 Helli n-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 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.* (2008) **29** 1–23.
- 3 Borges K.B., Freire E.F., Martins I., Siqueira M.E.P.B. Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid–liquid and solid-phase extractions in human plasma. *Talanta* (2008) **78** 233–241.



- 4 Rabbani M., Sajjadi S.E., Mohammadi A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss in mice. *eCAM* (2008) **5** 181–186.
- 5 Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J. Ethnopharmacol.* (2005) **100** 131–134.
- 6 Gurgel do Vale T., Couto Furtado E., Santos J.G. Jr, Viana GSB. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* (2002) **9** 709–714.
- 7 Sousa F.C.F., Melo C.T.V., Monteiro A.P. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2004) **78** 27–33.
- 8 Silva M.I.G., Neto M.R.A., Neto P.F.T. et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2007) **88** 141–147.
- 9 Gomes P.B., Noronha E.C., Melo C.T.V. et al. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. *J. Ethnopharmacol.* (2008) **120** 209–214.
- 10 Sousa F.C.F., Melo C.T.V., Citó M.C.O. 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.* (2008) **18** 642–654.
- 11 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.
- 12 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** 6406–6410.
- 13 Abu-Lafi S., Odeh I., Dewik H., Qabajah M., Hanuš L.O., Dembitsky V.M. Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource Technol.* (2008) **99** 3914–3918.
- 14 Ipek E., Tuylu A.B., Zeytinoglu H. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology* (2003) **43** 145–148.
- 15 Baser KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharmaceut. Design* (2008) **14** 3106–3119.
- 16 Umezu T, Morita M. Evidence for the involvement of dopamine in ambulation promoted by menthol in mice. *J. Pharmacol. Sci.* (2003) **91** 125–135.
- 17 David E.A.B., Franco J.V. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted progressive-ratio cocaine self-administration break points in Wistar rats. *Psychopharmacology* (2007) **194** 211–219.
- 18 Melo C.T.V., Monteiro A.P., Leite C.P. et al. Anxiolytic-Like Effects of (*O*-Methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in mice. *Biol. Pharmaceut. Bull.* (2006) **29** 451–454.
- 19 Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* (1987) **92** 180–185.
- 20 Archer J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim. Behav.* (1973) **21** 205–235.
- 21 Egashira N., Tanoue A., Higashihara F. et al. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci. Lett.* (2004) **356** 195–198.
- 22 Wambebe C. Influence of some agents that affect 5-hydroxytryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. *Braz. J. Pharmacol.* (1985) **84** 185–191.
- 23 Rolland A., Fleurentin J., Lanhers M.C. et al. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Med.* (1991) **57** 212–216.
- 24 Buckman S.G., Hodgson S.R., Hoffer R.S., Eitan S. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. *Behav. Brain Res.* (2009) **197** 454–456.
- 25 Cornélio A.M., Nunes-de-Souza R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? *Physiol. Behav.* (2009) **96** 440–447.
- 26 Sonavane G.S., Sarveiya V.P., Kasture V.S., Kasture S.B. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2002) **71** 239–244.
- 27 Reiner G.N., Labuckas D.O., García D.A. Lipophilicity of some GABAergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* (2009) **49** 686–691.
- 28 Novas M.L., Wolfman C., Medina J.H., De Robertis E. Proconvulsant and anxiogenic effects of *n*-butyl-*h*-carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1988) **30** 331–336.
- 29 Traber J., Spencer D.G., Glaser T., Gispén W.H. Actions of psychoactive drugs on ACTH- and novelty-induced behavior in the rat, in: Colbern D.L., Gispén W.H. (Eds), *Neural Mechanisms and Biological Significance of Grooming Behavior*, Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 1988, pp. 270–280.
- 30 Serafim A.P., Felício L.F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (2001) **34** 1465–1470.
- 31 Bohlen M., Cameron A., Metten P., Crabbe J.C., Wahlsten D. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. *J. Neurosci. Methods* (2009) **178** 10–14.
- 32 Kuribara H., Higuchi Y, Tadokoro S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. *Japan J. Pharmacol.* (1977) **27** 117–126.