



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

MARIANA LIMA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO E CONVULSÃO EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2012

MARIANA LIMA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO E CONVULSÃO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Orientador: Prof. Dra. Francisca Cléa
Florenço de Sousa

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

F41i Fernandes, Mariana Lima.

Investigação da ação central do timol em modelos comportamentais de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos. / Mariana Lima Fernandes. – 2012.

108 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2012. Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

1. Ansiedade. 2. Depressão 3. Timol. I. Título.

CDD 616.8522

MARIANA LIMA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO E CONVULSÃO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão

Universidade Federal do Ceará (UFC)

***Aos meus filhos Carlos Eduardo e Iana pelo incentivo e
compreensão dos momentos de ausência
na realização deste trabalho.***

AGRADECIMENTOS

A **Deus** todo poderoso que nos deu o dom da vida e torna todas as coisas possíveis.

À **Francy** minha **mãezinha** exemplo de dedicação e coragem, sua história de vida foi que me fez dar um enorme valor as coisas que conquistamos e a vontade de superar os desafios que encontramos em nossa vida.

Ao meu esposo **Armênio** que sempre me incentivou e me deu apoio incondicional. Sem seu apoio nada seria possível. E aos nossos filhos **Carlos Eduardo** e **Iana**, por estarem sempre ao nosso lado.

À minha sogra **Vânia** (mainha) e minha cunhada **Karina** (Teteia), as quais sempre pude contar, e sempre estiveram presentes na educação de meus filhos. Sem vocês jamais teria conseguido concluir o ensino médio, a graduação, o mestrado... Enfim muito obrigada pelo carinho que vocês têm por nós.

À minha orientadora, Profa. **Dra. Cléa** que desde o início acreditou em mim muito mais do que eu mesma, através de seu incentivo fui capaz de mergulhar em águas desconhecidas.

À minha amiga **Helvira** que desde o início me incentivou na pesquisa, partilhou comigo seus conhecimentos e viabilizou os experimentos. Com a sua colaboração este sonho tornou-se possível.

As minhas amigas da pós-graduação **Charliane, Íris, Luciana, Maria do Carmo** que sempre me ajudaram em tudo que foi necessário. O apoio de vocês fez toda a diferença.

Aos demais amigos do LNF: **Alyne Mara, Leonardo, Izabel, Emiliano, Nayrton, Edith, Mariana, Marília, Priscila, Iardja, Joaquim**, que sempre estavam disponíveis para esclarecer minhas dúvidas e ajudar no que fosse preciso.

Aos meus queridos amigos que me apoiaram e me incentivaram: **Adília, Esmeralda, Jaqueline, Karoline, Luís, Márcia, Marusia, Monalisa, Rom Vilma, Saulo**.

Ao Profº. Dr. Damião Pergentino da Universidade Federal de Sergipe. À **Coordenação, e a todos os professores e as secretárias** do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade para ajudar sempre no que fosse preciso.

As Profas. Dras. **Danielle** e **Gisela** por terem gentilmente aceitado participar de minha banca examinadora de mestrado.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia **Arnaldo, Lena, Vilani** por sempre ter me ajudado quando solicitei.

Aos **colaboradores do Biotério e a todos os funcionários** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos meus amigos que compõem o “**Projeto Drogas de Abuso**”, juntos somamos nossas forças e realizamos vários feitos.

Muito obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente nesta trajetória.

“Entrega o teu caminho ao SENHOR, confia nele e ele o fará”.

Sl, 37,5

RESUMO

O Timol (2-isopropil-5-metil-fenol) um isômero do Carvacrol. Apresenta-se como cristal incolor grandes ou pó cristalino branco. É um monoterpene extraído do óleo essencial de diversas plantas aromáticas, sendo o componente principal do óleo essencial do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), constituindo aproximadamente 48% da sua composição. Este trabalho avaliou as ações comportamentais do timol em modelos animais de ansiedade, depressão, convulsão e sedação, tais como labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, *rota rod*, nado forçado, suspensão da cauda, convulsão induzida por pentilenotetrazol e tempo de sono induzido por pentobarbital. Timol foi administrado por via oral, em camundongos machos, em doses únicas de 25mg/Kg ou 50 mg/Kg. Os resultados mostraram que o timol nas duas doses estudadas, não causou efeito relaxante muscular no teste do rota Rod nem alterou o número de cruzamentos no teste do campo aberto, mas reduziu o *grooming*. No LCE ambas as doses estudadas do timol aumentaram todos os parâmetros observados sugerindo um possível efeito ansiolítico. O flumazenil, um antagonista dos receptores GABAA/Benzodiazepínico, reverteu este efeito. No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital o timol não alterou a latência, mas aumentou a duração do sono. Entretanto este teste embora sendo sensível para agentes depressores do SNC não é específico pois compostos que possam interferir com a biotransformação do pentobarbital. No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, timol aumentou a latência da convulsão na dose de 50mg/Kg, no entanto não foi capaz de alterar a latência de morte e a mortalidade dos animais. Timol apresentou efeito antidepressivo no teste do nado forçado e da suspensão da cauda. Este efeito foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com PCPA (um inibidor da síntese de serotonina), Prazosina e Ioimbina (antagonistas dos receptores adrenérgicos), SCH23390 e Sulpirida (antagonistas dos receptores dopaminérgicos). Estes resultados sugerem que o timol apresenta efeitos ansiolíticos provavelmente relacionados com o sistema GABAérgico e efeitos antidepressivos associados aos sistemas serotonérgico, noradrenérgico e dopaminérgico sem causar sedação.

Palavras-chave: Ansiedade. Depressão. Timol.

ABSTRACT

Thymol (2-isopropyl-5-methyl-phenol) an isomer of Carvacrol. Present as large colorless crystals or white crystalline powder. It is a monoterpene essential oil extracted from various herbs, and the main component of the essential oil of rosemary-pepper (*Lippia sidoides*), constituting approximately 48% of its composition. This paper presents the behavioral actions of thymol in animal models of anxiety, depression, seizures and sedation, such as elevated plus maze (EPM), open field, rota rod, forced swim, tail suspension, seizure induced by pentylenetetrazol and pentobarbital-induced sleep time. Thymol was administered orally in male mice at doses of 25mg/kg and 50mg / kg. The results showed that thymol at both doses studied did cause muscular relaxation activities change locomotor activity on the test rota rod nor the number of crossings in the open field test, but reduced The grooming was reduced with the administration of thymol in the open field test. At both doses studied LCE thymol increased all parameters observed suggesting a possible anxiolytic effect. Flumazenil, an antagonist of GABA/benzodiazepine, reversed this effect. In the test of sleep time induced by pentobarbital thymol not alter the latency but increased sleep duration. Although this test is sensitive to CNS depressant agents but is not specific for compounds which would interfere with the biotransformation of pentobarbital. In the test of pentylenetetrazol-induced seizures, thymol increased latency of seizure at the dose of 50mg/kg, however was not able to change the mortality of animals. Thymol showed antidepressant effect in the forced swim test and the tail suspension. This effect was reversed by pretreatment of animals with PCPA (a serotonin synthesis inhibitor), Prazosin and Yohimbine (adrenoreceptor antagonists), SCH23390 and Sulpiride (dopamine receptor antagonists). These results suggest that thymol shows anxiolytic effects probably associated with the GABAergic system and antidepressant effects associated with the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic without causing sedation.

Keywords: Anxiety. Depression. Thymol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Receptor GABA A	20
Figura 2 -	Vias dopaminérgicas no encéfalo.....	23
Figura 3 -	Neurotransmissão dopaminérgica.....	24
Figura 4 -	Neurotransmissão noradrenérgica.....	25
Figura 5 -	Neurotransmissão serotonérgica	26
Figura 6 -	<i>Papaver somniferum</i>	31
Figura 7 -	Alecrim-pimenta (<i>Lippia Sidoides</i>)	33
Figura 8 -	Estrutura química do Timol e Carvacrol.....	34
Figura 9 -	Estrutura química do Timol.....	37
Figura 10 -	Efeito do Timol e Diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.....	54
Figura 11 -	Efeito do Timol e Diazepam sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto em camundongos.....	55
Figura 12 -	Efeito do Timol e Diazepam sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos.....	56
Figura 13 -	Efeito do Timol e Diazepam no tempo de permanência na barra giratória na velocidade de 15 rpm, no teste do <i>rota rod</i> em camundongos.....	57
Figura 14 -	Efeito do Timol e Diazepam no tempo de permanência na barra giratória na velocidade de 30 rpm, no teste do <i>rota rod</i> em camundongos.....	58
Figura 15 -	Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o número de entradas no braço aberto (NEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos...	60
Figura 16 -	Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o percentual de entradas no braço aberto (PEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos	61

Figura 17 - Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos.....	62
Figura 18 - Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos.....	63
Figura 19 - Efeito do Timol sozinho ou associado a Imipramina sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos	64
Figura 20 - Efeito do Timol sozinho ou associado a Prazosina sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos.....	66
Figura 21 - Efeito do Timol sozinho ou associado a loimbina sobre o tempo(s) no teste do nado forçado em camundongos.....	67
Figura 22 - Efeito do Timol e Fluoxetina, sozinhos ou associados ao PCPA sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	69
Figura 23 - Efeito do Timol sozinho ou associado a SCH23390 sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos	71
Figura 24 - Efeito do Timol sozinho ou associado a Sulpirida sobre o tempo de imobilidade(s) no teste do nado forçado em camundongos	72
Figura 25 - Efeito do Timol e da Imipramina sobre o tempo de imobilidade(s) no teste de suspensão da cauda em camundongos	73
Figura 26 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a latência do sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	75
Figura 27 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a duração do sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	76

- Figura 28 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a latência da convulsão (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos..... 78
- Figura 29 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a latência de morte (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos 79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Drogas e reagentes	42
Quadro 2 - Equipamentos	43
Quadro 3 - Teste do campo aberto em camundongos	45
Quadro 4 - Teste do <i>rota rod</i> em camundongos	46
Quadro 5 - Teste do Labirinto em cruz elevado em camundongos	47
Quadro 6 - Teste do nado forçado em camundongos.....	48
Quadro 7 - Teste da suspensão da cauda em camundongos	50
Quadro 8 - Teste do tempo de sono induzido por Pentobarbital em camundongos.....	51
Quadro 9 - Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol em camundongos	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito da administração oral do Timol e Diazepam intraperitoneal no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.....	80
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
α	Alfa
ANOVA	Análise de Variância
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
B	Beta
BUP	Bupropiona
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
cont.	Controle
D1	Receptor Dopaminérgico do tipo 1
D2	Receptor Dopaminérgico do tipo 2
DL50	Dose letal que mata 50% dos animais
DS	Duração do Sono
DZP	Diazepam
EPM	Erro Padrão da Média
Et al.	E colaboradores
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
g/ Kg	Gramas/ Quilograma
IMI	Imipramina
i.p.	Intraperitoneal
LC	Latência da Convulsão
LM	Latência de Morte
LS	Latência do Sono
m	Metro
μ M	Micromolar
μ g	Micrograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mg/Kg	Miligrama/Quilograma
mg/mL	Miligrama/Mililitro
mL/Kg	Mililitro/Quilograma
min	Minuto

MS	Ministério da Saúde
MAO	Monoamino oxidase
NEBA	Número de Entradas nos Braços Abertos
NQ	Número de quedas
p	Nível de Significância
PEBA	Percentagem de Entradas nos Braços Abertos
PTBA	Percentagem do Tempo de Permanência nos Braços Abertos
PTZ	Pentilenotetrazol
rpm	Rotação por minuto
5- HT	Serotonina
SCH23390	(Antagonista D1 dopaminérgico)
SNC	Sistema Nervoso Central
SPD	Sulpirida
TH	Tirosina Hidroxilase
TP	Tempo de Permanência
TPBA	Tempo de Permanência nos Braços Abertos
v.o.	Via Oral
vs	Versus
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Ansiedade	18
1.2	Depressão	21
1.3	Epilepsia e convulsão	28
1.4	Plantas Medicinais	29
1.4.1	<i>Lipia Sidoides</i>	31
1.4.2	<i>Óleos Essenciais</i>	33
1.4.3	<i>Timol</i>	35
1.5	Modelos animais	38
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS	41
3.1	Geral	41
3.2	Específicos	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Óleo Essencial	42
4.2	Drogas e Reagentes	42
4.3	Equipamentos	43
4.4	Animais	43
4.5	Preparo da drogas e vias de administração	43
4.6	Tratamento dos grupos experimentais	44
4.7	Protocolo Experimental	44
4.7.1	<i>Avaliação da atividade locomotora</i>	45
4.7.1.1	<i>Teste do Campo Aberto</i>	45
4.7.2	<i>Avaliação da Atividade Relaxante Muscular</i>	46
4.7.2.1	<i>Teste do Rota Rod</i>	46
4.7.3	<i>Avaliação da Atividade Ansiolítica</i>	46
4.7.3.1	<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	46
4.7.4	<i>Avaliação da Atividade Antidepressiva</i>	48
4.7.4.1	<i>Teste do Nado Forçado</i>	48
4.7.4.2	<i>Avaliação do Sistema Noradrenérgico</i>	49
4.7.4.3	<i>Avaliação do Sistema Serotonérgico</i>	49

4.7.4.4	<i>Avaliação do Sistema Dopaminérgico</i>	49
4.7.4.5	<i>Teste da Suspensão da Cauda</i>	49
4.7.5	<i>Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica</i>	50
4.7.5.1	<i>Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital</i>	50
4.7.6	<i>Avaliação da Atividade Anticonvulsivante</i>	51
4.7.6.1	<i>Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol</i>	51
4.8	<i>Análise Estatística</i>	52
5	RESULTADOS	53
5.1	<i>Avaliação da atividade locomotora</i>	53
5.1.1	<i>Teste do Campo Aberto</i>	53
5.2.	<i>Avaliação da Atividade Relaxante Muscular</i>	56
5.2.1	<i>Teste do Rota Rod</i>	56
5.3	<i>Avaliação da Atividade Ansiolítica</i>	58
5.3.1	<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	58
5.4	<i>Avaliação da Atividade Antidepressiva</i>	64
5.4.1	<i>Teste do Nado Forçado</i>	64
5.4.2	<i>Avaliação do Sistema Noradrenérgico</i>	65
5.4.3	<i>Avaliação do Sistema Serotonérgico</i>	68
5.4.4	<i>Avaliação do Sistema Dopaminérgico</i>	70
5.4.5	<i>Teste da Suspensão da Cauda</i>	73
5.5	<i>Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica</i>	74
5.5.1	<i>Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital</i>	74
5.6	<i>Avaliação da Atividade Anticonvulsivante</i>	77
5.6.1	<i>Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol</i>	77
6	DISCUSSÃO	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
8	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade

A ansiedade está entre os transtornos enfrentados por muitas pessoas no século 21 e notadamente reduz a qualidade de vida e causa inúmeras perdas financeiras. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 450 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de algum tipo de transtorno mental comportamental (SOUSA; OLIVEIRA; FERNANDES, 2012).

A ansiedade é uma emoção normal em circunstâncias de ameaça e é considerada como fazendo parte de reação de sobrevivência evolutiva de “luta ou fuga”, no entanto há várias circunstâncias nas quais a presença da ansiedade não é adaptativa e constitui um transtorno psiquiátrico. Dentre estes transtornos podemos citar os transtornos de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno de ansiedade social, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno obsessivo compulsivo (STAHL, 2010).

A ansiedade se manifesta de diferentes formas e entre as sensações mais características é de estrangulamento ou constrição, sendo descrita como uma sensação desagradável que se constitui em uma motivação negativa, isto é, no desejo de fazer alguma coisa para evitar, atenuar ou eliminar o estado de desprazer. O medo inibe outros sistemas motivacionais, diminuindo o apetite, a libido e a dor (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001).

Segundo Reardon *et al.*, 2009 os transtornos de ansiedade apresentam consequências relevantes na economia da sociedade, pois afetam negativamente o funcionamento das atividades diárias e aumentam o risco de desenvolvimento de outros tipos de desordens.

Keeley e Storck em 2009 relataram que crianças e adolescentes também estão expostos aos transtornos de ansiedade que não se restringem somente aos adultos e ainda entre estes as mulheres possuem uma probabilidade duas vezes maior de preencherem os critérios para transtorno do pânico, transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de estresse pós-traumático ao longo da vida.

A gravidade dos sintomas também mostra-se acentuada nas mulheres, que tendem a apresentar transtornos de ansiedade com mais frequência e outras comorbidades psiquiátricas em comparação com os homens. Kinrys e Wygant

(2005) afirmam ainda que os fatores genéticos e os hormônios sexuais femininos podem desempenhar papéis importantes na expressão dessas diferenças de gênero.

Para elucidação da neurobiologia do medo podemos relatar que a amígdala, centro cerebral em forma de amêndoa localizado nas proximidades do hipocampo, tem conexões anatômicas importantes que permitem que ela integre informações sensoriais e cognitivas e determine então se vai haver uma resposta de medo onde o mesmo pode ser regulado pelas conexões recíprocas que a amígdala tem em comum com áreas-chave do córtex pré-frontal que regulam as emoções, pode-se identificar também reações motoras das conexões da amígdala com o tronco cerebral e endócrinas decorrentes da conexão com o hipotálamo alterando os níveis de cortisol (STAHL, 2010).

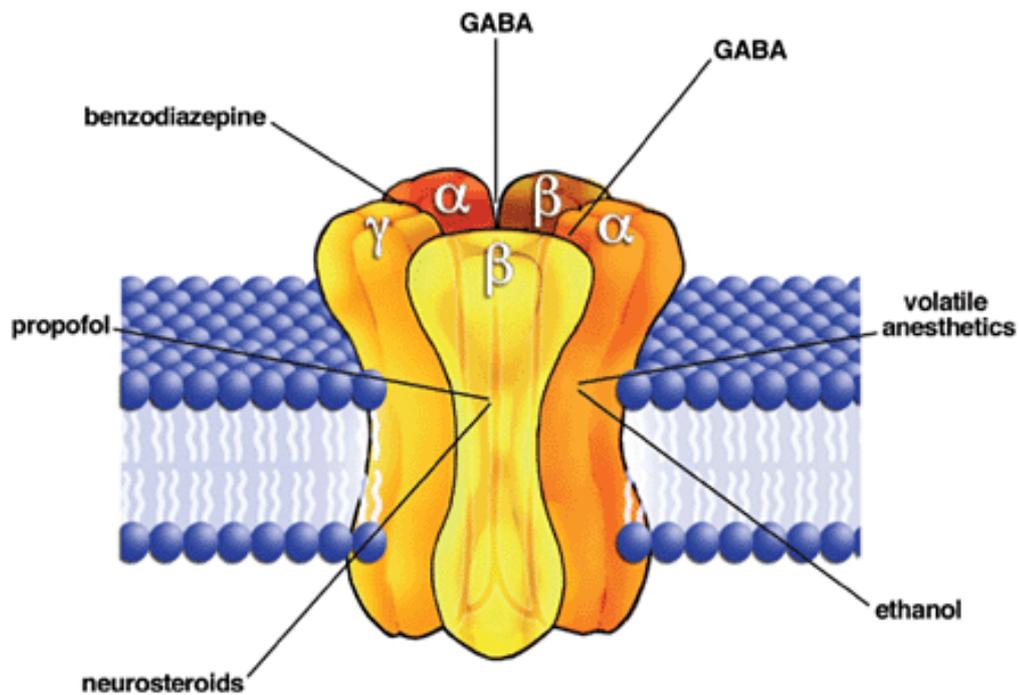
Respostas adaptativas ao medo de forma crônica e persistente podem desencadear um aumento a predisposição de algumas comorbidades como Doença arterial coronariana, Diabetes tipo 2 e Acidente Vascular Cerebral. Agudamente o sinal mais comum em resposta a situações de medo é um aumento da frequência respiratória o que pode levar a sintomas indesejados de dispneia, exacerbação de asma ou uma falsa sensação de estar sendo sufocado.

O tratamento da ansiedade abrange métodos psicoterapêuticos (psicoterapia comportamental, relaxamento), terapia comportamental e farmacológico, isoladamente ou em combinação. Dentre os fármacos utilizados no tratamento da ansiedade podemos citar os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (Fluoxetina, Sertralina, Fluvoxamina, Paroxetina), Antidepressivos tricíclicos, Inibidores da MAO, B-bloqueadores (no caso de ansiedade social), Bupirona e Benzodiazepínicos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001; FRICCHIONE, 2004)

Um agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade e exercer um efeito calmante com pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras ou mentais. Várias drogas ansiolíticas usadas rotineiramente, principalmente os benzodiazepínicos estão entre as classes de drogas que modulam alostericamente os receptores gabaérgicos do tipo GABA A (OLSON, 2002).

Segundo Christmas *et al.*, (2008) o ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e um grande número de agentes ansiolíticos atuam como agonistas deste receptor (**Figura 1**).

Figura 1: receptor GABA A



Fonte: <http://www.synapticplastic.com/2011>

Os benzodiazepínicos se ligam a um sítio alostérico do receptor GABA_A, causando uma mudança conformacional no receptor e aumentando a afinidade entre o GABA e o seu sítio receptor na subunidade B. O resultado é a abertura do canal cloreto, influxo de íons cloreto e consequente hiperpolarização da célula (FEREN, 2006).

Segundo tratamento de transtornos de ansiedade os benzodiazepínicos são amplamente utilizados e o alprazolam e o clonazepam possuem uma maior eficácia nos distúrbios do pânico e fobias (PANUS, 2011).

1.2 Depressão

A Depressão está se tornando uma das doenças que apresenta maior incidência atualmente. Mais de 350 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão ou problemas mentais e segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 o transtorno depressivo maior será a segunda maior causa de incapacidade no mundo (BRASIL, 2006).

Os seres humanos se entristecem ou se alegram com facilidade em decorrência de acontecimentos da vida. A depressão maior se caracteriza pela ocorrência de episódios depressivos, com pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse na maior parte das atividades, acompanhados de ao menos quatro sintomas adicionais de depressão, que incluem sentimentos de desesperança, desvalia, culpa, desamparo, associados a alterações de apetite e sono, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio e pensamentos recorrentes sobre a morte, com ou sem tentativas de suicídio (GUIMARÃES, 2001).

A depressão maior é uma das formas mais comuns da doença e pode levar à perda da independência funcional. Pessoas idosas com depressão tendem a apresentar maior comprometimento físico, social e funcional, afetando sua qualidade de vida. A idade pode ser um fator de risco para depressão, já que, com o avançar da idade, aumenta-se o risco de desenvolver doenças mentais, comprometendo também a capacidade funcional do indivíduo (STELLA, *et al.*, 2002).

Vários estudos apontam que a maior parte dos idosos que apresentam sintomatologia depressiva. Barrantes-Monge *et al.*, realizaram um estudo com 2.383 idosos e reportaram que a depressão está entre as mais frequentes comorbidades relacionadas com a dependência funcional. Outro estudo, realizado com 310 idosos residentes no nordeste do Brasil, ressalta a íntima dependência entre depressão e capacidade funcional, afirmando ser a limitação funcional um dos potenciais fatores associados ao aparecimento e ao agravamento dos quadros depressivos na população idosa (MACIEL, 2006).

A etiologia da depressão está relacionada a inúmeros fatores que podem abranger aspectos biológicos, socioeconômicos, mudanças ambientais, doença crônica, gravidez e após o parto onde episódios depressivos podem ocorrer após uma situação estressante ou de perda como em uma crise financeira, separação ou

morte de um ente querido, após uma situação estressante como um assalto, estupro ou sequestro. E ainda estes fatores podem ser agravados caso haja predisposição genética para o desenvolvimento da doença (MACIEL, *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009).

A depressão pode ainda ser desencadeada por algumas doenças físicas como: esclerose múltipla, derrame, hepatite, hipotireoidismo, apneia do sono, hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes, além das doenças terminais como câncer e AIDS. Alguns medicamentos e drogas também levam á depressão como: cortisona, anfetaminas, pílulas anticoncepcionais, quimioterapia, álcool, *crack*, *ecstasy*, maconha entre outros.

Em um estudo realizado com mulheres após a gravidez, demonstrou que a prevalência de depressão pós-parto encontrada foi de 19,1%. Os achados sugerem que baixas condições socioeconômicas de vida da puérpera e a não aceitação da gravidez são elementos-chave no desenvolvimento da depressão pós-parto (MORAES, 2006).

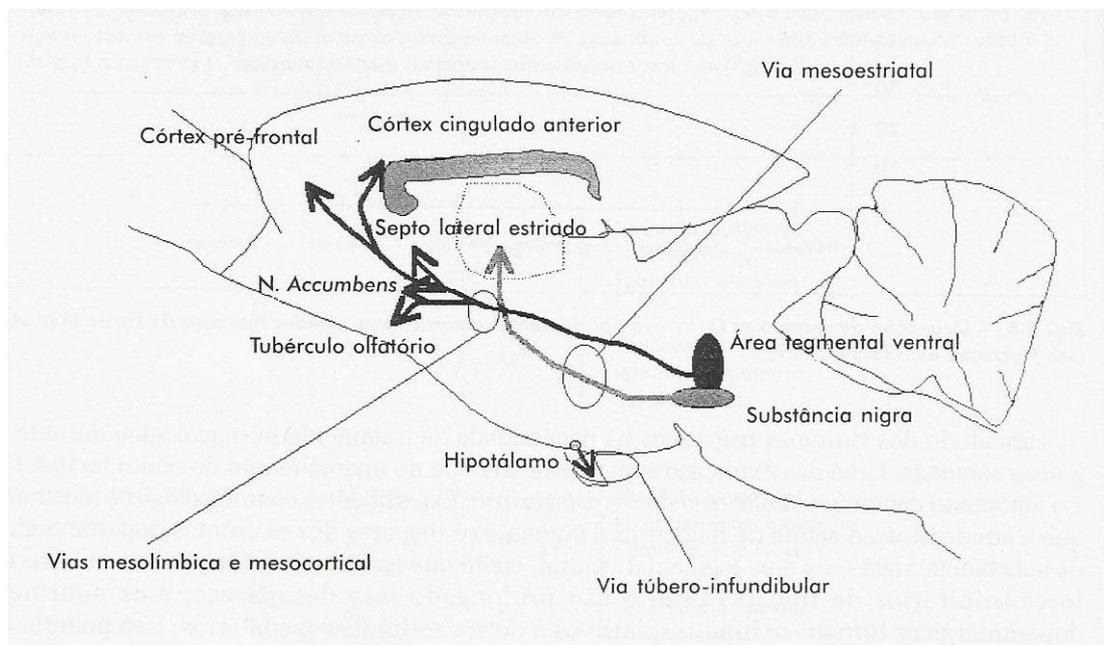
A depressão e a ansiedade segundo vários estudos são mais prevalentes entre as mulheres. Estas são queixas comuns também entre os idosos e muitas vezes apresenta-se como um resultado de uma combinação de fatores, incluindo a debilitação física, restrições de mobilidade, perda da vida social e comprometimento cognitivo (CALDAS, 2006). Em um estudo realizado por Santos *et al.*, 2012 com um grupo de idosos com média de idade de 77,02 anos, a prevalência de sintomas depressivos e prejuízo funcional foi de 30,5% e 63,8%, respectivamente, sendo maior entre as mulheres.

A patogênese da depressão maior está relacionada a teoria bioquímica da hipótese das 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 monoaminas que incluem as catecolaminas (dopamina e noradrenalina) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina). 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; KATSUNG, 2010).

Na depressão a dopamina, serotonina e outras substâncias químicas como a noradrenalina, ácido gama-aminobutírico e acetilcolina ficam alterados, desorganizando o estado de humor, as emoções, capacidade mental e o bem estar geral do organismo. Sobre as vias dopaminérgicas sabemos que via mesolímbica-mesocortical é a via mais relacionada ao comportamento e portanto importante na depressão (**Figura 2**) (ZUARDI, 2001; KATZUNG, 2008).

Figura 2: vias dopaminérgicas no encéfalo

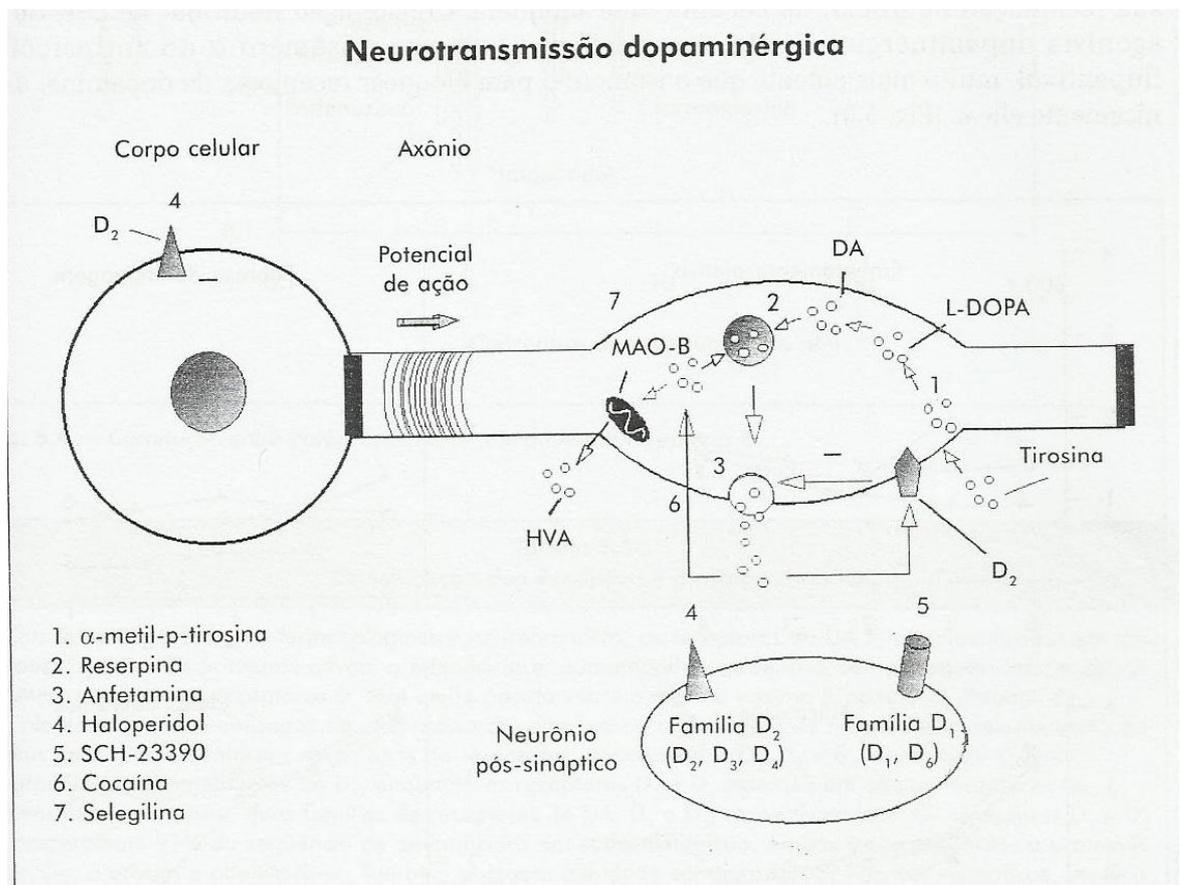


Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia. 2001

A dopamina é uma catecolamina cuja síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina. Esse aminoácido é transportado, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, primeiro em L-DOPA e posteriormente, pela ação da L-DOPA descarboxilase, em dopamina (DA). A dopamina é armazenada pelas vesículas sinápticas, quando chega o impulso nervoso a DA é liberada por processo de exocitose. Pós-sinápticamente ela pode atuar em receptores das famílias D1 (D1 e D5) ou D2 (D2, D3 ou D4). Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios, de

tipo D2 que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. Todos estes receptores são ligados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da DA da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase de tipo B (MAOB), sendo um de seus principais metabólitos o ácido homovalínico (HVA) (GUIMARÃES, 2001; GOLAN *et al.*, 2009; KATZUNG, 2010).

Figura 3: neurotransmissão dopaminérgica.

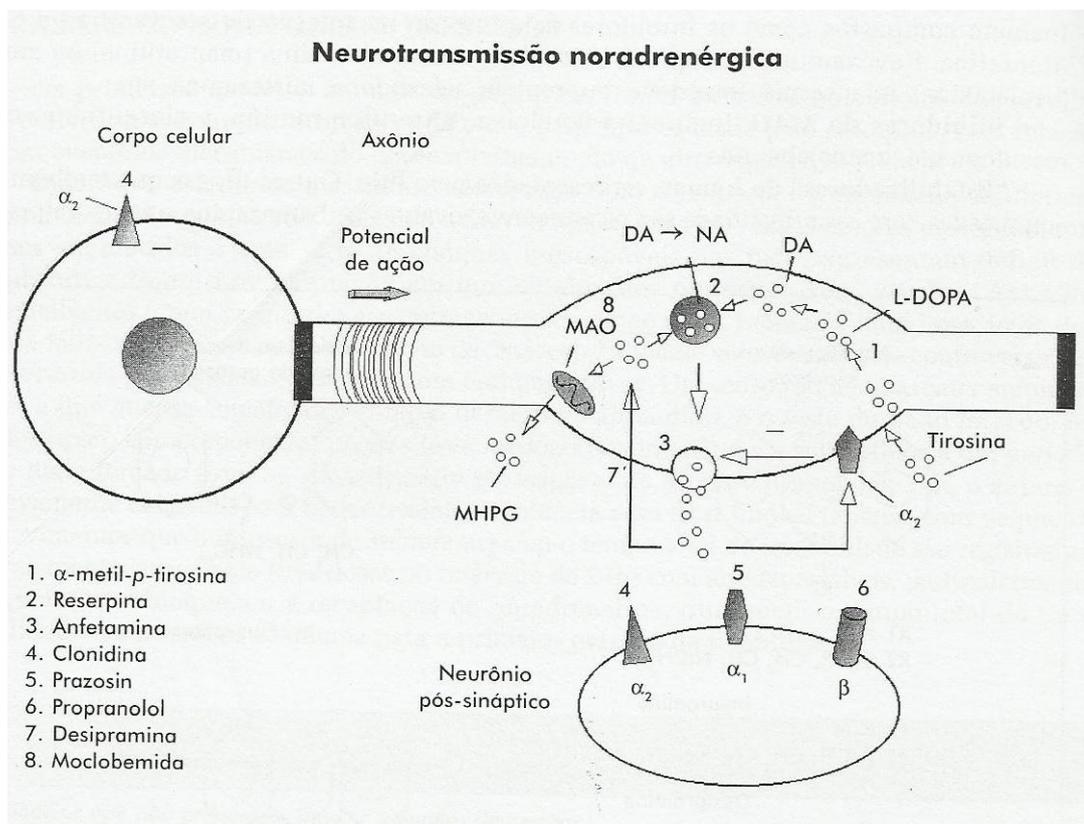


Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia. 2001.

A noradrenalina é uma catecolamina cuja síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina. Esse aminoácido é transportado, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, primeiro em L-DOPA e posteriormente, pela ação da L-DOPA descarboxilase, em dopamina (DA). A dopamina é captada pelas vesículas sinápticas e sob a ação da dopamina beta-descarboxilase é transformada em noradrenalina (NA). Quando se dá o impulso nervoso a NA é liberada por processo

de excitose. Pós-sinápticamente pode atuar em receptores chamados de alfa-1, alfa-2 e beta. Existem ainda receptores pré-sinápticos noradrenérgicos inibitórios de tipo alfa-2, que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. Todos esses receptores são ligados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da NA da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o 3-metoxi-4-hidroxifenil-etileno glicol (MHPG) (GUIMARÃES, 2001; GOLAN *et al.*, 2009; KATZUNG, 2010).

Figura 4: neurotransmissão noradrenérgica.

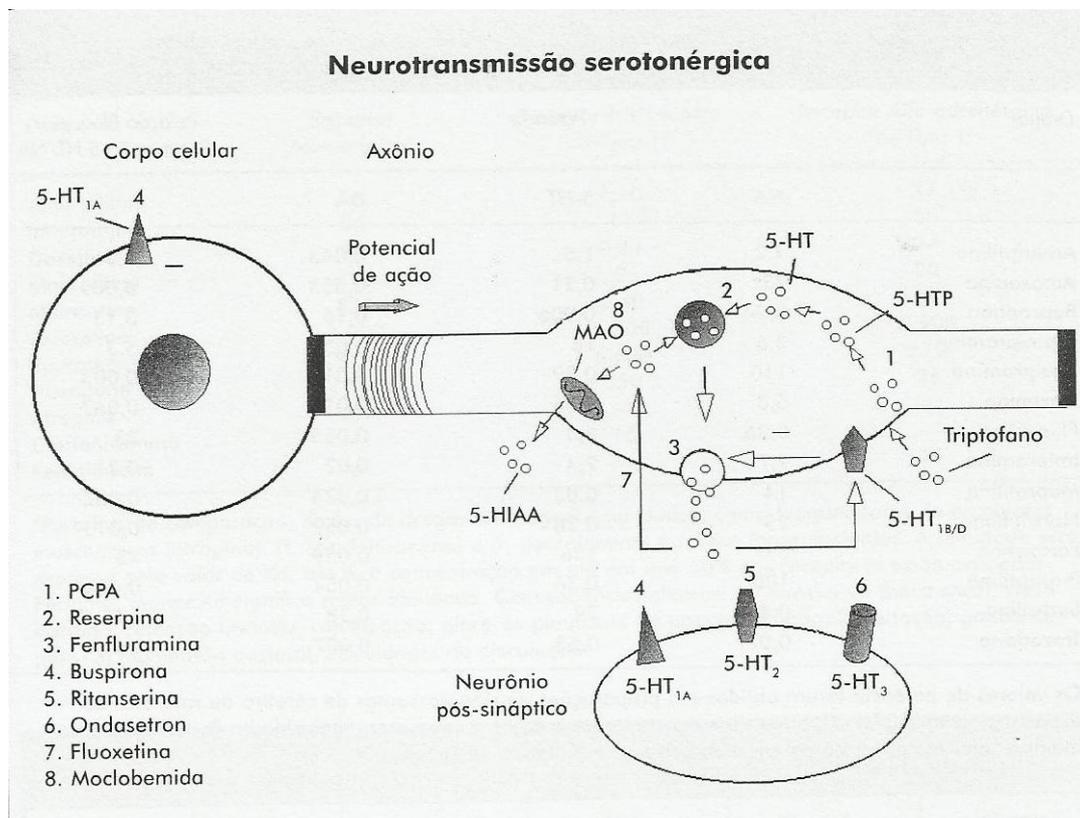


Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia. 2001.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina cuja síntese se inicia pela captação ativa do aminoácido triptofano. Ao sofrer ação da enzima triptofano hidroxilase, é transformada em 5-hidroxitriptofano e quase imediatamente, transformada em 5-HT pela ação de uma descarboxilase de aminoácidos. A 5-HT é

captada pelas vesículas sinápticas. Quando se dá o impulso nervoso é liberada por processo de exocitose. Pós-sinápticamente pode atuar em receptores chamados de 5-HT₁ (A, B, D ou E), 5-HT₂ (A, B ou C), 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅ (A ou B), 5-HT₆ ou 5-HT₇. Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios localizados, os do tipo 5-HT_{1A} nos corpos celulares e os tipos 5-HT_{1B} ou 5-HT_{1D} (dependendo da espécie), nos terminais nervosos dos neurônios serotoninérgicos. Todos esses receptores, à exceção dos 5-HT₃, ligados a canais iônicos, estão relacionados a proteína G. . O principal mecanismo de retirada da 5-HT da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) (GUIMARÃES, 2001; GOLAN *et al.*, 2009; KATZUNG, 2010).

Figura 5: neurotransmissão serotoninérgica.



Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia. 2001.

O mecanismo de ação dos principais fármacos antidepressivos está baseado no fato de serem capazes de aliviar os sintomas da depressão maior

potencializando as ações dos neurotransmissores nas sinapses no sistema nervoso central (PANUS, 2011; GOLAN *et al.*, 2009; KATZUNG 2010; STAHL, 2008).

O efeito agudo dos antidepressivos tricíclicos é inibir os mecanismos de recaptação do NET (transportador da Noradrenalina) e SERT (transportador da Serotonina), responsáveis pelo término das ações sinápticas da NE e 5-HT no cérebro, sendo provável que tal ação resulte na potencialização das ações do neurotransmissor nos receptores pós-sinápticos. Os antidepressivos heterocíclicos são alguns fármacos que têm efeito sobre a recaptação de noradrenalina e outros que tem mais efeito sobre a recaptação de 5-HT, serotonina (PANUS, 2011; STAHL, 2008; KRISHNAN; NESTLER, 2008)

Os inibidores da monoaminoxidase aumentam os níveis de amina no cérebro, inibem a MAOA que metaboliza a noradrenalina e 5-HT, bem como a MAOB que metaboliza a dopamina. São indicados para pacientes com ansiedade significativa, fobias e hipocondria (PANUS, 2011).

A serotonina está ligada a sentimentos de bem estar ou mal estar. Ela regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo cardíaco, as funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas. Os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina - ISRS, produzem um efeito agudo com uma ação altamente seletiva nos transportadores da 5-HT, pois bloqueiam a recaptação sem afetar a recaptação de outras animas neurotransmissoras e por causa de sua seletividade produzem menos efeitos adversos desagradáveis do que os fármacos antidepressivos não seletivos (PANUS, 2011; STAHL, 2008).

Segundo Mulder *et al.*, (2009) a resposta ao uso de antidepressivos é variável, podendo ser mais rápida ou mais demorada, dependendo do paciente, no entanto sabemos que no tratamento com ISRS e IMAO a transmissão monoaminérgica é aumentada de maneira imediata embora seus efeitos antidepressivos demorem semanas para se desenvolver devido a uma infra regulação (redução) inicial na atividade de alguns neurotransmissores e podem ser necessárias semanas para que alcancem os efeitos clínicos desejáveis.

Os efeitos indesejáveis mais comuns entre os fármacos antidepressivos são pouco expressivos, porém podem comprometer seriamente a adesão do paciente ao tratamento, como: sonolência ou insônia, tremores, prisão de ventre,

visão borrada, ganho de peso, distúrbios sexuais, vertigem, dentre outros (ALLEN, 2004).

1.3 Convulsão e Epilepsia

As convulsões são episódios de duração limitada da disfunção cerebral que provém de uma descarga anormal temporária dos neurônios no cérebro. Uma variedade de doenças neurológicas podem causar convulsões incluindo tumores, traumatismos crânio encefálicos e Acidente Vascular Encefálico (AVE). Anormalidades congênitas e fatores genéticos, bem como acometimento tóxico agudo ou metabólico sistêmico subjacente a processos infecciosos, hipoglicemia, hipóxia e envenenamento também estão envolvidos na etiologia das convulsões (BACKONJA, 2002)

Segundo Lopes, 2009 a convulsão pode ser caracterizada como um breve episódio de inconsciência, apresentando atividade motora e experiência sensorial ou comprometimentos impróprios ocasionados por disfunção do sistema elétrico do cérebro e onde classicamente ocasiona contrações musculares involuntárias tônica ou clônica.

A Epilepsia compreende um grupo de síndromes crônicas que envolve convulsões recorrentes. Aproximadamente 1% da população mundial tem epilepsia, e é considerado o segundo distúrbio neurológico mais comum depois do AVE. Embora a terapia padrão controle as crises em 80% dos pacientes estima-se que 500.000 pessoas nos EUA sofram com a epilepsia sem controle medicamentoso adequado (LEVY *et al.*, 2002).

A diversidade das causas de Epilepsia dificulta a terapia medicamentosa pois dependendo do tipo de epilepsia, pois o tratamento pode ser eficaz em uma forma e totalmente ineficaz em outra (PANUS, 2011).

Na ausência da terapia medicamentosa as convulsões sem controle são extremamente desagradáveis, prejudicam o controle social, podem danificar severamente os neurônios e levar até a morte do indivíduo. A procura de novas terapias medicamentosas busca encontrar fármacos eficazes para controlar ou eliminar as convulsões sem provocar muitos efeitos adversos como sedação e letargia (MARKS *et al.*, 2003).

1.4 Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas como base para o desenvolvimento e aprimoramento da terapêutica por fornecerem várias substâncias químicas que compõem os medicamentos alopáticos (LEDA, 2011). A grande maioria dos medicamentos hoje disponíveis no mundo é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo da pesquisa científica (ANVISA, 2011).

Historicamente as plantas medicinais estão associadas a sabedoria popular e a cultura de povos antepassados que se utilizavam de uma medicina caseira e empírica como forma curativa para quase todos os problemas de saúde. Ao longo dos anos as plantas medicinais tem se tornado um grande alvo para a indústria farmacêutica e institutos de pesquisa que desenvolvem estudos com diversos fármacos. Isto é devido as plantas serem fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos com diversas estruturas e propriedades físico-químicas, onde muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos.

O uso de algumas substâncias naturais demonstraram efeitos farmacológicos que foram posteriormente estudados e deram origem a importantes fármacos que atualmente são utilizados amplamente com indicações precisas, pois passou-se a isolar as moléculas ativas e reproduzi-las em escala industrial. Podemos citar um dos fármacos utilizados amplamente na terapêutica que foi obtido a partir de plantas como a Morfina um potente analgésico que é extraído do ópio bruto, obtido da vagem da papoula do ópio (*Papaver somniferum*) (**Figura 6**). (BENEDETTI; PREMUDA, 2011).

O objetivo primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais da saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com menos efeitos colaterais e espectro de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes (MELO, 2006).

Neste contexto podemos relatar que a fitoterapia é a área do conhecimento que busca a cura das doenças através das plantas medicinais e apesar de seu uso ter uma propagação associada ao conhecimento popular

empírico, paulatinamente vem sendo reconhecido e incorporado ao saber científico (DANTAS, 2006).

A Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos em 1978. No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos remonta de 1981 por meio da Portaria n.º 212, de 11 de setembro, do Ministério da Saúde que define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica e foi em 1982 que o Ministério da Saúde lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais para obter o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais (ANVISA, 2011).

A criação de uma política para o segmento de plantas medicinais no Brasil (Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF) e uma outra que regulamenta o uso no SUS (Política de Práticas Integrativas e Complementares - PNPIC) tem justamente o intuito de ordenar as atividades, atender aos movimentos sociais em prol de seu reconhecimento pelo Ministério da Saúde (MS) e proteger o usuário, tendo em vista a necessidade de reorganizar as práticas de saúde a partir da compreensão de que a saúde da população é resultante da forma com que a sociedade se organiza, considerando as suas dimensões econômica, política e cultural. Podemos, então, identificar o projeto FarmáciasVivas®, iniciativa pioneira idealizada pelo Prof. Francisco José de Abreu Matos, da Universidade Federal do Ceará, que tem por objetivo atender pequenas comunidades usando plantas nativas/adaptadas a um determinado bioma brasileiro que podem ser utilizadas diretamente nos cuidados primários de saúde.

O desenvolvimento de novos medicamentos pode se apoiar no uso tradicional de alguma espécie medicinal, sendo hoje reconhecida como uma importante área de pesquisa: a etnofarmacologia (LEDA, 2011). Cujos trabalhos mostram que um número muito maior de espécies vegetais vem sendo utilizado e que muitos estudos devem ser feitos no sentido de validar o uso dessas espécies, identificando seus componentes ativos e seus mecanismos de ação.

Figura. 6- *Papaver somniferum*.



Nota: A morfina é um dos mais antigos constituintes químicos vegetais que se conhece. É obtida do ópio, que por sua vez é preparado a partir do látex da papoula.
Fonte: <http://technix-inquisitive.blogspot.com.br/2010>

1.4.1 *Lippia sidoides*

A *Lippia sidoides* é uma planta da família *Verbenaceae* que pode ser encontrada do Nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, popularmente conhecida como alecrim pimenta que contém em sua composição um óleo essencial rico em Timol e Carvacrol. Ela foi caracterizada como matéria prima para uso em produtos farmacêuticos quando se realizou ensaios de perda por dissecação, teor de óleo essencial e perfil cromatográfico, visando à variação de sua utilização e a caracterização de sua identidade (NUNES, 2005).

Seu óleo essencial contém principalmente timol e carvacrol, que confere a esta planta uma forte ação anti-séptica contra fungos e bactérias (RADÜNZ, 2001). O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) é uma planta muito usada pela medicina popular como antimicrobiano e antifúngico e que já foi tema de diversas pesquisas científicas

que comprovaram suas propriedades benéficas. Sobre seus óleos essenciais se destaca o timol, em 60% da composição e carvacrol, dois terpenos fenólicos que tem boa atividade antibiótica e antimicótica. Também contém flavonóides e quinonas que lhe dão carácter anti-séptico.

O gênero *Lippia* consiste em aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos pertencentes à família Verbenaceae (TERBLANCHÉ e KORNELIUS, 1996). A *Lippia sidoides*, vulgarmente conhecida como alecrim-pimenta, também é denominada alecrim-do-nordeste, alecrim bravo e estrepa-cavalo, destaca-se entre as espécies nativas do nordeste brasileiro com importância econômica (INNECCO *et al.*, 2000; MATOS, 2002).

É um arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, que mede de 2 a 3 metros de altura. Suas folhas apresentam forte cheiro picante, as flores são pequenas, esbranquiçadas. As folhas e flores constituem a principal parte medicinal desta planta. Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, sendo constituído por timol ou uma mistura de timol e carvacrol, dois terpenos fenólicos com fortíssima propriedade anti-séptica e antimicrobiana (MATOS, 2000).

A *Lippia sidoides* é popularmente usada como anti-séptico e possui forte atividade antimicrobiana (LEMOS *et al.*, 1990), possuindo também atividade citotóxica (COSTA *et al.*, 2001). O Timol possui atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (MATOS, 2007) e é capaz de inibir a peroxidação dos lipossomos fosfolipídicos (AESCHBACH *et al.*, 1994), sendo um potente antioxidante. Os resultados obtidos no estudo de Silva *et al.* (2010) mostram que o extrato da *Lippia sidoides* possui potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*.

Os resultados de sua análise fitoquímica registram elevado teor de óleo essencial cujo componente ativo principal é o timol, substância de alto poder antiséptico contra fungos e bactérias com forte ação moluscicida e larvicida, útil no combate ao caramujo vetor de esquistossomose e do mosquito da dengue, *Aedes aegypti*. Dentre seus componentes químicos fixos foram identificados também flavonoides que certamente contribuem para a sua atividade biológica, inclusive contra células leucêmicas de origem humana *in vitro* (MATOS, 2007).

Figura. 7: Alecrim-pimenta (*Lippia Sidoides*)

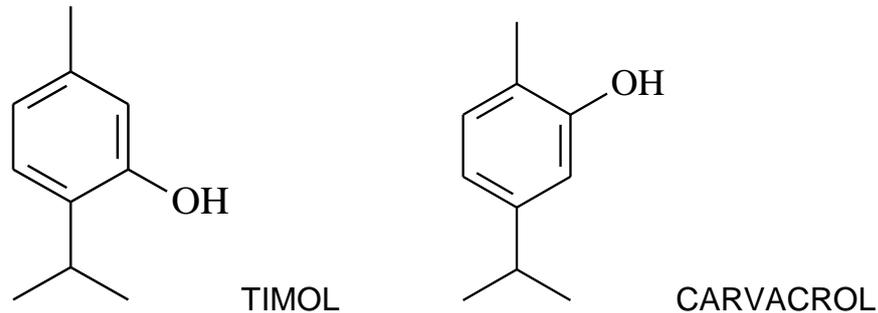


Fonte: <http://royal-stuart.com/garden>

1.4.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são substâncias lipossolúveis, porém voláteis, que integram o metabolismo das plantas e são diferenciadas. Produzidos por estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, canais oleíferos, células parenquimáticas ou em bolsões, que podem estar em todas as partes da planta como nas folhas, flores, frutos, casca do caule e raízes (AZAMBUJA, 2011). Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas e exercem funções vitais para os vegetais como papel fundamental na defesa contra microorganismos (SIQUI *et al.*, 2000). Na complexa composição dos óleos essenciais destaca-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (SILVA *et al.*, 2007).

Figura 8: Estrutura química do Timol e Carvacrol



Fonte: <http://www.scielo.br/scielo.php>

O timol é um monoterpene extraído do óleo essencial de diversas plantas aromáticas como *Satureja montana*, *Satureja parvifolia* (MASTELIC *et al.*, 2008), sendo o componente principal do óleo essencial do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), constituindo aproximadamente 48% da sua composição (SOUSA *et al.*, 2002).

Diversos tipos de substâncias químicas participam da composição desses óleos, destacando-se ésteres de ácidos graxos, monoterpenos e sesquiterpenos, fenilpropanonas, álcoois aldeídos e hidrocarbonetos alifáticos. A composição do óleo essencial de uma espécie particular de planta pode diferir entre as épocas de colheita e entre as origens geográficas (JULIANO *et al.*, 2000).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os maiores produtores mundiais. A representatividade nacional se faz através da ABRAPOE (Associação Brasileira de Produtores de Óleos Essenciais) que busca, entre outras metas, colaborar na aproximação entre os produtores e os centros de pesquisa nacionais para agregar qualidade aos óleos através de pesquisa e estudos de padronização, fornecendo dados atualizados de mercado e representando a área frente aos órgãos e programas governamentais (BIZZO *et al.*, 2009).

Várias substâncias extraídas de produtos naturais possuem atividades farmacológicas. Os monoterpenos, presentes nos óleos essenciais, são em parte responsáveis por essas atividades, podendo as mesmas serem analgésicas (AMARAL *et al.*, 2007), anticonvulsivantes (ALMEIDA *et al.*, 2003), ansiolíticas (SILVA *et al.*, 2007), entre outras.

Pesquisas experimentais demonstraram que diversos monoterpenos extraídos de óleos essenciais possuem atividade no Sistema Nervoso Central (SILVA *et al.*, 2007). O isopulegol, por exemplo é um monoterpeno intermediário na preparação de (-)-mentol e que está presente em óleos essenciais de várias plantas, que demonstrou efeitos antidepressivos e ansiolíticos em modelos animais de depressão e ansiedade (SILVA *et al.*, 2007). Carvacrol é outro exemplo de monoterpeno que é isômero do Timol, que apresentou efeito ansiolítico (MELO *et al.*, 2009), antidepressivo (MELO *et al.*, 2010) e ainda antinociceptivo em modelos animais através de vários testes entre eles o da nocicepção (MELO *et al.*, 2012).

1.4.3 Timol

O timol é uma substância cristalina e acredita-se que foi descoberto por Caspar Neumann em 1719. O produto químico foi sintetizado na forma pura em 1842 por M. Von Lallemand, que usou a análise química elementar para caracterizá-lo, determinando a proporção correta de carbono, hidrogênio e oxigênio que compõem a molécula de timol. Friedlieb Ferdinand Runge também estudou a química da substância. Alain Thozet e M. Perrin publicaram pela primeira vez a análise da estrutura de cristal com a determinação exata dos átomos estruturais (DORMAN; DEANS, 2000).

Devido a sua estrutura fenólica, Timol demonstrou atividade antibacteriana contra cepas de bactérias, incluindo *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* (DORMAN; DEANS, 2000). Esta atividade antibacteriana é causada por inibir o crescimento da produção de lactato, e diminuindo a absorção de glicose celular (EVANS, 2000).

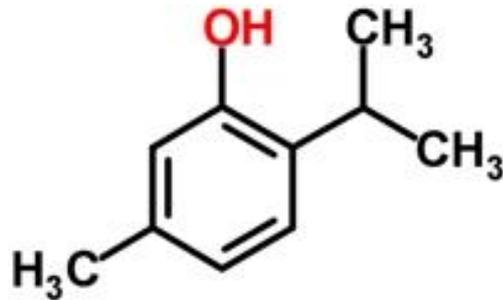
O timol tem sido utilizado em soluções de álcool e em pó para o tratamento de infecções micóticas, e foi usado nos Estados Unidos para o tratamento de infecções por parasitas é também utilizado como um conservante em halotano, um anestésico, e como um antisséptico em bochechos. Quando utilizado para reduzir a placa e gengivite, timol apresentou mais eficácia quando usado em combinação com clorexidina do que quando usado puramente por si só. timol é também o ingrediente ativo anti-séptico, em alguns cremes dentais, tais como Euthymol (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005).

A atividade antifúngica justifica-se e é evidenciada pelo fato de que o timol é lipofílico, permitindo-lhe interagir com a membrana celular de células de fungos, alterando a permeabilidade da membrana da célula permitindo a perda de macromoléculas (KLARIC *et al.*, 2007).

O Timol (Ac. Tímico, isopropilmetacresol), um isômero do Carvacrol, possui características similares a um fenol, com odor aromático e gosto picante (GUILLEN *et al.*, 2007; KHANNA *et al.*, 1988). Ambos, apresentam-se como cristais incolores grandes ou pó cristalino branco com aroma irritante. Também chamado de 2-isopropil-5-metil-fenol, o timol é um terpeno de fórmula química C₁₀H₁₄O (**Figura 9**). Trata-se de uma substância encontrada no orégano e no tomilho. Amplamente usado como controlador de larvas e fungos, assim como flavorizante em cigarros e em pequena escala, em alguns alimentos. Os compostos com estruturas fenólicas tais como timol, possuem alta atividade *in vitro* contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (DORMAN; DEANS, 2000). Estudos de Botelho *et al.*, (2007) demonstraram que o timol inibiu crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Timol e carvacrol, seu isômero, inibiram o crescimento de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (NOSTRO *et al.*, 2007), apresentaram efeito antioxidante sobre hexanos (LEE *et al.*, 2005) e efeito relaxante sobre o músculo liso da aorta (PEIXOTO-NEVES *et al.*, 2010).

Carvacrol e Timol inibem a peroxidação de lipossomos fosfolipídicos. Os fenólicos voláteis são eficazes na atividade antimicrobiana (bactérias e fungos) e antimicótica, são conservantes naturais de alimentos e possuem alta atividade antioxidante que foi comprovada mais eficaz do que vários antioxidantes sintéticos como BHA e BHT (MILOS *et al.*, 2000; TEISSEDRE; WATERHOUSE, 2000; MASTELIĆ *et al.*, 2008).

Figura 9- Estrutura molecular do timol



Fonte: oleos essenciais.org

O timol é o segundo constituinte mais abundante (25,16%) no óleo essencial de *Satureja thymbra* o qual apresentou atividades, bactericida, fungicida, bacteriostática e fungistática (GIWELI *et al.*, 2012). Verificou-se a atividade repelente do timol, mentol, ácido salicílico e salicilato de metila sobre larvas de *Boophilus microplus*. Essas substâncias foram usadas em emulsões em dimetilsulfóxido aquoso a 1% ou solução aquosa (NOVELINO *et al.*, 2007).

Begrow *et al.*, (2010) relataram que o timol e carvacrol são responsáveis pelo efeito antiespasmódico do extrato da planta *Thymus vulgaris* em íleo e traqueia. Enquanto Jukic *et al.*, (2007) relataram atividade inibitória do timol e derivados, timoquinona e timohidroquinona, sobre a atividade da acetilcolinesterase.

Adicionalmente, timol e carvacrol aliviaram os danos cognitivos causados por níveis aumentados de beta-amilóide ou hipofunção colinérgica em ratos. Atividades anticolinesterase, antioxidante, e anti-inflamatória podem ser os mecanismos que contribuem para tais efeitos benéficos (AZIZI *et al.*, 2012).

Segundo Veras *et al.*, (2012), o óleo essencial e seu constituinte majoritário, timol, influenciam a atividade de aminoglicósidos e podem ser utilizados como adjuvantes na terapia antibiótica contra bactérias patogênicas do trato respiratório. Timol apresentou efeito antiinflamatório tópico em edema de orelha de rato neste mesmo estudo.

Pesquisas mostraram que diversos monoterpenos extraídos de óleos essenciais possuem atividade no sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2007). Sabe-se também que o carvacrol e o timol são isômeros estruturais, diferenciando-

se apenas na posição do grupo hidroxila no anel aromático. Carvacrol demonstrou resultados satisfatórios em modelos experimentais de ansiedade (MELO, 2009) e depressão (MELO, 2010). Levando em consideração tais achados e até onde se sabe, não existem estudos sobre suas ações no SNC, torna-se relevante estudar este monoterpene em modelos animais de ansiedade, depressão e convulsão.

1.5 Modelos Animais

Os estudos na área da Farmacologia que utilizam um percurso metodológico baseado em modelos animais são fundamentados na Farmacologia Comportamental que usa conceitos e técnicas derivadas tanto da Farmacologia clássica quanto da Psicologia, para estudar as interações entre drogas e comportamentos (LAPA *et al.*, 2008).

Lapa *et al.*, 2008 relata ainda que alguns estudos investigam processos comportamentais ou psicológicos que são alterados pela administração de drogas. Entre estes estão os estudos que determinam quais drogas e que doses alteram a atividade locomotora, o comportamento alimentar, sexual e a agressão por exemplo. Outros estudos dizem respeito ao entendimento dos substratos neurobiológicos que medeiam efeitos comportamentais específicos como no medo e na dor.

A interação das abordagens comportamentais ou psicológicas com a investigação neurobiológica provê a base para o estudo sistemático das ações de drogas pertinentes aos seus efeitos clínicos em humanos. Neste estudo utilizamos testes comportamentais em animais que predizem um possível efeito das drogas relacionados à ansiedade, depressão e convulsão que são condições patológicas típicas dos seres humanos.

A ansiedade induz a forma particular de inibição comportamental, que ocorre em repostas aos eventos ambientais que são novos não recompensadores em condição que a recompensa é esperada ou a punição. Em animais esta inibição comportamental pode tomar a forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta comportamental, tal como pressionar uma alavanca para obter comida. Portanto para desenvolver novos fármacos ansiolíticos é importante realizar testes com animais que forneçam uma semelhança com o comportamento dos seres humanos (RANG *et al.*, 2012)

Em animais não há condição conhecida que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos, mas vários procedimentos foram descritos que produzem em animais estados comportamentais típicos da depressão humana como a retirada da interação social, perda do apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis, entre outros (PORSOLT *et al.*, 1987).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O uso de produtos provenientes da natureza como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, vem sendo citados ao longo do tempo. É de interesse dos pesquisadores, estudarem substâncias isoladas de plantas, por apresentarem grande potencial no mercado, A obtenção de novos fármacos, adjuvantes ou medicamentos fitoterápicos, mais eficazes e seguros pois de fundamental importância e para isto é relevante que haja estudos pré-clínicos de *screening* de novas drogas com potencial terapêutico.

Timol é um monoterpeneo isolado do óleo essencial de muitas plantas e tem o seu efeito descrito por exemplo como agente antimicrobiano e antiinflamatório, porem seus efeitos no SNC até onde se sabe, ainda não foram investigados. Considerando a importância de estudos pré-clínicos em busca de novas terapias para os transtornos mentais, foi proposto no presente trabalho, investigar as ações comportamentais do Timol em vários modelos experimentais relacionados a ação central, tais como testes relacionados com depressão , ansiedade e convulsão.

Uma outra razão para a investigação dos efeitos o timol no SNC, foi a demonstração dos efeitos centrais do carvacrol, um isômero estrutural do timol (MELO, 2010).

Resultados positivos da ação central do timol poderão posteriormente serem a base para a realização de estudos clínicos em seres humanos e quem sabe futuramente a implementação deste fármaco de origem natural para tratamento de distúrbios neurocomportamentais. Na prática clínica os fármacos sedativos-hipnóticos, antidepressivos e ansiolíticos, interferem na reabilitação física de pacientes que apresentam diversos estados patológicos. A busca de novos fármacos de origem natural torna-se necessária também com o objetivo de otimizar a terapêutica na redução dos efeitos adversos e no favorecimento da reabilitação física destes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo do presente projeto foi investigar a ação central do Timol em modelos experimentais de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos.

3.2 Específicos

- Estudar a ação do Timol em camundongos no modelo comportamental de ansiedade utilizando o teste do labirinto em cruz elevado.
- Avaliar se o timol interfere na atividade locomotora espontânea e/ou na atividade relaxante muscular utilizando os testes do campo aberto e *rota rod*, respectivamente.
- Investigar a ação do Timol em camundongos nos modelos comportamentais de depressão utilizando os testes do nado forçado e suspensão da cauda.
- Verificar se o timol apresenta atividade Sedativa/Hipnótica e/ou Anticonvulsivante utilizando os testes do tempo de sono induzido por pentobarbital e o teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, respectivamente.
- Estudar os possíveis mecanismos envolvidos nas suas ações ansiolíticas e antidepressivas, caso estas sejam demonstradas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Óleo Essencial

O óleo essencial de timol (*5-methyl-2-isopropylphenol*) fórmula química: C₁₀H₁₄O, foi utilizado nos experimentos deste estudo com, em forma de pó cristalizado produzido pela empresa Sigma-Aldrich.

4.2 Drogas e Reagentes

Quadro 1- Drogas e Reagentes

Drogas/ Reagente	Origem
Água Destilada	Deionizador
Álcool Etílico P. A.	Quimex, Brasil
Bupropiona	Geigy
Imipramina	Geigy
Diazepam	União Química Brasil
Fluoxetina	Geigy
Flumazenil	Sigma
PCPA	Sigma
Prazosina	Sigma
loimbina	Sigma
SCH 23390	Sigma
Sulpirida	Sigma
Pentobarital	Abott
Pentilenotetrazol	Sigma
Timol	Sigma
Tween 80	Sigma

4.3 Equipamentos

Quadro 2- Equipamentos

Equipamentos	Modelo/Origem
Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Campo aberto	Fabricado pelo laboratório
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Estufa de secagem e esterilização	Modelo 315 SE FANEN, Brasil
Labirinto em Cruz Elevado	Fabricado pelo laboratório
Recipiente do Nado Forçado	Fabricado pelo laboratório
<i>Rota Rod</i>	Ugo Basile, Itália
Pipetas automáticas	H. E., Dinamarca
Vidrarias	Pirex, Brasil

4.4 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram Camundongos albinos da espécie *Mus musculus* e da variedade Swiss, adultos, do sexo masculino, pesando aproximadamente 25 a 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, onde os mesmos foram mantidos em caixas de propileno em um biotério com controle de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso a comida e água. Este estudo foi submetido e aprovado com o no. 30/2011 pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.5 Preparo da droga e vias de administração

O Timol foi dissolvido em 2% de Tween 80 e diluído em água destilada, obtendo a concentração final de 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, que correspondem as doses de 25mg/kg e 50mg/Kg respectivamente. Ambas as doses foram administradas por via oral (v.o.). Os grupos controle receberam veículo (água

destilada emulsificada com 2% de 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), loimbina (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 e administradas por via intraperitoneal. O volume total de solução administrada nos animais foi de 10mL/Kg.

4.6 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com Timol, de forma aguda, nas doses de 25mg/kg e 50mg/Kg através de via oral, 60 minutos antes dos experimentos. Os testes foram realizados após 30 minutos dos tratamentos administrados por via intraperitoneal ou 60 minutos após o tratamento por via oral. As alterações comportamentais foram avaliadas utilizando os testes do “campo aberto”, “labirinto em cruz elevado”, “*rota rod*”, “nado forçado”, “suspensão da cauda”, “tempo de sono induzido por pentobarbital” e “convulsão induzida por pentilenotetrazol” para a investigação de possíveis efeitos do timol no sistema nervoso central.

Para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizada imipramina 10 mg/Kg (i.p.) e 30mg/Kg (i.p.) e bupropiona 30mg/Kg (i.p.), nos testes do nado forçado e da suspensão da cauda, como padrões positivos. Diazepam 1mg/Kg (i.p.) foi utilizado como referência ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado o flumazenil 2,5mg/Kg (i.p.) para avaliação do envolvimento gabaérgico. Diazepam 2 mg/Kg (i.p.) foi utilizado nos testes do campo aberto e *rota rod*, como droga padrão.

Diazepam 1mg/Kg (i.p.) foi ainda utilizado nos modelos de tempo de sono induzido por pentobarbital 40mg/Kg (i.p.) como padrão para atividade sedativa ou anticonvulsivante no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol 80mg/Kg (i.p.)

4.7 Protocolo Experimental

Os experimentos foram realizados durante o dia em dias distintos, onde diferentes grupos de animais foram observados em um ambiente fechado, silencioso e à temperatura constante de aproximadamente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Para o teste do labirinto

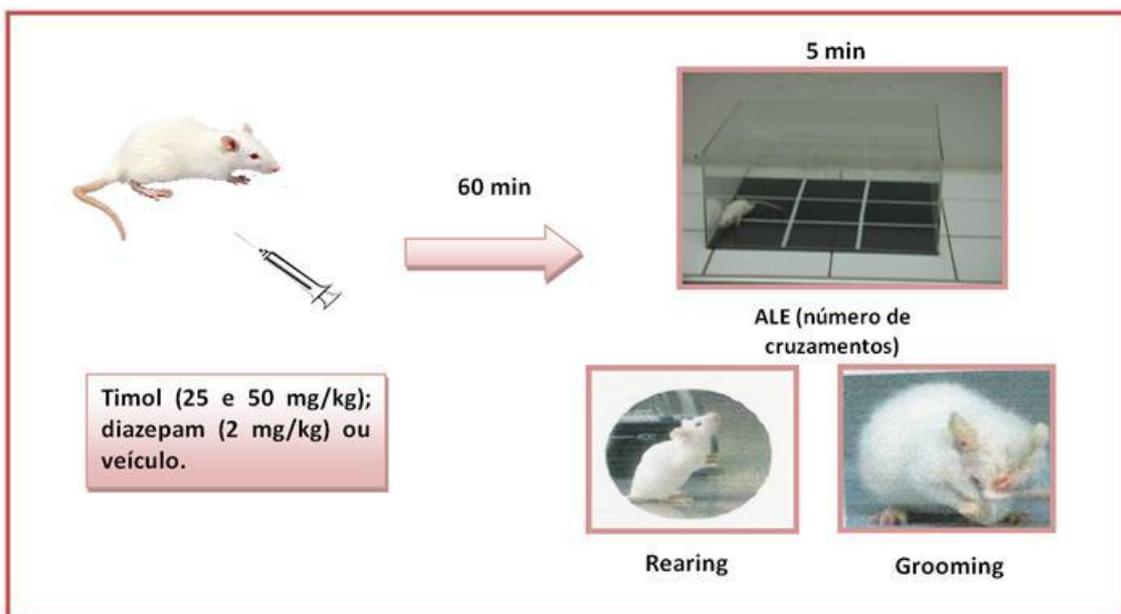
em cruz elevado foi utilizada uma iluminação de baixa densidade (lâmpada vermelha de 15 W). Os demais experimentos foram realizados com iluminação normal. Em todos os testes com exceção apenas do nado forçado e da suspensão da cauda após a observação de cada animal foi utilizado álcool 70% para a remoção de resíduos e odor deixados pelo animal.

4.7.1 Avaliação da atividade locomotora

4.7.1.1 Teste do Campo Aberto

Experimento utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Os parâmetros para observação foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), registrados durante um tempo de 5 minutos. Após 60 minutos do tratamento por via oral os animais foram submetidos ao campo aberto para avaliação dos parâmetros comportamentais. Além dos grupos tratados com o Timol, um grupo foi tratado com diazepam 2 mg/kg (i.p.) como controle positivo. Os animais controle foram tratados com solução de Tween 80 a 2%, usado como veículo.

Quadro 3 - Teste do campo aberto em camundongos



4.7.2 Avaliação da Atividade Relaxante Muscular

4.7.2.1 Teste do Rota Rod

Neste teste, 60 minutos após a administração de Timol nas duas doses estudadas, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevado a 25 cm do piso, nas rotações de 15 e 30 rpm. Para cada animal foi registrado o tempo de permanência na barra, em um período de até 2 minutos (DUNHAM e MIYA, 1957). O diazepam 2mg/kg (i.p.) foi utilizado como padrão positivo.

Quadro 4 - Teste do *rota rod* em camundongos



Fonte: adaptado de Melo, 2006

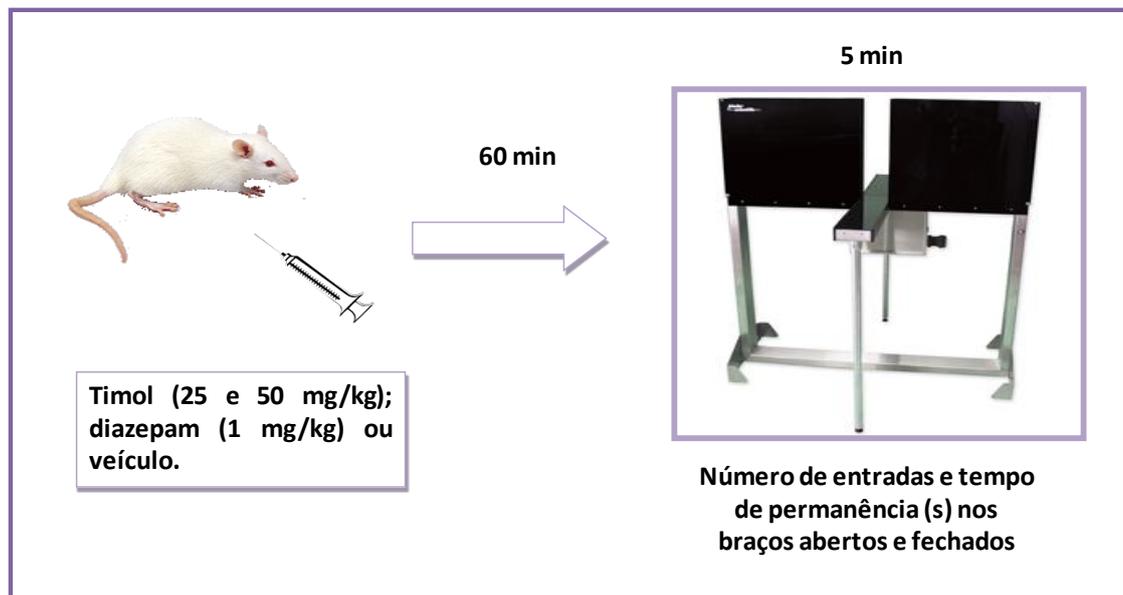
4.7.3 Avaliação da Atividade Ansiolítica

4.7.3.1 Teste de labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*)

Cada animal, após 60 minutos do tratamento com Timol (v.o.), foi colocado na plataforma central direcionado para um dos braços fechados como descrito por Pellow *et al.* (1985). Durante 5 minutos, foram observados os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de

permanência do animal em cada um desses braços. A percentagem do tempo de permanência em cada braço foi calculada utilizando-se a razão do tempo em cada um dos braços e o tempo total de permanência em ambos os braços. A percentagem do número de entradas foi calculada usando a razão entre o número de entradas em cada um dos braços e o número total de entradas nos braços abertos e fechados. Além dos grupos tratados com o Timol, um grupo foi tratado com diazepam 1 mg/kg (i.p.) como controle positivo. Para a investigação do mecanismo de ação ansiolítico, foi utilizado um grupo de animais tratados com flumazenil 2,5mg/kg (i.p.), um antagonista do receptor GABA_A/ Benzodiazepínico, e 15 minutos depois tratados com veículo (água destilada) por via oral. Ao segundo grupo, foi administrado Flumazenil e 15 minutos depois receberam Timol 25 mg/Kg (v.o).

Quadro 5 - Teste do Labirinto em cruz elevado em camundongos



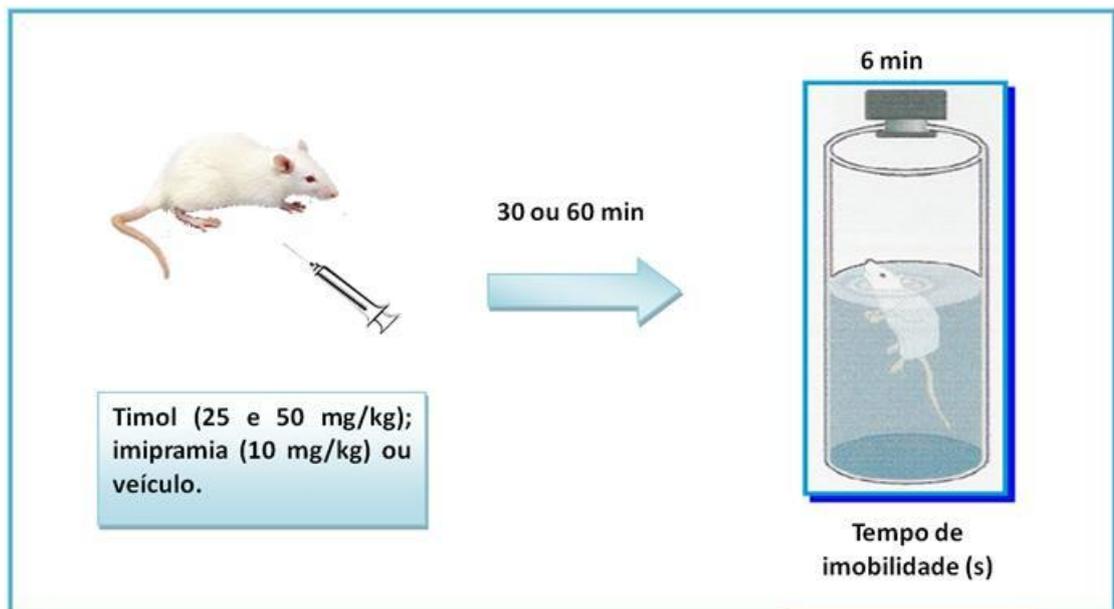
Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.7.4. Avaliação da Atividade Antidepressiva

4.7.4.1 Teste do Nado Forçado

O experimento consiste numa exposição a um tanque de água (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura) por 5 minutos. Deve-se colocar água fresca a 25°C até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Seguindo a metodologia original descrita em 1978 por Porsolt *et al.* Imipramina 10 mg/kg (i.p.) foi utilizada como droga-padrão, a fim de verificar a confiabilidade do teste. Este teste também foi utilizado para investigar os efeitos do Timol sobre os diversos sistemas de neurotransmissores envolvidos na depressão.

Quadro 6 - Teste do nado forçado em camundongos



Fonte: adaptado de Melo, 2006

4.7.4.2 Avaliação da participação do sistema noradrenérgico

Os animais foram pré-tratados com Prazosina 1 mg/kg (i.p.) ou loimbina 1 mg/kg (i.p.) e 30 min depois foram tratados com Timol 50 mg/kg, v.o. Uma hora depois os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

4.7.4.3 Avaliação da participação do sistema serotoninérgico

Os animais foram pré-tratados com PCPA 100 mg/kg (i.p.) 1 vez ao dia por quatro dias consecutivos, então 24 horas após o último tratamento com PCPA os animais foram tratados com Timol (v.o.), e submetidos ao nado forçado 1 hora depois.

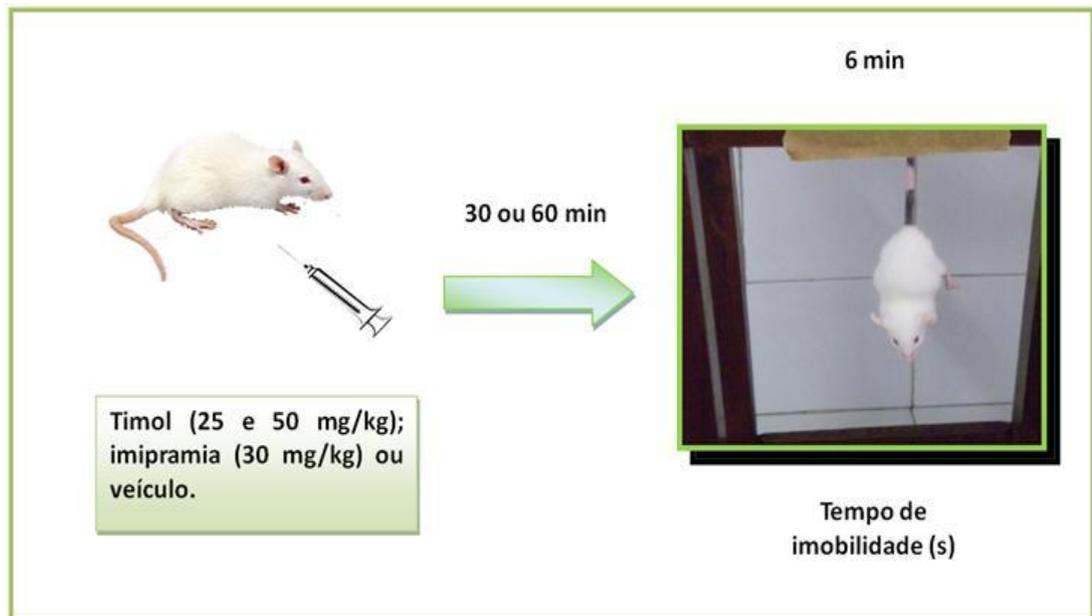
4.7.4.4 Avaliação da participação do sistema dopaminérgico

Os animais foram pré-tratados com SCH23390 15mg/kg (i.p.) ou Sulpirida 50 mg/kg (i.p.) trinta minutos antes do tratamento com Timol. Após 60 minutos (v.o.) do último tratamento, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

4.7.4.5 Teste da Suspensão da Cauda

É um teste utilizado para avaliar os efeitos antidepressivos de uma droga. Os animais devem ser suspensos, presos cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda, por uma fita adesiva numa plataforma a 58 cm da bancada do experimento. A duração da imobilidade deve ser avaliada durante 6 minutos segundo a metodologia original descrita por Steru *et al.* 1985. Imipramina 30 mg/kg (i.p.) foi utilizada como droga-padrão, a fim de verificar a confiabilidade do teste.

Quadro 7 - Teste da suspensão da cauda em camundongos.



Fonte: adaptado de Melo, 2006

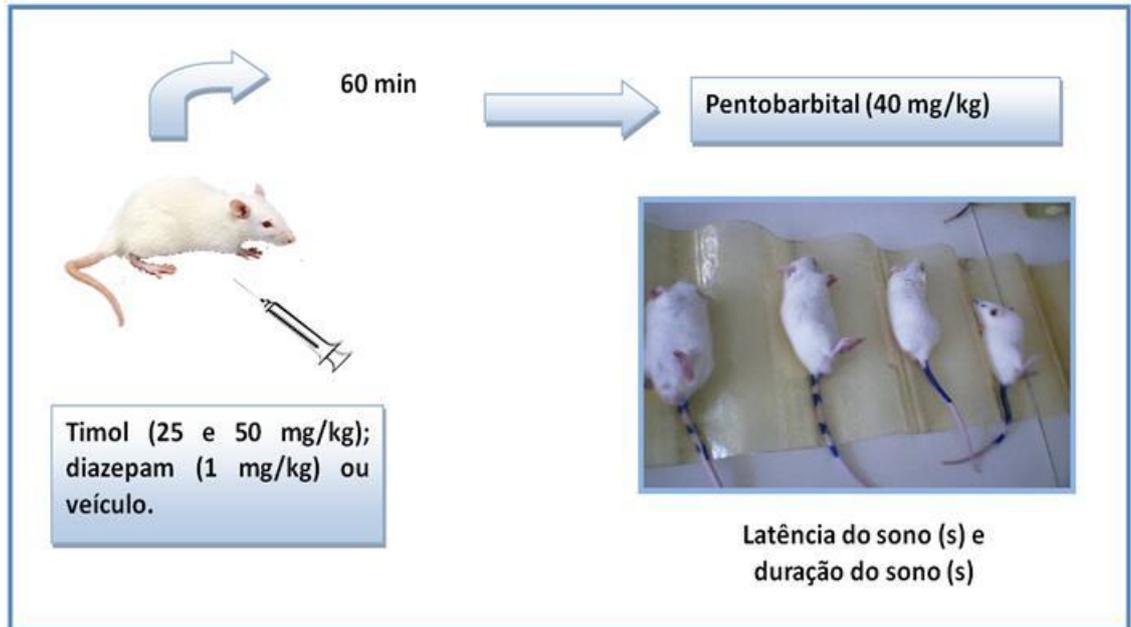
4.7.5 Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica

4.7.5.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

Uma hora após o tratamento com Timol nas doses de: 25mg/kg (v.o.) e 50mg/kg (v.o.), os animais receberam pentobarbital sódico 40mg/Kg (i.p.), como agente indutor do sono de acordo com o método de Dandiya & Collumbine (1959). O tempo desde a injeção do pentobarbital até o animal perder o reflexo postural foi registrado como latência de sono e o tempo de latência entre a perda e a recuperação voluntária do reflexo postural foi registrado como tempo de sono.

Iniciado o período de sono, em seus respectivos grupos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em local de adequada observação; foi registrado o início do sono de cada animal. Os animais foram observados durante todo o tempo de sono; sendo o final deste marcado no momento em que o animal retornou à situação de alerta, caracterizada pela alteração da posição de decúbito dorsal. O período total de observação (cut of) foi de, no máximo, 120 minutos. Diazepam 1 mg/kg (i.p.) foi utilizado como droga-padrão.

Quadro 8 - Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos

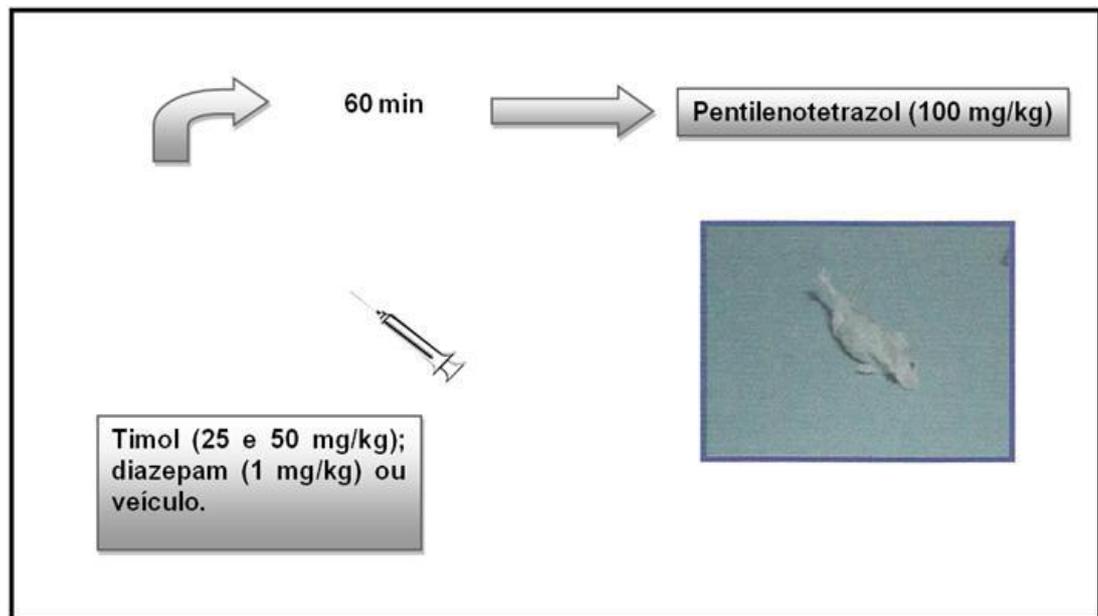


Fonte: adaptado de Melo, 2006

4.7.6 Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

4.7.6.1 Teste da Convulsão Induzida por pentilenotetrazol

Este experimento foi realizado seguindo a metodologia descrita por Swinyard *et al.* (1952) e permite avaliar a possível ação anticonvulsivante da droga em teste. Após 60 minutos do tratamento com timol (via oral) ou salina ou trinta minutos após o Diazepam 1mg/kg (i.p.), todos os animais foram tratados com pentilenotetrazol 100mg/kg (i.p.). Em seguida, os camundongos foram colocados em gaiolas individuais e observados por até 20 minutos. O tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão) e a latência para morte foram os parâmetros registrados.

Quadro 9 - Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos

Fonte: adaptado de Melo, 2006

4.8 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls (comparações múltiplas) *post hoc*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade locomotora

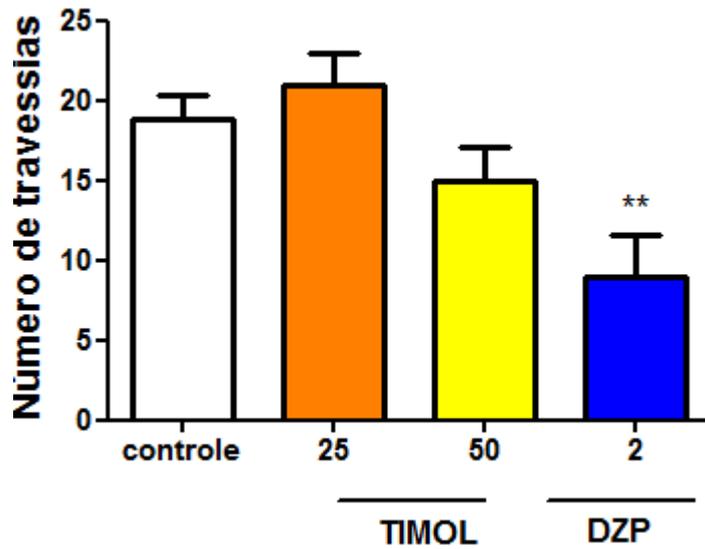
5.1.1 Teste do Campo Aberto

A Atividade Locomotora Espontânea (LCE), *rearing* e *grooming* foram os parâmetros analisados e os resultados foram expressos em números de travessias, de rearing e de grooming. Timol administrado via oral não alterou a atividade locomotora em nenhuma das doses estudadas. **(Figura 10)** [TIMOL 25mg/kg: $21,00 \pm 1,9444$ (10)]; [TIMOL 50mg/kg: $15,00 \pm 2,108$ (10)]; comparando com o controle: [cont.: $18,83 \pm 1,543$ (10)]. O Diazepam 2mg/kg i.p. usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora em relação ao controle [DZP-2: $9,000 \pm 2,619$ (8)].

O *Rearing* **(Figura 11)** não foi alterado em nenhuma das doses estudadas [TIMOL 25mg/kg: $6,125 \pm 0,6665$ (10)]; [TIMOL 50mg/kg: $4,750 \pm 1,398$ (10)]; comparando com o controle: [cont.: $5,438 \pm 0,9218$ (10)]. O Diazepam 2mg/kg i.p. usado como droga padrão, reduziu o *rearing* em relação ao controle [DZP-2: $1,500 \pm 0,6547$ (8)].

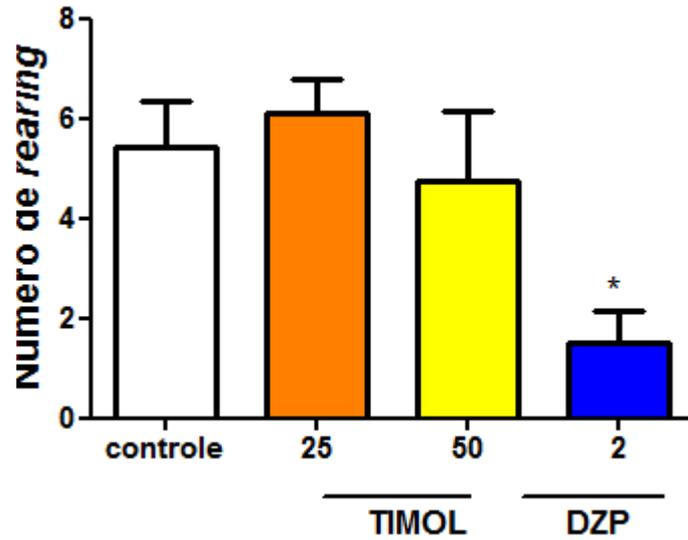
O *Grooming* **(Figura 12)** teve uma redução significativa com o uso do Timol em ambas as doses estudadas [TIMOL 25mg/kg: $5,300 \pm 0,6675$ (10)]; [TIMOL 50mg/kg: $4,600 \pm 0,4522$ (10)]; comparando com o controle: [cont.: $8,267 \pm 0,6131$ (10)]. O Diazepam 2mg/kg i.p. usado como droga padrão, reduziu o *Grooming* em relação ao controle [DZP-2: $0,3750 \pm 0,1830$ (8)].

Figura 10 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.



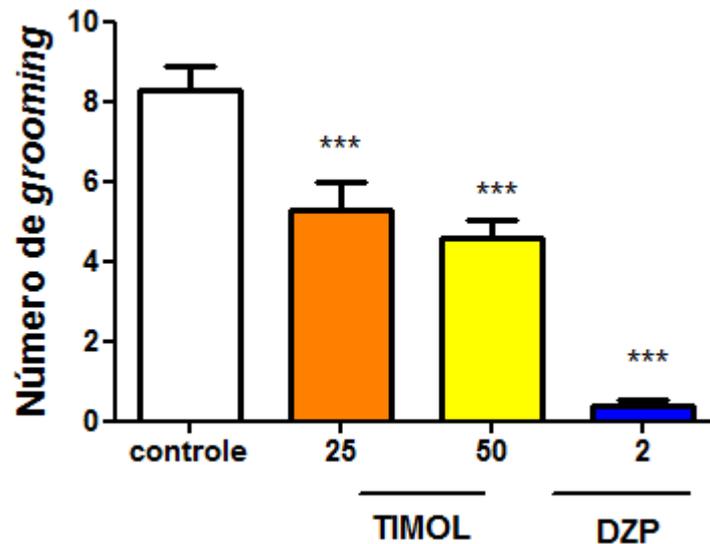
Controle veículo e Timol 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.), Diazepam 2 mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam a média \pm EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos ** $p < 0,01$.

Figura 11 - Efeito do Timol e Diazepam sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto em camundongos.



Controle (veículo) e Timol 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.), Diazepam 2mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam a média \pm EPM do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newmans Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$.

Figura 12 - Efeito do Timol e Diazepam sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em camundongos.



Controle (veículo) e Timol 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.), Diazepam 2 mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam a média \pm EPM do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newmans Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$.

5.2 Avaliação da Atividade Relaxante Muscular

5.2.1 Teste do Rota Rod

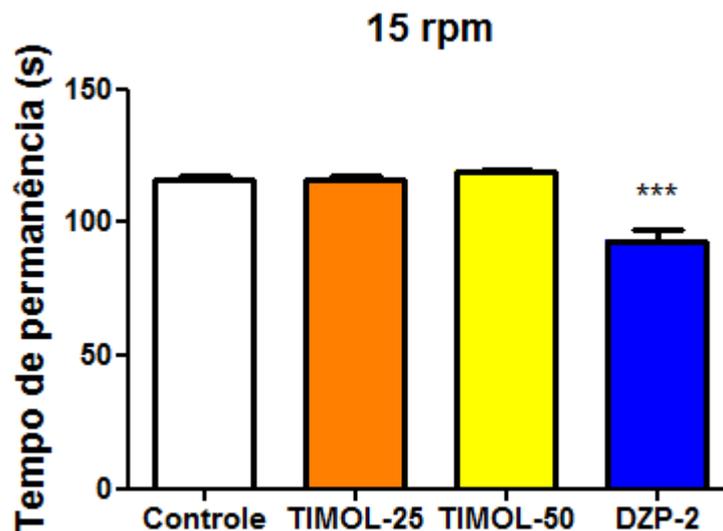
O tempo de permanência na barra durante 2 minutos foi o parâmetro utilizado, foram realizadas nas rotações de 15 rpm e 30rpm com o Timol nas doses de 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.) em ambas as rotações.

O Timol não alterou o tempo de permanência na barra em nenhuma das doses estudadas em relação ao grupo controle. 15rpm (**Figura 13**): [TIMOL 25mg/kg: $116,1 \pm 1,586$ (8)]; [TIMOL 50mg/kg: $119,3 \pm 0,366$ (8)]; comparando com o controle: [cont.: $116,2 \pm 1,100$ (8)]. 30rpm (**Figura 14**): [TIMOL 25mg/kg: $116,0 \pm 1,558$

(8)]; [TIMOL 50mg/kg: $109,6 \pm 3,713$ (8)]; comparando com o controle: [cont.: $103,3 \pm 2,629$ (8)].

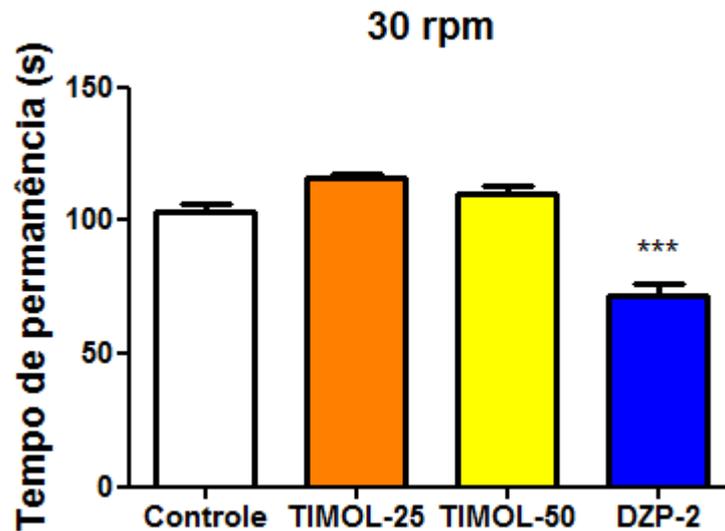
O Diazepam 2mg/kg i.p. usado como droga padrão positivo e reduziu significativamente o tempo de permanência na barra em ambas as rotações estudadas em relação ao controle 15 rpm [DZP-2: $93,00 \pm 4,166$ (8)]; 30rpm [DZP-2: $71,75 \pm 4,419$ (8)]. **(Figuras 13 e 14)**

Figura 13 - Efeito do Timol e Diazepam no tempo de permanência na barra giratória na velocidade de 15 rpm, no teste do *Rota rod* em camundongos.



Controle (veículo) e Timol 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.), Diazepam 2mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam a média \pm EPM no tempo de permanência na barra giratória durante 2 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newmans Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos*** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 14 - Efeito do Timol e Diazepam no tempo de permanência na barra giratória na velocidade de 30 rpm, no teste do *Rota rod* em camundongos.



Controle (veículo) e Timol 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.), Diazepam 2mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min(v.o.) e 30 min(i.p.) antes do experimento, os valores expressam a média \pm EPM no 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.

5.3 Avaliação da Atividade Ansiolítica

5.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os parâmetros analisados neste teste foram 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).

Ambas as doses do Timol aumentaram significativamente o NEBA, comparados com o controle, no entanto a dose de 50 mg/kg apresentou uma maior significância [TIMOL 25mg/kg: $6,583 \pm 0,5430$ (10); TIMOL 50mg/kg: $8,250 \pm 0,5383$ (10); cont.: $4,264 \pm 0,4581$ (12)]. **(Figura 15)**

O Timol aumentou significativamente o PEBA em ambas as doses estudadas, e também neste parâmetro a dose de 50 mg/kg apresentou uma maior significância [TIMOL 25mg/kg: $43,83 \pm 2,769$ (10); TIMOL 50mg/kg: $54,71 \pm 1,846$ (10); cont.: $30,98 \pm 2,952$ (12)]. **(Figura 16)**

Ambas as doses do Timol aumentaram significativamente o parâmetro TPBA, comparados com o controle, no entanto a dose de 50 mg/kg assim como em outros parâmetros também apresentou uma maior significância [TIMOL 25mg/kg: $99,31 \pm 9,614$ (12); TIMOL 50mg/kg: $136,1 \pm 12,76$ (10); cont.: $51,50 \pm 6,750$ (10)]. **(Figura 17)**

O Timol aumentou significativamente o PTBA em ambas as doses estudadas, e também neste parâmetro a dose de 50 mg/kg apresentou uma maior significância [TIMOL 25mg/kg: $41,04 \pm 3,109$ (10); TIMOL 50mg/kg: $51,97 \pm 3,060$ (10); cont.: $24,71 \pm 2,751$ (12)]. **(Figura 18)**

O Diazepam foi utilizado como padrão positivo na dose de 1mg/kg e aumentou todos os parâmetros: NEBA [DZP: $5,900 \pm 0,6904$ (12)]; PEBA [DZP: $41,31 \pm 4,532$ (12)]; TPBA [DZP: $77,33 \pm 6,829$ (10)]; PTBA [DZP: $29,41 \pm 2,476$ (10)]. **(Figuras 15, 16, 17, 18)**

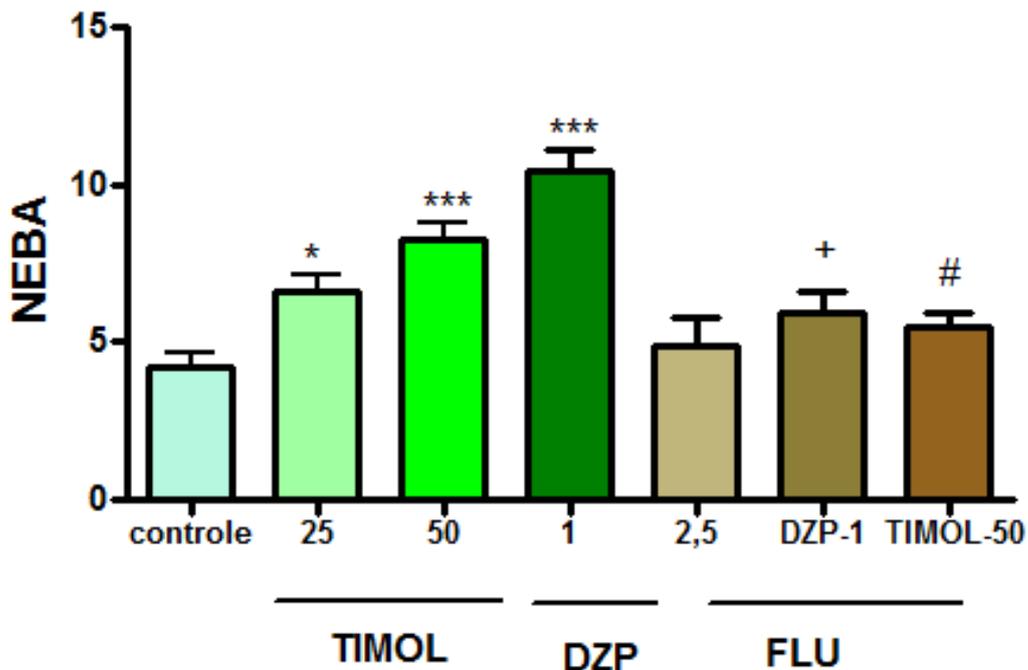
A análise do envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito ansiolítico do Timol mostrou que o grupo (FLU-2,5 + veículo v.o.) não alterou os parâmetros analisados NEBA [DZP: $4,889 \pm 0,8889$ (9)]; PEBA [DZP: $35,73 \pm 4,392$ (9)]; TPBA [DZP: $63,50 \pm 4,424$ (8)]; PTBA [DZP: $24,11 \pm 2,205$ (9)].

No grupo em que foi administrado o Flumazenil 15 minutos antes da administração do Timol 50mg/Kg (FLU-2,5 + Timol 50mg/Kg) foi observado uma supressão do efeito ansiolítico do Timol em todos os parâmetros analisados. NEBA [$5,500 \pm 0,4534$ (12)]; PEBA [$54,71 \pm 1,846$ (12)]; TPBA [$136,1 \pm 12,76$ (11)]; PTBA [$51,97 \pm 3,060$ (12)] quando comparado com o grupo tratado apenas com Timol 50 mg/kg. NEBA [$8,250 \pm 0,5383$ (10)]; PEBA [$35,96 \pm 3,347$ (10)]; TPBA [$68,71 \pm 15,98$ (8)]; PTBA [$30,80 \pm 4,836$ (10)].

Do mesmo modo a associação (FLU-2,5 + DZP-1) também reverteu o efeito ansiolítico do diazepam em todos os parâmetros analisados NEBA

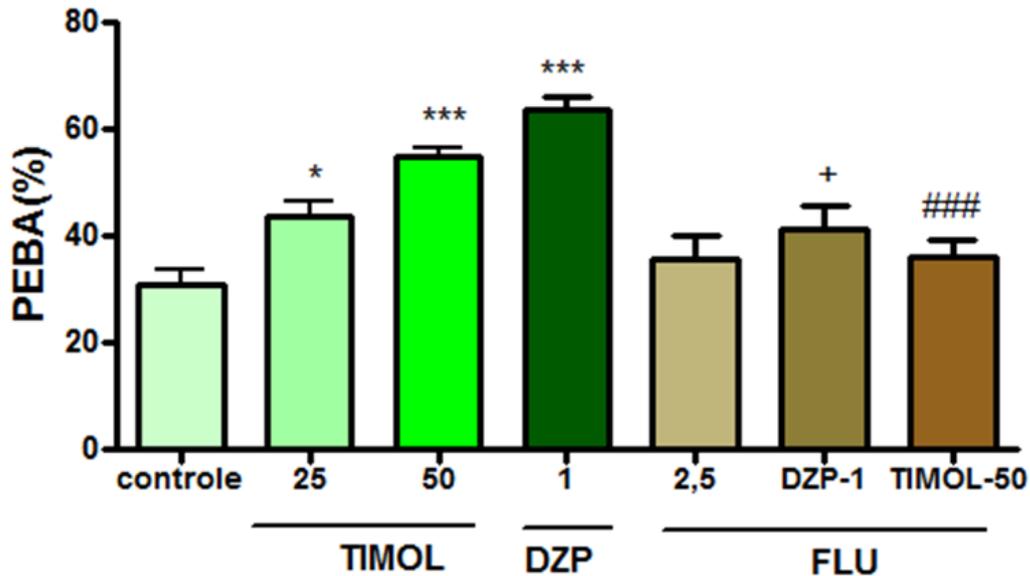
[5,900±0,6904 (10)]; PEBA [41,31±4,532 (9)]; TPBA [77,33±6,829 (9)]; PTBA [29,41±2,476 (10)]. Quando comparado com o grupo DZP-1 [NEBA [10,46±0,6466 (10)]; PEBA [63,56±2,594 (10)]; TPBA [168,7±5,366 (10)]; PTBA [61,27±2,974 (10)]. (Figuras 15, 16, 17, 18)

Figura 15 - Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos associados a Flumazenil sobre o número de entradas no braço aberto (NEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos



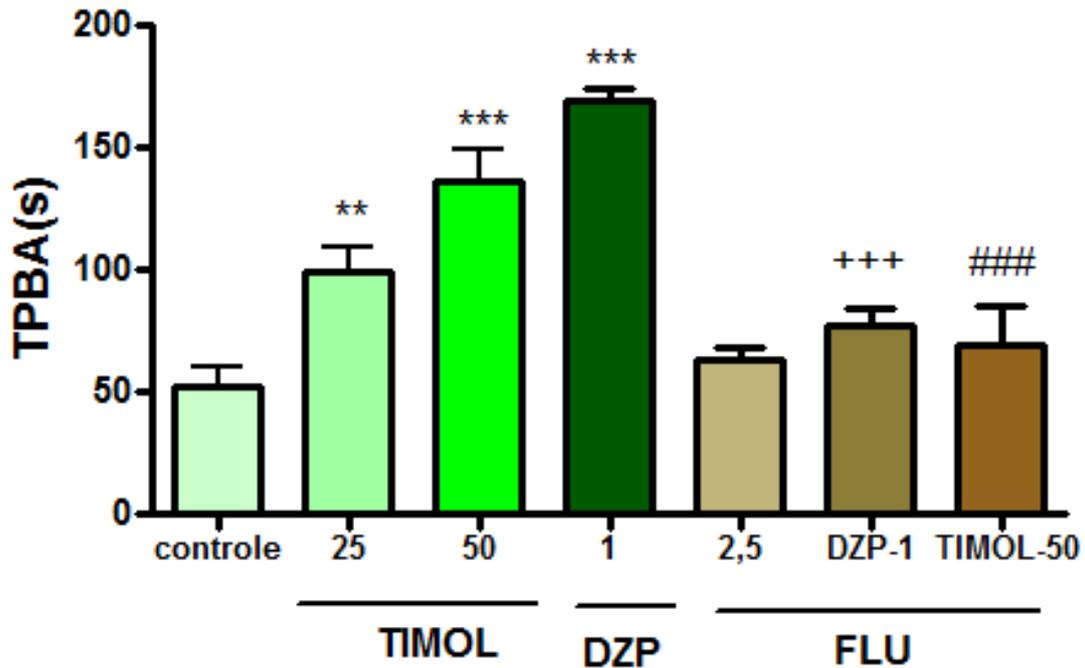
Controle (Veículo) e Timol 25mg e 50mg/Kg (v.o.), Diazepam 1mg/Kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 15 minutos após a administração da Flumazenil (FLU 2,5 mg/Kg i.p.) e 30 (i.p.) e 60 (v.o.) minutos depois foi realizado 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 * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$ vs Timol-50; + $p < 0,05$ vs DZP-1.

Figura 16 - Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o percentual de entradas no braço aberto (PEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos.



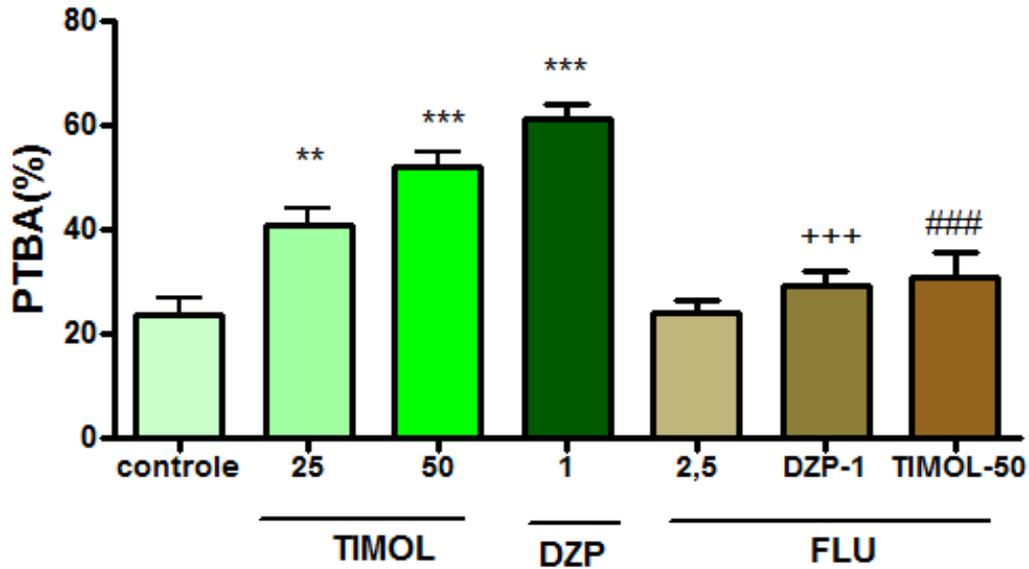
Controle (Veículo) e Timol 25mg e 50mg/Kg (v.o.), Diazepam 1mg/Kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 15 minutos após a administração da Flumazenil FLU 2,5mg/Kg (i.p.) e 30 (i.p.) e 60 (v.o.) minutos depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média \pm EPM do percentual 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 * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs Timol-50; + $p < 0,05$ vs DZP-1.

Figura 17 - Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos.



Controle (Veículo) e Timol 25mg e 50mg/Kg (v.o.), Diazepam 1mg/Kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 15 minutos após a administração da Flumazenil FLU 2,5mg/Kg (i.p.) e 30 (i.p.) e 60 (v.o.) minutos depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de permanência no braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste post hoc. Valores significativos **p < 0,01; ***p < 0,01 vs controle; ###p < 0,001 vs Timol-50; +++p < 0,001 vs DZP-1.

Figura 18 - Efeito do Timol e do Diazepam, sozinhos ou associados a Flumazenil sobre o percentual do tempo de permanência no braço aberto (PTBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em camundongos.



Controle (Veículo) e Timol 25mg e 50mg/Kg (v.o.), Diazepam 1mg/Kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) ou 30 min (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 15 minutos após a administração da Flumazenil FLU 2,5mg/Kg (i.p.) e 30 (i.p.) e 60 (v.o.) minutos depois foi realizado o experimento. Os valores representam a média \pm EPM do percentual do tempo de permanência no braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs Timol-50; +++ $p < 0,001$ vs DZP-1.

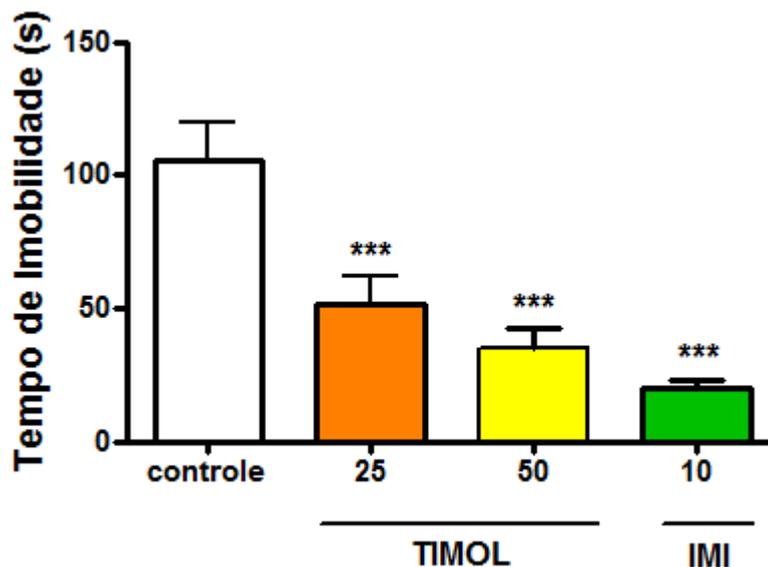
5.4 Avaliação da Atividade Antidepressiva

5.4.1 Teste do Nado Forçado

O tempo de imobilidade dos animais foi o parâmetro analisado neste teste. Os resultados demonstraram que o Timol quando administrado por via oral em ambas as doses estudadas (25 mg/Kg e 50mg/Kg) diminuiu significativamente o tempo de imobilidade com relação ao grupo controle [controle: $105,4 \pm 14,21(10)$]. Timol (25mg/Kg): $51,22 \pm 10,60 (9)$; Timol (50mg/Kg): $35,00 \pm 7,730 (9)$.

A Imipramina (10 mg/Kg i.p.) foi utilizada como droga padrão positivo e diminuiu significativamente o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle [IMI-10 mg/Kg: $35,00 \pm 7,730 (9)$] (**Figura 19**).

Figura 19 - Efeito do Timol sozinho ou associado a Imipramina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo) e Timol 25mg/kg e 50 mg/kg (v.o.), Imipramina 10mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam 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*** $p < 0,001$ vs controle.

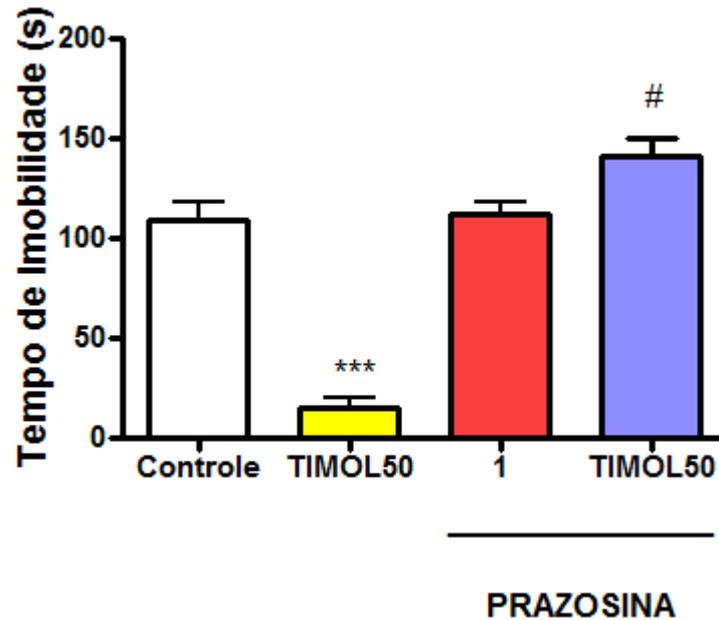
5.4.2 Avaliação do Sistema Noradrenérgico

O envolvimento do sistema noradrenérgico foi avaliado através do pré-tratamento dos animais com o antagonista dos receptores noradrenérgicos α_1 Prazosina (1mg/Kg i.p.) e o antagonista dos receptores noradrenérgicos α_2 loimbina (1mg/Kg i.p.).

O pré-tratamento dos animais com Prazosina seguido da administração do Timol (50mg/Kg v.o.) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do Timol, sugerindo o envolvimento de receptores noradrenérgicos α_1 neste efeito no teste do nado forçado quando comparado com o grupo controle [controle: $108,9 \pm 9,182$ (8)]; Timol(50mg/Kg): $15,17 \pm 5,089$ (8); Prazosina (1mg/Kg): $111,7 \pm 6,856$ (10); Timol(50mg/Kg) + Prazosina(1mg/Kg): $141,4 \pm 9,279$ (10)] (**Figura 20**).

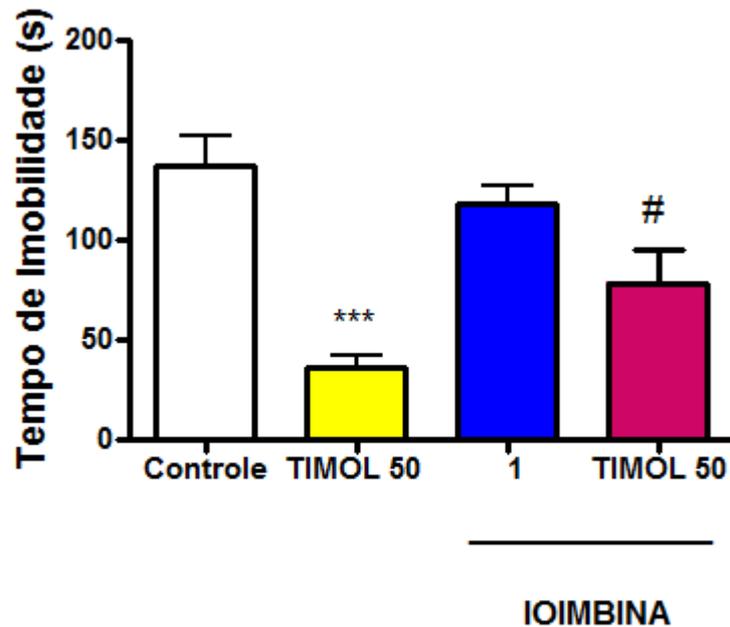
Efeito semelhante também pôde ser evidenciado ao avaliarmos o envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 , pois a loimbina também reverteu o possível efeito antidepressivo do Timol no teste do nado forçado quando comparado ao grupo controle. [controle: $136,9 \pm 15,46$ (8)]; Timol 50mg/Kg: $36,00 \pm 6,586$ (8); loimbina: $117,9 \pm 8,998$ (10); Timol 50 + loimbina: $78,67 \pm 16,03$ (9)] (**Figura 21**).

Figura 20 - Efeito do Timol sozinho ou associado a Prazosina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo) e Timol (50 mg/kg v. o.) foram administrados 60 minutos antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de Prazosina (PRZ 1mg/Kg) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newmans Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle, # $p < 0,05$ vs Timol 50.

Figura 21 - Efeito do Timol sozinho ou associado a loimbina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



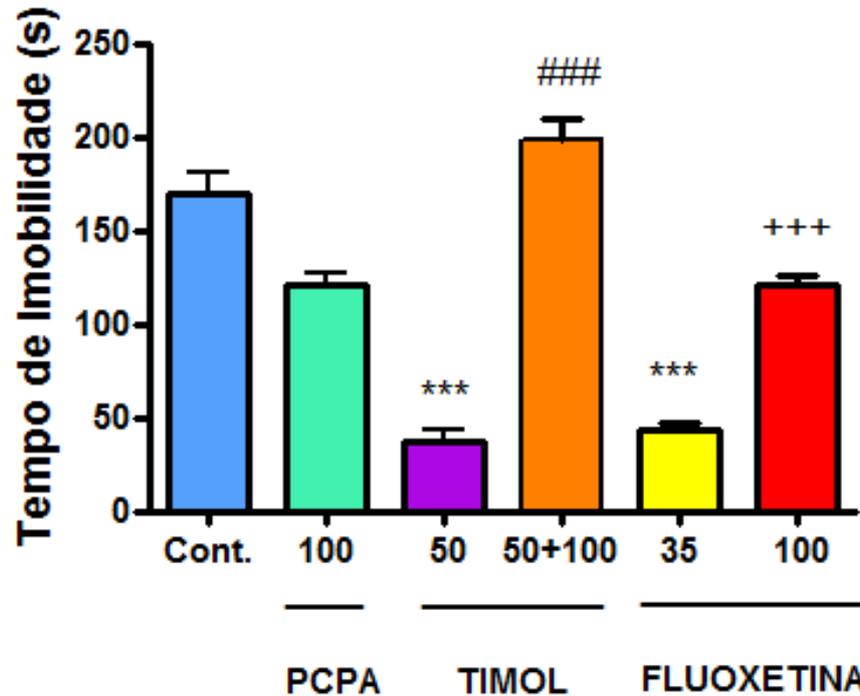
Controle (veículo) e Timol (50 mg/kg v. o.) foram administrados 60 minutos antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de Ioimbina (IOM 1mg/Kg) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newmans Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle, # $p < 0,05$ vs Timol 50.

5.4.3 Avaliação do Sistema Serotonérgico

O envolvimento dos receptores serotonérgicos foi avaliado através do pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/Kg i.p.), um inibidor da síntese de 5-HT que foi administrado 01 vez ao dia por 04 dias consecutivos.

Quando associado ao Timol (50 mg/Kg v.o.) reverteu significativamente o seu possível efeito antidepressivo na avaliação do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos. Bem como também reverteu o efeito antidepressivo da Fluoxetina (35 mg/Kg i.p.) que foi utilizada com droga padrão, comparada ao grupo controle [controle: $169,4 \pm 11,03$ (8); PCPA100: $121,0 \pm 5,837$ (10); Timol 50mg/Kg: $37,40 \pm 5,357$ (10); Timol 50 + PCPA 100: $198,4 \pm 11,42$ (8), FLU 35: $42,82 \pm 3,811$ (10); FLU 35 + PCPA 100: $121,0 \pm 4,89$ (9)] (**Figura 22**).

Figura 22 - Efeito do Timol e Fluoxetina, sozinhos ou associados ao PCPA sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo), Timol (50 mg/kg v. o.), Fluoxetina (FLU 35mg/Kg i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de PCPA (PCPA 100mg/Kg i.p.) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam 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 *** $p < 0,001$ vs controle, #### $p < 0,001$ vs Timol 50; +++ $p < 0,001$ vs FLU 35.

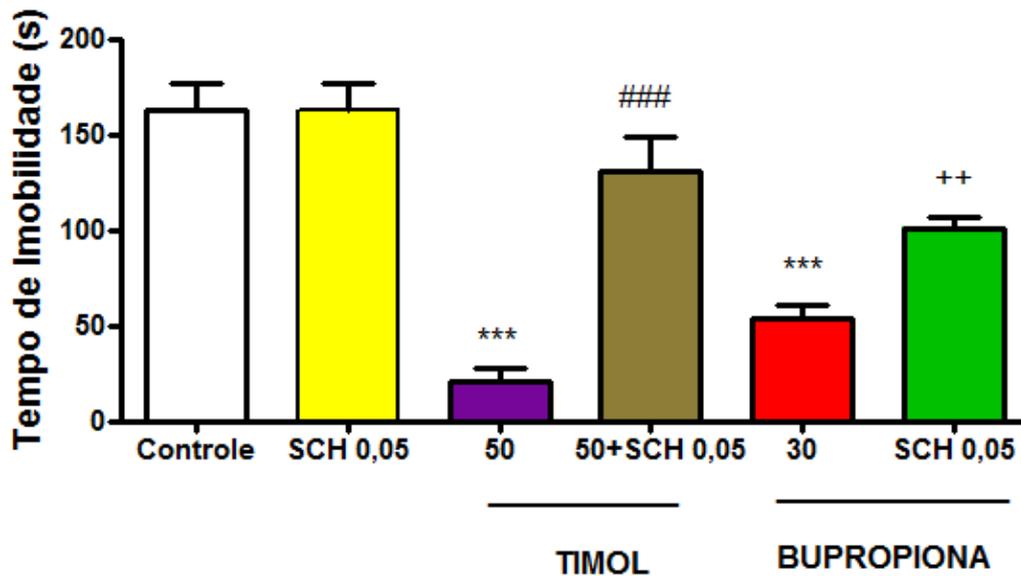
5.4.4 Avaliação do Sistema Dopaminérgico

Foi realizado a análise do envolvimento dopaminérgico no possível efeito antidepressivo do timol, através do pré-tratamento dos animais com SCH23390 (0,05 mg/Kg i.p.) um antagonista dos receptores D1 dopaminérgicos e Sulpirida (50 mg/Kg i.p.) um antagonista dos receptores D2 dopaminérgicos, os quais ambos reverteram significativamente o efeito antidepressivo do timol (50 mg/Kg v.o.) e da Bupropiona (30 mg/Kg i.p.) em comparação ao grupo controle.

O pré-tratamento com controle e veículo, Timol(50mg/Kg), Bupropiona (30 mg/Kg) e SCH23390 (0,05mg/Kg) sozinhos os associados nos mostra os seguintes resultados: [Controle: $163,0 \pm 13,80$ (8); SCH23390 (0,05mg/Kg): $162,6 \pm 14,20$ (8); Timol (50mg/Kg): $20,75 \pm 7,408$ (8); Timol (50mg/Kg) + SCH23390 (0,05mg/Kg): $131,1 \pm 17,66$ (8); Bupropiona (30 mg/Kg): $53,40 \pm 7,315$ (10); Bupropiona (30 mg/Kg) + SCH23390 (0,05mg/Kg): $101,0 \pm 5,220$ (8)] **(Figura 23)**.

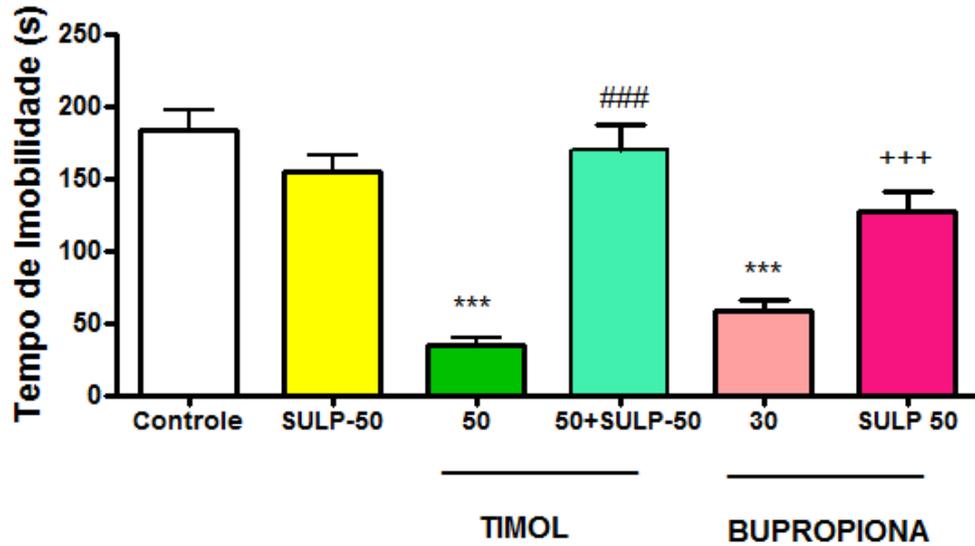
Como relatado anteriormente também foi realizado o pré-tratamento com controle e veículo, Timol(50mg/Kg), Bupropiona (30 mg/Kg) e Sulpirida (50mg/Kg) sozinhos os associados os quais os seguintes resultados foram: [Controle: $183,0 \pm 14,08$ (8); Sulpirida (50mg/Kg): $154,0 \pm 12,20$ (8); Timol (50mg/Kg): $34,25 \pm 5,147$ (8); Timol (50mg/Kg) + SCH23390 (0,05mg/Kg): $170,1 \pm 16,47$ (8); Bupropiona (30 mg/Kg): $58,56 \pm 6,729$ (9); Bupropiona (30 mg/Kg) + SCH23390 (0,05mg/Kg): $127,4 \pm 13,18$ (8)] **(Figura 24)**.

Figura 23 - Efeito do Timol sozinho ou associado a SCH23390 sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo) e Timol (50 mg/kg v. o.) foram administrados 60 minutos antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de SCH23390 (SCH 0,05mg/Kg) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam 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 *** $p < 0,001$ vs controle, ### $p < 0,001$ vs Timol 50, ** $p < 0,01$ vs Bupropiona 30.

Figura 24 - Efeito do Timol sozinho ou associado a Sulpirida sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



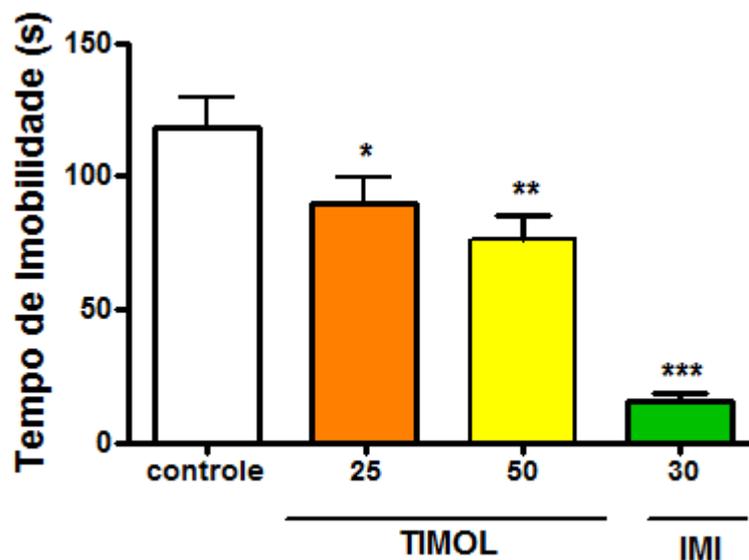
Controle (veículo) e Timol (50 mg/kg v. o.) foram administrados 60 minutos antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de Sulpirida (50 mg/Kg i.p.) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam a média ± EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle, ### $p < 0,001$ vs Timol 50, +++ $p < 0,001$ vs Bupropiona.

5.4.5 Teste da Suspensão da Cauda

No teste de suspensão da cauda Timol foi administrado po via oral, e evidenciou-se que ambas as doses estudadas diminuíram significativamente o tempo de imobilidade em (25 mg/Kg e 50mg/Kg) com relação ao grupo controle [TIMOL 25mg/Kg: $90,11 \pm 9,068$ (9)]; TIMOL 50mg/Kg: $76,20 \pm 8,899$ (10); controle: $118,5 \pm 10,83$ (8)].

A Imipramina (30 mg/Kg i.p.) foi utilizada como droga padrão positivo e diminuiu significativamente o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle [IMI 30mg/Kg: $15,79 \pm 2,457$ (8)] (**Figura 25**)

Figura 25 - Efeito do Timol e da Imipramina sobre o tempo de imobilidade (s) no teste de suspensão da cauda em camundongos.



Controle (veículo) e Timol (25mg/kg e 50 mg/kg v. o.), Imipramina (30 mg/kg i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam 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 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.5 Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica

5.5.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

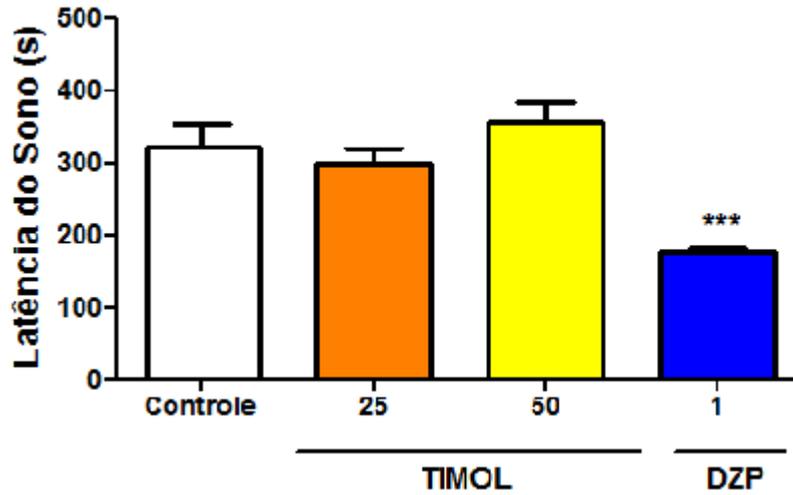
Os parâmetros utilizados neste teste foram a latência e a duração do sono. Veículo (v.o.), Timol (25mg/kg e 50mg/kg v.o.) e Diazepam (1mg/kg) foram administrados nos animais e após 60 minutos foi administrado pentobarbital (40mg/kg i.p.).

O Timol na dose de 25mg/kg e 50 mg/kg não alterou significativamente Na Latência do sono [TIMOL 25mg/kg: $298,3 \pm 20,50$ (8)]; [TIMOL 50mg/kg: $382,4 \pm 33,61$ (8)]; comparando com o controle: [cont.: $322,9 \pm 32,21$ (8)]. **(Figura 26)**

No entanto na análise da duração do sono, apenas na dose de 50 mg/kg o Timol aumentou significativamente este parâmetro. Duração do sono [TIMOL 25mg/kg: $273,8 \pm 510,9$ (8)]; [TIMOL 50mg/kg: $348,5 \pm 475,4$ (8)]; comparando com o controle: [cont.: $165,6 \pm 348,4$ (8)]. **(Figura 27)**

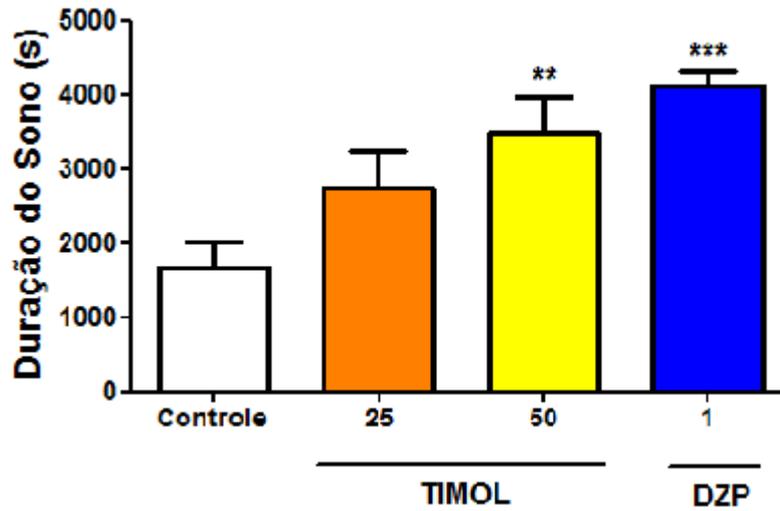
O Diazepam foi utilizado como padrão positivo e diminuiu a latência e aumentou o tempo de sono significativamente em relação ao grupo controle. Latência do sono [DZP-1mg/kg: $177,7 \pm 4,042$ (8)]; Duração do sono [DZP-1mg/kg: $411,8 \pm 192,8$ (8)] **(Figuras 26 e 27).**

Figura 26 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a latência de sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.



Controle (veículo), Timol (TIMOL- 25 e 50 mg/Kg, v.o.), Diazepam (DZP-1 mg/Kg, i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (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 *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 27- Efeito do Timol e Diazepam sobre a duração de sono (s) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.



Controle (veículo), Timol (TIMOL- 25 e 50 mg/Kg, v.o.), Diazepam (DZP-1 mg/Kg, i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (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 ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle.

5.6 Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

5.6.1 Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol

Foi realizado o teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol onde os parâmetros analisados foram: a latência da convulsão, a latência de morte ambos os parâmetros medidos em segundos, e a porcentagem de sobrevivência.

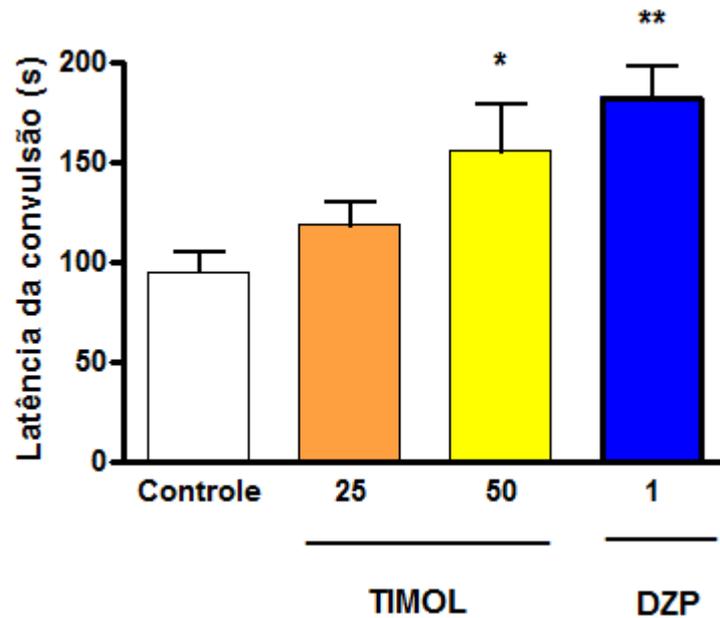
Os animais tratados com Timol 25mg/Kg (v.o.) não apresentaram alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados [Timol-25: 118,6±11,98(9)] já os animais tratados com a dose de 50mg/Kg apresentaram um aumento significativo na latência da convulsão [Timol-50: 155,5±23,71(9)], ambos foram comparados ao grupo controle [controle: 95,11±9,894 (10)] (**Figura 28**)

Os resultados obtidos com a avaliação do parâmetro Latência de morte não apresentou alteração significativa em nenhuma das doses estudadas: [controle: 477,9±156,5 (10)] [Timol-25: 519,7±154,2 (10), Timol-50: 466,8±158,7(9)], (**Figura 29**)

O Diazepam 1mg/Kg foi utilizado como padrão positivo e aumentou a latência da convulsão [DZP-1: 182,6±15,22 (9)] quando comparado ao grupo controle [controle: 95,11±9,894 (10)], (**Figura 28**)

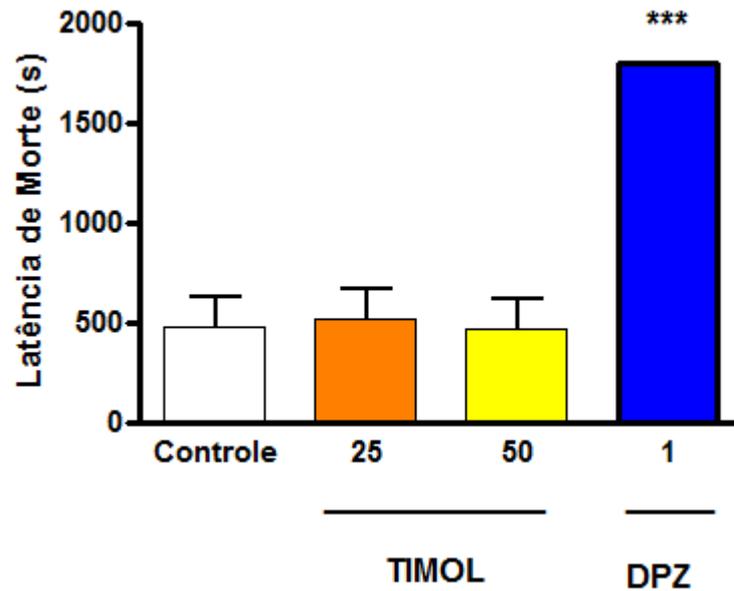
A porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com o Diazepam foi de 100%, no entanto nenhum dos animais tratados com o Timol sobreviveram ao teste. (**Figura 29; Tabela 1**)

Figura 28 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a latência da convulsão (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.



Controle (veículo), Timol (TIMOL- 25 e 50 mg/Kg, v.o.), Diazepam (DZP-1 mg/Kg, i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (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 * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle.

Figura 29 - Efeito do Timol e Diazepam sobre a latência de morte (s) no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.



Controle (veículo), Timol (TIMOL- 25 e 50 mg/Kg, v.o.), Diazepam (DZP-1 mg/Kg, i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (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 1- Efeito da administração oral do Timol e Diazepam intraperitoneal no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos.

Grupo (mg/Kg)	Latência da convulsão (s)	Latência de morte (s)	Sobrevivência (%)
Controle	95,11±9,894(10)	477,9±156,5 (10)	0
TIMOL-25	118,6±11,98 (9)	519,71±154,2 (10)	0
TIMOL-50	155,5±23,71(9)*	466,8±158,7 (10)	0
DZP-1	182,6±15,22 (9)**	-	100

Os valores representam a média ± EPM da latência da convulsão e latência de morte. O número de animais está representado entre parênteses. 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.

6 DISCUSSÃO

O Timol 2-isopropil-5-metil-fenol, C₁₀H₁₄O. Um isômero do Carvacrol, possui características similares a um fenol, com odor aromático e gosto picante. Apresenta-se como cristais incolores grandes ou pó cristalino branco. (GUILLEN *et al.*, 2007). Timol e Carvacrol são constituintes do óleo essencial de várias plantas como o alecrim pimenta (NUNES, 2005).

Os efeitos do Timol já estudados e descritos na literatura científica disponível incluem sua ação anti-séptica e antimicrobiana (MATOS, 2000) e anti-séptico, em alguns cremes dentais (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005). Carvacrol e Timol inibem a peroxidação de lipossomos fosfolipídicos e portanto exibem atividade antimicrobiana e antimicótica. São conservantes naturais de alimentos e possuem alta atividade antioxidante (MILOS *et al.*, 2000; TEISSEGRE; WATERHOUSE, 2000; MASTELIĆ *et al.*, 2008).

Os estudos de Botelho *et al.*, (2007) demonstraram que o timol inibiu crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Timol e carvacrol, seu isômero, inibiram o crescimento de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (NOSTRO *et al.*, 2007), apresentaram efeito antioxidante sobre hexanos (LEE *et al.*, 2005) e efeito relaxante sobre o músculo liso da aorta (PEIXOTO- NEVES *et al.*, 2010). O timol é o segundo constituinte mais abundante (25,16%) no óleo essencial de *Satureja thymbra* o que apresentou atividades: bactericida, fungicida, bacteriostática e fungistática (GIWELI *et al.*, 2012). Begrow *et al.*, (2010) em seus estudos experimentais relataram que o timol e carvacrol apresentaram efeito antiespasmódico em íleo e traqueia de roedores.

Adicionalmente, alguns trabalhos mostraram que timol e carvacrol aliviaram os danos cognitivos causados por níveis aumentados de beta-amilóide ou hipofunção colinérgica em ratos e que atividades anticolinesterásica, antioxidante, e anti-inflamatória podem ser os mecanismos que contribuem para tais efeitos benéficos (AZIZI *et al.*, 2012).

Trabalhos recentes do nosso laboratório demonstraram que carvacrol seu isômero estrutural, apresentou resultados satisfatórios em modelos experimentais de ansiedade (MELO, 2009) e depressão (MELO, 2010). Levando em consideração tais achados e sabendo-se que o Timol, até onde se sabe, não existem estudos sobre

suas ações no SNC, julgamos ser relevante estudá-lo em modelos animais de ansiedade, depressão e convulsão.

Sabe-se que é de fundamental importância a realização de estudos pré-clínicos como por exemplo *screening* de novas drogas, procurando investigar seu potencial farmacológico e conseqüentemente ações terapêuticas. Este trabalho apresenta uma investigação das possíveis ações centrais do Timol e seus mecanismos de ação farmacológica. Para tanto foram utilizados testes clássicos padronizados na farmacologia comportamental.

Historicamente a farmacologia comportamental surgiu durante a década de 50 da necessidade de estudar drogas com efeitos comportamentais específicos que pudessem tratar com sucesso certos transtornos psiquiátricos. Atualmente, as áreas de investigações comportamentais mais intensas incluem as dos transtornos psiquiátricos (esquizofrenia, depressão, ansiedade, entre outros), doenças com manifestações neurológicas (Parkinson, doença de Alzheimer), controle da dor (crônica e pós-operatória) e abuso de drogas (alcoolismo, dependência, dentre outros). Em cada um destes exemplos, a principal queixa do paciente envolve uma disfunção psicológica e/ou comportamental que altera o funcionamento normal do indivíduo na sua vida diária (LAPA *et al.*, 2008).

Os efeitos centrais do Timol foram estudados através de modelos clássicos para *screening* de atividades no sistema nervoso central tais como o campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE), *rota rod*, tempo de sono induzido por pentobarbital, nado forçado, suspensão da cauda e convulsão induzida por pentilenotetrazol. Estes testes fornecem informações sobre desempenho psicomotor, efeitos ansiolítico e antidepressivo, atividade miorreaxante, sedativo/hipnótica e anticonvulsivante (SOUSA *et al.*, 2004).

O efeito do Timol na ansiedade foi estudado através do teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) originalmente desenvolvido por Pellow e colaboradores (1985) e tornou-se um dos modelos mais utilizados para o estudo do comportamento de ansiedade em ratos e camundongos (MELO, 2010).

Este modelo de ansiedade baseia-se na premissa de que ratos e outros roedores evitam locais abertos e elevados, e quando neles confinados, mostram sinais de medo como: congelamento, defecação, micção e aumento do nível plasmático do hormônio de estresse a cortisona. Baseado nestas evidências o labirinto em cruz elevado é constituído de dois braços cercados por paredes,

colocados perpendicularmente a dois braços abertos, estando o conjunto elevado em relação ao assoalho. São mensurados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados permitindo que o animal explore livremente o aparelho por 5 ou 10 minutos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001).

Este teste apresenta algumas vantagens se comparado a outros modelos animais de ansiedade, pois é de fácil manuseio, econômico, rápido e não é necessário fazer um treino prévio com os animais (TORRES; ESCARABAJAL, 2002). Estudos iniciais de validação farmacológica realizados por pesquisadores ingleses mostraram que drogas que aliviam a ansiedade no homem, sobretudo os benzodiazepínicos aumentavam significativamente o número ou percentagem de entradas nos braços abertos, bem como o tempo de permanência neles. A validade deste teste também se fundamenta no fato de que estas atitudes fazem parte do repertório natural de defesa do rato (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001).

Na análise do LCE mostrou-se que o Timol administrado por via oral nas doses de 25 e 50 mg/Kg e aumentou significativamente todos os parâmetros avaliados. Semelhante ao que ocorreu com o grupo de animais em que foi utilizado o Diazepam na dose de 1mg/Kg por via intraperitoneal droga utilizada como padrão positivo. Este aumento significativo de todos os parâmetros analisados indica que semelhante ao diazepam droga ansiolítica clássica, o Timol promoveu um comportamento ansiolítico nos animais, ou seja, diminuindo o medo natural de espaços elevados e abertos. Outros trabalhos utilizando diferentes substâncias de origem natural mostraram efeitos ansiolíticos no LCE, pois resultados semelhantes foram encontrados por Gomes *et al.*, 2010 onde o monoterpeneo 1,4-cineol apresentou potenciais efeitos ansiolíticos na realização deste teste.

Vale ressaltar que os fármacos benzodiazepínicos, como por exemplo o diazepam, já estão bem descritos na literatura como fármacos ansiolíticos que atuam como moduladores alostéricos do ácido γ -aminobutírico (GABAA), promovendo aumento da hiperpolarização da célula (STAHL, 2010). Considerando que o timol agiu semelhante ao diazepam no LCE, resolvemos investigar se o efeito ansiolítico do timol estaria relacionado a uma ação gabaérgica. Para isto utilizamos o flumazenil um reconhecido antagonista do receptor benzodiazepínico. Para o esclarecimento deste mecanismo gabaérgico foi utilizada a dose de 50 mg/Kg do timol por via oral por ter sido a dose que apresentou uma ação mais significativa no LCE. Os resultados mostraram que o flumazenil reverteu o efeito ansiolítico do

diazepam e de maneira semelhante reverteu o efeito do timol, indicando que está relacionado com um mecanismo gabaérgico. A atividade ansiolítica do timol possivelmente está relacionada com uma ação no receptor GABAA/Benzodiazepínico.

No teste do LCE, assim como também, no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol o Diazepam foi administrado na dose de 1mg/Kg, no entanto no teste de rota rod e no campo aberto e tempo de sono induzido por pentobarbital a dose utilizada foi de 2 mg/Kg. Esta diferença nas doses se fundamenta no fato de que os benzodiazepínicos no nosso caso o Diazepam em doses mais baixas apresenta efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes, já em doses mais altas produz apresentar sedação e relaxamento muscular (GOLAN *et al*, 2009).

O possível efeito ansiolítico do Timol pôde ser confirmado através do resultado do teste do campo aberto, o qual em ambas as doses administradas o timol não alterou a atividade locomotora dos animais em estudo. Este teste é utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais devido o fato de que algumas substâncias que alteram a atividade locomotora dos animais podem interferir no resultado do teste do LCE fornecendo um resultado falso-positivo (GOMES *et al*, 2008). Para descartar esta probabilidade, utilizou-se o teste do campo aberto que avaliou a atividade exploratória dos animais.

No teste do campo aberto além da atividade locomotora espontânea (ALE), avaliou-se também o comportamento de *rearing* e *grooming*. Neste teste o Diazepam foi utilizado na dose 2mg/kg por via intraperitoneal, dose diferente da utilizada no LCE (1mg/Kg) tal observação é relevante para elucidar o fato que o diazepam em doses mais baixas expressa efeitos ansiolíticos e em doses mais altas atua indicando um efeito sedativo, ambos comum aos demais benzodiazepínicos.

Keeley e Storch em 2009 afirmaram que um aumento no número de *grooming*, especialmente em roedores pode estar relacionado a um aumento de estresse e da ansiedade. Já a redução do número de *rearing* e *grooming* segundo alguns estudos pode está relacionada a um comportamento de ansiedade, que é atenuado por drogas ansiolíticas e potencializado por agentes ansiogênicos, no entanto alguns outros afirmam contrariamente que os agentes ansiolíticos tendem a diminuir o número de *grooming* e *rearing*.

No presente estudo o *rearing* não foi alterado em nenhuma das doses do timol, enquanto o *grooming* apresentou uma redução significativa com o uso do

Timol em ambas as doses estudadas. O diazepam 2mg/kg i.p. usado como droga padrão, reduziu tanto o *rearing* quanto o *grooming* em relação ao grupo controle. Tais resultados sugerem que o Timol possui um possível efeito ansiolítico porém sem ação sedativa, pois não alterou a atividade locomotora ou o número de *rearing* e diminuiu o número de *grooming* em ambas as doses estudadas, porém o diazepam fármaco já conhecido por suas ações ansiolíticas e sedativas no teste do campo aberto alterou todos os parâmetros analisados.

Segundo Sefarim e Felício (2001) um aumento no número de *grooming*, especialmente em roedores, pode estar relacionado a um aumento de estresse e da ansiedade, os autores afirmam ainda que a neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado e no núcleo accumbens parece representar um papel importante no comportamento de *grooming*.

O teste do tempo de sono induzido por pentobarbital foi realizado no sentido de investigar a possibilidade de uma ação sedativa do Timol. Fármacos benzodiazepínicos são amplamente utilizados na prática clínica para tratamento da ansiedade, porém diminuem a atividade motora e em doses mais elevadas induzem o sono, pois apresentam atividade sedativa-hipnótica (LAPA, 2008). Ainda segundo o mesmo autor este efeito sedativo-hipnótico é evidenciado nos benzodiazepínicos mais potentes e estes são indicados na prática clínica para tratamento de pacientes com insônia, mas a tolerância rápida e a capacidade de aumentar o efeito de outros depressores do SNC torna esta indicação um tanto inconveniente. Assim considerando o efeito do timol no LCE, semelhante ao diazepam um benzodiazepínico foi utilizado no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital.

O Timol nas doses de 25mg/kg e 50 mg/kg como descrito nos resultados não alterou a latência do sono, mas na dose de 50 mg/kg aumentou a duração do sono, podendo indicar embora fracamente ser um potencializador do sono barbitúrico. Neste teste o diazepam foi utilizado como padrão positivo e diminuiu a latência do sono e aumentou o tempo de duração sono, confirmando sua ação já conhecida na literatura como agente sedativo e hipnótico.

Entretanto vale salientar que o teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, embora sendo sensível para agentes depressores do SNC não é específico pois compostos que interferem com a biotransformação do pentobarbital pelo complexo enzimático do citocromo P-450 e podem apresentar os mesmos efeitos de drogas depressoras do SNC (PARIS 2000).

Com base nestas considerações o teste do *rota rod* foi aplicado com o objetivo de verificar se o tratamento com o timol promove incoordenação motora nos animais por sedação e ou relaxamento muscular devido ao timol ter demonstrado atividade ansiolítica semelhante ao diazepam. Sabe-se que os benzodiazepínicos reduzem a espasticidade do músculo esquelético através de aumento da atividade dos interneurônios inibitórios da medula espinal (GOLAN *et al.*, 2009) e portanto são fármacos que apresentam efeito ansiolítico, mas em doses mais elevadas alteram a coordenação motora.

Em nosso estudo o teste foi realizado 60 minutos após a administração de Timol nas duas doses estudadas, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevado a 25 cm do piso, nas rotações de 15 e 30 rpm. Para cada animal foi registrado o tempo de permanência na barra, em um período de até 2 minutos seguindo o protocolo desenvolvido por DUNHAM e MIYA em 1957, o diazepam na dose de 2mg/kg administrado por via intraperitoneal, foi utilizado como padrão positivo. Este é um modelo animal clássico usado para determinar o efeito de drogas na coordenação motora de roedores (BOHLEN *et al.*, 2009).

Nossos resultados revelaram que o timol em ambas as doses estudadas não causou nenhum efeito no teste do *rota rod*, indicando que o mesmo é desprovido de forma diferente do diazepam que já era esperado que classicamente em doses mais elevadas apresenta efeito relaxante muscular. A permanência dos animais na barra giratória em nenhuma das doses estudadas do timol foi alterada já o diazepam reduziu este tempo.

Os fármacos usados para tratar epilepsia geralmente inibem o disparo dos neurônios no cérebro por aumentarem os efeitos inibitórios do GABA, reduzirem os efeitos dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato ou alterarem o movimento dos íons sódio e cálcio pelas membranas dos neurônios (PANUS *et al.*, 2011). Assim considerando os efeitos do timol sobre o sistema gabaérgico, resolvemos verificar se o timol apresenta uma possível ação anticonvulsivante.

A possível ação anticonvulsivante do timol foi investigada através do procedimento experimental do modelo clássico de convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol. Este modelo foi desenvolvido por Swinyard *et al.* Em 1952 no qual os autores afirmam que drogas que possam impedir essas convulsões ou aumentem a latência e diminuem a duração ou a letalidade das

mesmas. Estas drogas correlacionam-se positivamente com drogas empregadas no tratamento das epilepsias do tipo crise de ausência em humanos (LAPA *et al.*, 2008)

Os animais tratados com timol 25mg/Kg (v.o.) não apresentaram alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados, enquanto os animais tratados com timol na dose de 50mg/Kg apresentaram um aumento significativo na latência da convulsão quando comparados ao grupo controle porém o mesmo não ocorreu com o parâmetro Latência de morte. O Diazepam 1mg/Kg (i.p.) utilizado como padrão positivo, aumentou a latência da convulsão e a porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com o diazepam foi de 100%, no entanto nenhum dos animais tratados com o Timol sobreviveram ao teste.

O efeito obtido no grupo dos animais tratados com o diazepam se deve ao fato de sua ação anticonvulsivante já comprovada, sendo um fármaco amplamente utilizado na prática clínica no tratamento agudo intravenoso do estado de mal epiléptico. Torna-se pois necessário para elucidação do efeito anticonvulsivante do timol outros estudos com diferentes doses e diferentes testes para corroborarem com nosso resultado, no qual encontramos um aumento significativo na latência da convulsão apresentado pelo grupo de animais tratado com timol na dose de 50mg/Kg.

Em vários estudos o estresse crônico, incontrolável, vem sendo relacionado com a etiologia de diversas doenças, incluindo a depressão. Em animais de laboratório a exposição a eventos estressantes não controláveis de elevada intensidade produz alterações comportamentais e fisiológicas muitas vezes encontradas na depressão clínica. Podem ocorrer como déficits na atividade motora, ganho de peso e sono, bem como diminuição de comportamento competitivo, diminuição na capacidade de sentir prazer que possa ser expressa através de uma redução nas respostas que levam a estimulação de regiões cerebrais de recompensa, ou em um menor consumo de soluções adocicadas e aumento de erros em tarefas de escolha e discriminação. Estas alterações são revertidas por tratamento com drogas antidepressivas ou por eletrochoque. Em virtude disso, inúmeros modelos animais de depressão são baseados nas modificações comportamentais induzidas por exposição a diferentes estressores (GRAEFF; GUIMARÃES, 2001)

Os dois modelos animais mais amplamente utilizados para *screening* de novas drogas antidepressivas são o teste do nado forçado e da suspensão da

cauda. Estes testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para a maioria das classes de drogas antidepressivas incluindo os antidepressivos tricíclicos, os inibidores da recaptção de serotonina, os inibidores da MAO (monoamina oxidase) e os atípicos (BASSO *et al.*, 2009; FRANKOWSKA *et al.*, 2007).

Segundo Duarte *et al.*, 2007 os testes de suspensão da cauda e nado forçado são testes que apresentam especificidade e sensibilidade ao uso agudo de antidepressivos, apresentam facilidade de uso e confiabilidade.

Para fundamentação da realização destes experimentos, Mao *et al.*, 2008 afirma ainda que em ambos os testes os animais são submetidos a um estresse, o qual não é possível escapar e após um período de luta inicial, os animais se tornam imóveis, assemelhando-se a um estado de desespero e depressão comportamental.

Os antidepressivos em geral aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (CRYAN *et al.*, 2002). Vários estudos recentes utilizando-se substâncias de origem natural com o objetivo de investigar possíveis efeitos antidepressivos são encontrados (TEIXEIRA *et al.*, 2011, SOUSA *et al.*, 2012, AMARAL *et al.*, 2012), onde os resultados mostraram uma redução no tempo de imobilidade nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado, caracterizando um aumento do comportamento de luta dos animais, o que sugere um efeito antidepressivo destes fármacos.

No teste da suspensão da cauda os animais são suspensos, presos cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda, por uma fita adesiva numa plataforma a 58 cm da bancada do experimento. A duração da imobilidade deve ser avaliada durante 6 minutos seguindo a metodologia original elaborada por Steru *et al.*, 1985, cuja metodologia vem sendo utilizada atualmente por inúmeros estudos como os de Melo *et al.*, 2011 que utilizou estes experimentos como base para a elucidação do envolvimento dos sistemas monoaminérgicos no efeito antidepressivo da Riparina III. A imipramina um fármaco com efeito antidepressivo já comprovado, é utilizada como droga-padrão na dose de 30 mg/kg e administrada por via intraperitoneal, a fim de verificar a confiabilidade do teste.

No nosso estudo no teste de suspensão da cauda o Timol foi administrado por via oral, e evidenciou-se que ambas as doses estudadas (25 mg/Kg e 50mg/Kg) diminuíram significativamente o tempo de imobilidade com relação ao

grupo controle, como descrito nos resultados, também foi obtido com o grupo tratado com a Imipramina na dose de 30 mg/Kg por via intraperitoneal.

Com relação ao teste do nado forçado o experimento consiste numa exposição a um tanque de água (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura) por 5 minutos. Deve-se colocar água fresca a 25°C até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Imipramina na dose de 10 mg/kg, administrada por via intraperitoneal é utilizada como droga-padrão, a fim de verificar a confiabilidade do teste. Esta metodologia foi descrita originalmente por Porsolt *et al.*, 1977 e vem sendo utilizada por vários pesquisadores como Gomes, 2009 em sua tese de doutorado para elucidação do efeitos centrais do isopulegol (um monoterpeneo assim com o timol).

O teste do nado forçado também denominado “desespero comportamental”, pois os animais são forçados a nadar em um espaço confinado, cuja fundamentação de eficácia do teste é baseada na utilização de drogas antidepressivas, com efeito, já comprovado que diminuem o tempo de imobilidade, aumentando o tempo de nado e o comportamento de luta perante o estresse agudo. (SAKI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

Em nosso estudo o timol foi administrado por via oral nas doses de (25 mg/Kg e 50mg/Kg e a imipramina na dose de 10 mg/Kg administrada por via intraperitoneal. Sessenta minutos após o tratamento dos grupos com o timol e trinta minutos após o tratamento com a imipramina os animais foram observados no tanque individualmente e seguiu-se o registro do tempo de imobilidade em segundos (s) durante o período de 5 minutos. Os animais quando permaneceram flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves a fim de manter a cabeça acima do nível da água é que foram considerados imóveis.

O resultado obtido no teste do nado forçado demonstrou que o Timol diminuiu significativamente o tempo de imobilidade com relação ao grupo controle em ambas as doses analisadas, semelhante a Imipramina, um antidepressivo tricíclico utilizada como droga padrão positivo. Este resultado sugere que o timol apresenta atividade antidepressiva.

O efeito antidepressivo de vários fármacos é testado através destes testes porém o teste do nado forçado parece ser mais sensível que o teste da suspensão da cauda, pois segundo Cryan *et al.*, 2005 é observado que doses menores de drogas antidepressivas, como a imipramina, são suficientes para demonstrar uma ação antidepressiva.

A observação de um efeito antidepressivo do timol nestes testes, instigou a necessidade da investigação do envolvimento do sistema monoaminérgico nesta ação antidepressiva. Portanto para isto foram realizados vários outros experimentos onde foi utilizado o teste do nado forçado e a administração combinada do timol com antagonistas específicos de receptores das principais monoaminas envolvidas na fisiologia da depressão. As drogas usadas foram a prazosina (1mg/Kg, um antagonista alfa 1 adrenérgico), ioimbina (1mg/Kg um antagonista alfa 2 adrenérgico), SCH23390 (0,5 mg/Kg, um antagonista dopaminérgico D 1), sulpirida (50 mg/Kg, um antagonista dopaminérgico D2) e para-cloro-fenilalanina PCPA (100 mg/Kg um inibidor da síntese de serotonina). A dose de timol escolhida para estes testes foi a de 50 mg/Kg, por ter sido a dose que apresentou efeito antidepressivo mais significativo nos testes de suspensão da cauda e do nado forçado.

A fisiopatologia da depressão através da hipótese das monoaminas, se fundamentou inicialmente na deficiência de noradrenalina e serotonina, e posteriormente a dopamina foi considerada (MACHADO *et al.*, 2009). Muitos antidepressivos utilizados na prática clínica atuam através da regulação das concentrações sinápticas destes neurotransmissores como é o caso dos antidepressivos tricíclicos (ex. Amitripitilina e Imipramina), antidepressivos heterocíclicos de segunda e terceira gerações (ex. Amoxapina e Venlaxatina respectivamente) e Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (Fluoxetina e Paroxetina).

O envolvimento do sistema noradrenérgico foi avaliado através do pré-tratamento dos animais com o antagonista dos receptores noradrenérgicos $\alpha 1$ Prazosina na dose de 1mg/Kg (i.p.) e com antagonista dos receptores noradrenérgicos $\alpha 2$ Ioimbina na dose de 1mg/Kg (i.p.) e posteriormente tratados com o timol na dose de 50 mg/Kg (v.o.). Controle (veículo) e o Timol (50 mg/kg v. o.) foram administrados 60 minutos antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de Prazosina e outro grupo de animais foi tratado com a Ioimbina 60 minutos depois foi realizado o experimento.

O pré-tratamento dos animais com Prazosina seguido da administração do Timol (50mg/Kg v.o.) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do Timol, sugerindo o envolvimento de receptores noradrenérgicos $\alpha 1$ neste efeito no teste do nado forçado. Efeito semelhante também pôde ser evidenciado ao avaliarmos o envolvimento dos receptores noradrenérgicos $\alpha 2$, pois a Ioimbina também reverteu o

possível efeito antidepressivo do timol. Este resultado sugere que ação antidepressiva do timol no teste do nado forçado pode estar relacionada de alguma forma com a ação central de receptores α_1 e α_2 noradrenérgicos.

Para a investigação do mecanismo de ação serotoninérgico foi utilizado o PCPA, um inibidor da enzima triptofano-hidroxilase, foi administrado por quatro dias consecutivos, na dose de 100 mg/Kg por via intraperitoneal. Em um estudo realizado em 2008, Wang et al afirmaram que não ocorre alteração nos níveis de noradrenalina e dopamina com a administração de PCPA em camundongos, enquanto os estoques endógenos de serotonina são depletados em 60%.

Quando associado ao Timol (50 mg/Kg v.o.) o PCPA reverteu significativamente o seu efeito antidepressivo na avaliação do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos. Bem como também reverteu o efeito antidepressivo da Fluoxetina (35 mg/Kg i.p.) um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, utilizada com droga padrão. Este resultado sugere que ação antidepressiva do timol no teste do nado forçado está relacionada com uma ação serotoninérgica.

Foi realizado a análise do envolvimento dos receptores dopaminérgicos no possível efeito antidepressivo do timol, através do pré-tratamento dos animais com SCH23390 0,5 mg/Kg (i.p.) um antagonista dos receptores D1 dopaminérgicos e Sulpirida 50 mg/Kg (i.p.) um antagonista dos receptores D2 dopaminérgicos. Os antagonistas SCH23390 e Sulpirida revertem o efeito antidepressivo do timol (50 mg/Kg v.o.) e da Bupropiona (30 mg/Kg i.p.) indicando que a ação antidepressiva do timol no teste do nado forçado também está envolvida com a ativação central de receptores D1 e D2 dopaminérgicos. Resultado semelhante foi encontrado na investigação do efeito antidepressivo do carvacrol por Melo (2010), o qual reforça a observação de vários outros estudos que drogas que aumentam os níveis de dopamina como as anfetaminas, produzem uma exaltação do humor, enquanto as que reduzem como a reserpina podem produzir disforia e depressão.

O envolvimento monoaminérgico no efeito antidepressivo das Riparinas I, II e III foram avaliados por diferentes pesquisadores e foi demonstrado por Sousa *et al.*, 2012, Teixeira, *et al.*, 2011 e Melo *et al.*, 2011 respectivamente que as Riparinas (isoladas da planta *Aniba Riparia*) apresentaram um efeito antidepressivo relacionado com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, assim

como neste estudo foi demonstrado o envolvimento destes sistemas através do teste do nado forçado com o efeito antidepressivo do timol.

Em suma, através destes experimentos comportamentais apresentados demonstrou-se que o timol exibiu efeitos ansiolíticos por via gabaérgica, sem alterar a atividade locomotora espontânea, ou apresentar uma ação sedativa/hipnótica ou relaxante muscular. O efeito anticonvulsivante parcial demonstrado precisa ser melhor esclarecido visto que outros testes precisam confirmar o efeito observado. O significativo efeito antidepressivo apresentado pelo timol parece estar relacionado a um envolvimento com a transmissão noradrenérgica, dopaminérgica e serotoninérgica.

Este estudo pode ser ampliado posteriormente através da investigação dos efeitos do timol sobre as concentrações de monoaminas e seus respectivos metabólitos, através do HPLC, bem como de estudos de *biding* para confirmar os possíveis mecanismos de ação do timol sugeridos neste trabalho.

As evidências experimentais aqui demonstradas, fornecem dados para a continuação da busca da comprovação da eficácia terapêutica do timol através da possibilidade da realização não somente de outros testes experimentais como também as de testes clínicos, que possam no futuro viabilizar o uso do timol para implementar o tratamento de transtornos psiquiátricos como as abordadas neste estudo como a ansiedade, depressão e quem sabe até a convulsão.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos efeitos da administração aguda de timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg em modelos de ansiedade, depressão, atividade locomotora, sedação e convulsão levou a várias considerações.

No teste do campo aberto, timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais. As doses de 25 e 50 mg/Kg diminuíram o número do *grooming*. O comportamento de *grooming* pode estar associado com a estimulação de receptores dopaminérgicos, o que sugere que o Timol possa agir nestes receptores. Entretanto estudos de binding devem ser posteriormente executados para confirmar esta hipótese.

- No teste do LCE Timol nas duas doses estudadas aumentou todos os parâmetros analisados, sugerindo uma possível ação ansiolítica.

- O mecanismo de ação ansiolítico do timol parece estar relacionado com o receptor GABA A benzodiazepínico pois no teste do LCE a ação ansiolítica do timol foi revertida pelo flumazenil um já conhecido antagonista deste receptor. Este resultado sugere que o efeito ansiolítico provavelmente está relacionado com o sistema GABAérgico.

- No teste do *rota rod*, a coordenação motora dos animais não foi alterada, sugerindo que o timol nas doses estudadas não apresenta efeito miorrelaxante.

- No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, timol nas duas doses estudadas não alterou a latência do sono, porém aumentou o tempo de sono somente na dose de 50mg/Kg, indicando um efeito parcial que deve ser posteriormente esclarecido, visto a não especificidade deste teste.

No teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol o timol aumentou a latência da convulsão, mas não alterou a latência de morte, nem protegeu da morte.

- Nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, timol em ambas as doses apresentaram um efeito antidepressivo. Esse efeito foi confirmado pelo resultado do teste do campo aberto, descartando-se hiperatividade.

- Os mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do timol foi analisado no teste do nado forçado através da administração dos antagonistas específicos. Seu efeito foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com PCPA (um inibidor da síntese de serotonina), Prazosina e loimbina (antagonistas dos

receptores adrenérgicos), SCH23390 e Sulpirida (antagonistas dos receptores dopaminérgicos). Estes resultados sugerem que timol apresenta efeito antidepressivo associado aos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico.

8 CONCLUSÃO

Através dos testes realizados, pode-se concluir que o timol possui atividade ansiolítica, relacionado com o sistema gabaérgico. E apresentou efeitos antidepressivos relacionado com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. Não apresentando efeitos sedativos, principalmente com a dose de 25mg/Kg da dose de 50mg/Kg promover o aumento da latência da convulsão.

REFERÊNCIAS

- AESCHBACH R. *et al.* Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 31-36, 1994
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos**, Farmacopéia Brasileira. 2011
- ARCHER J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim Behav**, v. 21, p. 205–235, 1973
- AZAMBUJA, W. O que são óleos essenciais. **Óleosessenciais.org**(março/2011). em: www.oleosessenciais.org.br. Acesso em 10/2012
- BACKONJA, M.M.: Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. **Neurology**. V.14, p-59, 2002.
- 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.
- BARRANTES-MONGE, M. *et al.*, Dependencia funcional y enfermedades crônicas en ancianos mexicanos. **Salud Publica Mex.**;v.49, p.459-466. 2007.
- BENEDETTI, C.; PREMUDA, L.: The history of opium and its derivatives. In **Advances in Pain Research and Therapy**. v 14, 2011.
- BIZZO, H R.; HOVELL, A M. C.; REZENDE, C M.. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n.3, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2006. p. 192 (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica nº 19).
- CALIXTO, J.B Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacology**, v.100, p. 131-134, 2005
- CANBEK M *et al.* Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver, **Phytomedicine**. v 11. p. 22-26. 2007.
- CRYAN, J.F. *et al.* Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.** v23, p-238-245, 2002.
- CRYAN, J.F. *et al.* 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.

DANTAS, I. C. **Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande**. Paraíba: 2006.

DISTASI, L.C **Plantas Medicinai: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils". **J. Appl. Microbiol** 88: 308–316. 2000.

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 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.

EVANS, J. D. "Effects of thymol on ruminal microorganisms". **Curr. Microbiol.** V. 41: p: 336- 342. 2000.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.; SISSONS, C.H. "Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate". **Oral Microbiol Immunol** v.20: p. 221–225. 2005

FRANKOWSKA, M. *et al.* Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. **Pharmacol. Rep.**, v.59, p. 645-655, 2007.

FEREN, S. *et al.*, Efficacy of hypnotic medications and other medications used for insomnia. **Sleep Med. Clin.**, v.1, p.387-397, 2006.

FRICCHIONE, G. Generalized anxiety disorder. **N. Engl J. Med.** v.351, p.675-682, 2004.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2009.

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

GOMES, P.B. *et al.* Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V.96, p.287-293, 2010.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

INNECCO R; MATTOS S.H; CRUZ G.F. Determinação da altura de corte do alecrim-pimenta. **Horticultura Brasileira**. v. 18, p. 992-993, 2000

JULIANO, C. *et al*, Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**. v. 12, p: 516–522, 2000.

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

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

LAPA, A. J. *et al* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de planta medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais - SBPM**, São Paulo. 2008.

LÉDA, P.H. de O. Portal de tecnologías para la inclusión social. Pesquisa com plantas medicinais no Brasil, uma história antiga. 2011. Acesso em 10/10/2012 disponível em:<http://tecnologiasociales.blogspot.com.br>.

LEVY, R.H., *et al.*: Antiepileptic Drugs, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

LOPES, A. **Dicionário Ilustrado de Fisioterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

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

MACIEL, A.C.C; GUERRA, R.O. Prevalência e fatores associados à sintomatologia depressiva em idosos residentes no nordeste do Brasil. **J Bras Psiquiatr.**;v. 55(1) p.26-33. 2006

MARKS, W. A, *et al*: Epilepsy: Habilitation and rehabilitation. **Seminars Pediatr Neurol**. V.10,p :151-154, 2003.

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, 2000.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. Ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MASTELIĆ J. *et al*. **Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives**. **J. Agric and Food Chem**. V. 56, p. 3989-96, 2008

MELO, C. T. V. **Estudo dos efeitos farmacológicos de (O-Metil)-N-2,6-Dihidroxi-Benzoil Tiramina (Riparina III) de Aniba Riparia (NESS) MEZ (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.** Dissertação de Mestrado. 2006. 156f. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2006.

MELO FHC *et al.* Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology.** 2010

MELO FHC *et al.* Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental and Clinical Pharmacology.** V. 24, p. 437-433, 2009.

MELO, F.H.C. **Investigação da ação central do Carvacrol em modelos de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos e possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos.** Dissertação de mestrado. 2010.133f. - Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2010.

MELO, F.H.C. *et al.* Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy.** p1-8 2012.

MILOS M, MASTELIC J AND JERKOVIC I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp hirtum*) **Food Chem.** V.7, p. 79, 2000

MORAES, I.G.S. *et al.*, Prevalência da depressão pós-parto e fatores associados. **Revista Saúde Pública**, v.40, p.65-70, 2006.

NUNES, RS. Caracterização da *Lippia sidoides Cham.* (Verbanaceae) como matéria prima vegetal para uso em produtos farmacêuticos. **Scientia Plena.**1.n07 182. 2005

OLSON, R. GABA. In: DAVIS, K. CHARNEY, D. COYLE, J. NEMEROFF, C.; editors. **Neuropsychopharmacology: The fifty generation of progress.** Philadelphia: Lippincott, Williams e& Willikns, 2002.

PANUS, C.P. *et al*, **Farmacologia para Fisioterapeutas.** Artmed, Porto Alegre, 2011.

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

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, 1987

RADÜNZ LL. **Secagem em camada delgada de folhas de Lippia sidoides Cham.** In: Anais do XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Paraná: 2001.

RANG, HP; DALE, M.M. RITTER, J.M., MOORE, P.K. **Farmacologia**. 7 ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2012

REARDON, L.E. *et al.* A critical review of the empirical literature on the relation between anxiety and puberty. **Clin. Psychol.Rev.**, v.29, p.1-23, 2009.

KLARIC, S. *et al.* Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Lett. Appl. Microbiol.** 2007, 44, 36-42.

SANTOS *et al.* Sintomas depressivos e prejuízo funcional de idosos de um Centro-Dia Geriátrico **J. Bras. Psiquiatr.** v.61 no.2, Rio de Janeiro 2012

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, 2001.

SILVA M.I.G., Aquino M.R. Nt, Teixeira P.F. Nt *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** V. 88 p. 141–147, 2007

SILVA, M.I.G. **Investigação dos efeitos centrais e gastroprotetores do isopulegol em camundongos**. 2009, 243f. Tese de doutorado- Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2009.

SILVA, V.A. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides Cham.* sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 4,dez. 2010 .

SOERJATO, D.D Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Pharmacol Exp Ther.**

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

STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações práticas**. 3 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

STELLA, F. *et al.* Depressão no idoso: diagnóstico, tratamento e benefícios da atividade física. **Motriz.** v.8, p.91-98. 2002.

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

SOUSA, F.C.F.; OLIVEIRA, I.C.M.; FERNANDES, M.L. Advances in the research of essential oils: Anxiolytic and sedative activity in Medicinal essential oils, editor: SOUSA, D.P. Chapter 7, p123-135 Nova Biomedical, 2012.

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.

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.

TERBLANCHÉ FC, KORNELIUS G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p. 471- 485,1996.

TEISSEDRE PL & WATERHOUSE AL. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. **J. Agric. Food Chem.** V. 48, p. 3801- 3804, 2000.

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.

VOKOU D.; KOKKINI, S. & BESSIERE, J. M. Geographic variation of greek oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) essential oils. **Biochem. Syst. Ecol.** V. 21, p. 287-291, 1993.

WALL, M.E; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnofarmacology**, v.51, p.239-254, 1996.

WANG, R. *et al.* The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 578, p.43-50, 2008.