

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

ESTUDO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS
FOLHAS DE *Schinus molle* L. NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CAMUNDONGOS

SAMANTHA COSTA AMORIM MUNIZ

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS
FOLHAS DE *Schinus molle* L. NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CAMUNDONGOS**

SAMANTHA COSTA AMORIM MUNIZ

Sob a Orientação do Professor
Fabio Fagundes da Rocha

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM963e
e Muniz, Samantha Costa Amorim, 1987-
Estudo dos efeitos do óleo essencial obtido das
folhas de Schinus molle L. no sistema nervoso central
de camundongos / Samantha Costa Amorim Muniz. - 2019.
52 f.: il.

Orientador: Fábio Fagundes da Rocha.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas, 2019.

1. Plantas medicinais. 2. Farmacologia. 3. Sistema
Nervoso Central. I. Rocha, Fábio Fagundes da, 1975-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

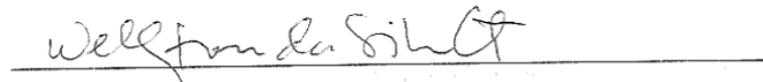
SAMANTHA COSTA AMORIM MUNIZ

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

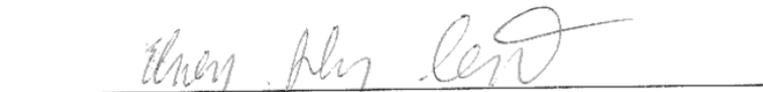
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2019



Prof Dr Fabio Fagundes da Rocha (Membro Interno – Orientador - UFRRJ)



Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr Elson Alves da Costa (Membro Externo – UFG)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido esposo, Rodrigo Sousa Muniz. Por todo incentivo, dedicação e paciência; por estar ao meu lado nas horas difíceis e me ensinar a descansar a mente e me divertir em períodos de angústias e tristezas; e por me encorajar e mostrar que sou capaz de alcançar tudo que almejo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Fabio Fagundes da Rocha, que nunca me deu respostas prontas, fez muito mais como excelente profissional que é, acreditou em mim e me entregou ferramentas para construir meu próprio conhecimento. Além disso, dedicou seus momentos de descanso para me esclarecer e orientar nessa caminhada.

Ao meu marido pelo amor e paciência nos momentos das crises de ansiedade e de mau humor.

À minha irmã Thais que me socorreu nos experimentos e sempre disponível para ajudar.

À minha família pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

As minhas queridas amigas Débora Barbosa e Raphaela Reis por sempre me incentivarem e torcerem por mim

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por fazerem me apaixonar por esse curso e me mostrar o quanto a fisiologia e farmacologia são incríveis.

Ao Cláudio Da Silva Almeida e ao Roberto Laureano Melo, pelas dúvidas esclarecidas nos momentos de desespero e principalmente por me encorajarem e mostrarem que posso ser capaz de conseguir o que desejo no meio acadêmico.

À técnica Raquel Souza pelo companheirismo e tempo dedicado para me passar os conhecimentos técnicos de laboratório que me ajudaram em toda caminhada.

Às alunas de iniciação científica Ana Paula Pinheiro, Isabela Pires e Camyla Nunes pelo carinho e ajuda nos experimentos, mesmo com o tempo sempre corrido.

*Aos alunos: Selma Farias, Máyra Dias, Sabrina Graziani, Edgard Alves, Viviane Felintro, Livia da Rocha, Lilian Uchôa, Raoni da Conceição, Verônica Cristina, Cesar Rafael e Bruno Paes, pelas brincadeiras e conversas descontraídas no meio da tensão do dia-a-dia de trabalho
À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.*

Às agências de fomento: Capes, CNPQ e Faperj pelo suporte financeiro

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 “This tudy was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001”

RESUMO

MUNIZ, S. C. A. **Estudo dos efeitos do óleo essencial obtido das folhas de *Schinus molle* L. no sistema nervoso central de camundongos.** 2019. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

A medicina popular, uma prática muito antiga, faz o uso de diversas plantas com a para o tratamento de doenças que acometem o homem. Com o passar dos anos, houve um grande avanço nos estudos de plantas medicinais para a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas. *Schinus molle* L., planta pertencente à família Anacardiaceae, é popularmente conhecida como aroeira salsa. Além de apresentar ampla gama de atividades biológicas, seus extratos etanólico e hexânico demonstraram possuir efeito do tipo antidepressivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do óleo essencial obtido das folhas de *Schinus molle* L. (OEFS) no sistema nervoso central de camundongos. No teste do campo aberto (CA), OEFS na dose de 100 mg/kg (i.p.) reduziu em 74,0% o número de quadrantes percorridos (OEFS100 = $19,1 \pm 6,2$ vs. CT = $73,2 \pm 3,1$), assim como a exploração vertical (“rearing”) em 95% (OES100 = $1,1 \pm 0,6$ vs. CT = $22,3 \pm 3,6$), aumentando significativamente o tempo de inatividade em 2071% em relação ao grupo controle (OEFS100 = $165,0 \pm 21,8$ vs. CT = $7,6 \pm 2,6$). A mesma dose de OEFS foi capaz de aumentar em 95,5% o tempo de sono induzido por etomidato em relação ao grupo controle (OEFS100 = $168,4 \pm 15,0$ vs. CT = $86,1 \pm 9,0$ s) sem, no entanto, alterar significativamente o tempo de permanência na barra ou número de quedas no teste da barra giratória. Para avaliar o possível efeito ansiolítico, as doses de 25 e 50mg/kg de OEFS foram utilizadas no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste de esconder esferas (TEE). Tanto no LCE quanto no TEE nenhum dos parâmetros analisados foi alterado significativamente pelo OES quando comparado ao grupo controle. Para avaliação de um possível efeito antidepressivo do OEFS, foi realizado o teste do nado forçado (NF). O OEFS não alterou significativamente o tempo de imobilidade em nenhuma das doses testadas (25, e 50 mg/kg). Visando identificar um possível mecanismo de ação para a ação sedativa do OEFS100, foi realizado um pré-tratamento com flumazenil na dose 1,0 mg/kg, vinte minutos antes da administração do OEFS100 e exposição ao teste do CA. O pré-tratamento com flumazenil não foi capaz de reverter a redução da atividade locomotora e exploratória do animal no CA causada pelo OEFS100, demonstrando que o efeito sedativo não é mediado pelo sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Estudos complementares são necessários para uma investigação mais aprofundada sobre seu efeito sedativo, assim como uma melhor exploração do perfil farmacológico desta planta.

Palavras chave: ansiedade, depressão, plantas medicinais, sedação

ABSTRACT

MUNIZ, S. C. A. **Study of the effects of essential oil obtained from *Schinus molle* L. leaves in the mice's Central Nervous System.** 2019. 52 p. Dissertation (Master in Physiological Sciences). Biological Sciences and Health Institute, Graduation Program in Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

In the folk medicine, several plants have been used to treat human diseases. In this sense, the studies to obtain new compounds with therapeutic properties from medicinal plants have been great progress over time. *Schinus molle* L., a plant that belongs to the Anacardiaceae family, is popularly known as aroeira salsa. It has been used for different purposes in the folk medicine and in mice its ethanolic and hexanic extracts showed antidepressant-like effects. The objective of this work was to evaluate the effects of **the** essential oil obtained from *Schinus molle* L. leaves in the mice's central nervous system. In the open field test (OFT), the OEFS (100 mg/kg) significantly reduced in 74% the number of crossed quadrants (OEFS100 = $19,1 \pm 6,2$ vs. CT = $73,2 \pm 3,1$) as well as decreased the rearing in 95% (OES100 = $1,1 \pm 0,6$ vs. CT = $22,3 \pm 3,6$) when compared to control group. An increase in 2071% of the inactivity time (OEFS100 = $165,0 \pm 21,8$ vs. CT = $7,6 \pm 2,6$) was also observed. The same dose of OEFS potentiated the sleep time induced by ethomidate in 95,5% when compared to control group (OEFS100 = $168,4 \pm 15,0$ vs. CT = $86,1 \pm 9,0$ s). On the other side, the rota rod test parameters were not affected significantly in the doses tested. To evaluate the possible anxiolytic effect of the OEFS, mice were treated with 25 or 50 mg / kg of OEFS and tested in the elevated plus maze (EPM) and in the marble burying test (MBT). These treatments did not affect significantly the parameters evaluated in both tests. The antidepressant-like effect of OEFS (25 mg/kg and 50 mg/kg) was evaluated in the forced swimming test (FST). In the doses tested, OEFS did not alter significantly the immobility time in the FST. Pretreatment with flumazenil was not able to reverse the reduction of locomotor and exploratory activity of mice in the OFT caused by OEFS100, showing that the sedative effect is not mediated by the benzodiazepine site of the GABA_A receptor. Further studies must be conducted to investigate the mechanisms that underlie its sedative effect, as well as better exploration of the pharmacological profile of this plant.

Keywords: anxiety, depression, **medicinal plants, sedation**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Schinus molle</i> L.....	3
Figura 2: Flores e frutos de <i>Schinus molle</i> L	3
Figura 3: Caixa utilizada como campo aberto para avaliação da ação geral do OEFS no SNC.....	14
Figura 4: Sequência de testes para avaliação de possível efeito do OEFS no SNC.....	15
Figura 5: Aparato utilizado para o teste do campo aberto.....	15
Figura 6: Equipamento utilizado no teste da barra giratória	16
Figura 7: Aparato utilizado para o teste do labirinto em cruz elevado	17
Figura 8: Caixa utilizada no teste de esconder esferas.....	18
Figura 9: Teste do nado forçado.....	19
Figura 10: Resultados da avaliação geral do OEFS	21
Figura 11: Resultados do teste do campo aberto.....	22
Figura 12: Resultados do teste da barra giratória.....	23
Figura 13: Resultados do teste do sono induzido por etomidato.....	24
Figura 14: Resultados do teste labirinto em cruz elevado.....	25
Figura 15: Resultados do teste de esconder esferas.....	26
Figura 16: Resultados do teste do nado forçado.....	26
Figura 17: Resultados do campo aberto na avaliação do mecanismo de ação.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sintomas do episódio depressivo maior de acordo com o MDE-V., 2014.....	6
Tabela 2: Classes de fármacos utilizadas no tratamento da TDM	7
Tabela 3: Classificação dos transtornos de ansiedade segundo MDE-V., 2014.....	8
Tabela 4: Avaliação geral do efeito do OEFS	51
Tabela 5: Resultados obtidos no teste do campo aberto.....	51
Tabela 6: Resultados obtidos no teste da roda giratória.....	51
Tabela 7: Resultados obtidos no teste de indução do sono	52
Tabela 8: Resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado.....	52
Tabela 9: Avaliação do efeito do flumazenil sobre atividade sedativa do OEFS no teste do campo aberto	52

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

5-HT = 5 hidroxitriptamina (serotonina)
5HT_{1A} = receptor para serotonina do tipo 1 a
5HT_{2C} = receptor para serotonina tipo 2 c
5HT₃ = receptor para serotonina tipo 3
ADT = antidepressivos tricíclicos
BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro
CA = teste do campo aberto
DZP = diazepam
EPM = erro padrão da média
FMZ = flumazenil
GABA = Ácido gama-aminobutírico
GABA_A = receptor para GABA do tipo A
GABA_B = receptor para GABA do tipo B
GABA_C = receptor para GABA do tipo C
iMAOs = inibidores da monoamina oxidase
IMI = imipramina
IRSN = inibidor da receptação serotonina e noradrenalina
ISRN = inibidor seletivo da receptação de noradrenalina
ISRS = inibidor seletivo da receptação de serotonina
i.p. = via intraperitoneal
LCE = teste do labirinto em cruz elevado
MAO = monoamina oxidase
MDE = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação de
Psiquiatria Norte-americana
min = minutos
NA = noradrenalina
NF = teste do nado forçado
OEFS = óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L.
s = segundos
s.c. = via subcutânea
SNC = Sistema Nervoso Central
TBG = teste da barra giratória
TDM = transtorno depressivo maior
TEE = teste de esconder esferas
TSC = teste de suspensão pela cauda
v.o. = via oral

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Uso de plantas pela medicina popular.....	1
1.1.1 <i>Schinus molle</i> L. – Aspectos gerais.....	2
1.1.2 <i>Schinus molle</i> L. – Aspectos farmacológicos	4
1.1.3 Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Schinus molle</i> L.....	5
1.2 Transtornos de Humor – Depressão e ansiedade.....	5
1.2.1 Depressão.....	5
1.2.2 Ansiedade.....	7
1.3 Distúrbios do sono.....	8
1.4 Ácido Gama Aminobutírico.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivos específicos.....	12
3. Material e métodos.....	13
3.1 Material botânico.....	13
3.2 Extração do óleo essencial das folhas de <i>Schinus molle</i> L.....	13
3.3 Animais e tratamento.....	13
3.4 Avaliação farmacológica.....	14
3.4.1 Avaliação geral dos efeitos de OEFS no Sistema nervoso central.....	14
3.4.2 Triagem da atividade no SNC.....	15
3.4.3 Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva.....	17
3.4.4 Avaliação do envolvimento do sítio benzodiazepínico no mecanismo de ação do OEFS.....	19
3.5 Análise estatística.....	20
4. Resultados.....	21
4.1 Avaliação geral dos efeitos de OEFS no Sistema nervoso central	21
4.2 Triagem da atividade no SNC.....	21
4.3 Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva.....	24
4.4 Avaliação do envolvimento do sítio benzodiazepínico no mecanismo de ação do OEFS	27
5. Discussão.....	28
6. Conclusões.....	34
7. Referências bibliográficas.....	35

INTRODUÇÃO

1.1 Uso de plantas pela medicina popular

Estima-se que o uso de plantas para fins medicinais data-se desde os primórdios da humanidade. O homem aprendeu a utilizar estruturas como folhas, flores raízes e cascas para obter cura contra diversas doenças que o acometiam. (Petrovska, 2012)

Nos países em desenvolvimento como o Brasil, onde serviços de saúde são escassos, o tratamento através do uso plantas medicinais se torna um importante recurso. Remédios indígenas, por exemplo, ganharam popularidade entre as pessoas das áreas urbanas e rurais, além de fornecer “pistas” na descoberta de novos fármacos como agentes quimioterápicos. (Agra *et al.*, 2007)

Várias plantas utilizadas pela medicina popular tiveram suas propriedades farmacológicas avaliadas e comprovadas cientificamente, dados estes que corroboraram o uso e estimularam o crescimento do interesse pelo estudo de vegetais como possíveis fontes de novos medicamentos fitoterápicos e/ou fármacos. (Calixto, 2005) Além disso, muitas espécies, possuem em sua constituição química, princípios ativos utilizados para vários tipos de fármacos que já são explorados pela indústria farmacêutica. Neste sentido, testes pré-clínicos com animais e testes *in vitro* são utilizados para avaliar o potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes isolados, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc. (Cechinel Filho e Yunes, 1998)

Em transtornos neuropsiquiátricos, diferentes espécies de plantas foram estudadas e tiveram sua eficácia clínica comprovada, corroborando o uso pela medicina popular. Dentre estas plantas, podemos destacar a “melissa”, a “camomila”, o “maracujá” e a “erva de São João” que tiveram alguns efeitos e mecanismos de ação demonstrados cientificamente conforme resumido abaixo.

Mellissa officinalis L. (melissa), é uma planta utilizada pela medicina popular como calmante e antidepressivo, exerce efeito ansiolítico possivelmente pela inibição da GABA-Transaminase, enzima responsável pela degradação do GABA. (Awad *et al.*, 2009; Dobetsberger e Buchbauer, 2011; Taiwo *et al.*, 2012). Já o efeito antidepressivo parece ser mediado pelo aumento os níveis de monoaminas, porém os mecanismos de ação não estão bem esclarecidos. (Shakeri *et al.*, 2016)

A apogenina, um componente isolado de *Matricaria chamomilla* (camomila), planta utilizada no tratamento para ansiedade e insônia, teve efeito sedativo já comprovado, contudo

estudos sobre os efeitos ansiolíticos são controversos assim como os mecanismos de ação. (Mckay e Blumberg, 2006)

A *Passiflora incarnata* (maracujá) é comumente comercializada como fitoterápico assim como seus derivados. Utilizada pela medicina popular para tratar transtornos de ansiedade e distúrbios do sono, tem eficácia comprovada em diferentes estudos, sendo a ação como agonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A um dos seus mecanismos de ação sugeridos. (Miroddi *et al.*, 2013)

Outra planta amplamente comercializada é o *Hypericum perforatum* L., conhecido como erva de São João, é muito utilizada pela medicina popular para o tratamento da depressão. Possui eficácia comprovada por diversos estudos e os mecanismos de ação já foram bastante estudados. Trabalhos já demonstraram que *Hypericum perforatum* tem seu efeito antidepressivo através da interação com diferentes sistemas de neurotransmissores, sendo sua ação como inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, a mais importante. (Mischoulon, 2009)

Considerando-se a ampla diversidade vegetal brasileira, é importante ressaltar que apesar de haver diversas pesquisas que comprovem o efeito de diferentes plantas e de seus componentes ativos, muito ainda se tem a investigar.

1.1.1 *Schinus molle* L. - Aspectos gerais

A família Anacardiaceae possui cerca de 80 gêneros e 800 espécies. Estas espécies encontram-se distribuídas em ambientes úmidos a secos, e são originadas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, mas algumas espécies podem ser encontradas também em regiões temperadas. Várias espécies dessa família possuem importância econômica, com seus frutos e sementes comestíveis, além de óleos, resinas, taninos e lacas úteis comercialmente. (Britannica, 2017)

Schinus molle L. (Figuras 1 e 2), pertencente à família Anacardiaceae, é uma espécie nativa da América do Sul, e no Brasil pode ser encontrada nas regiões Sudeste e Sul, nos Biomas de Mata Atlântica e Pampas (Luz e Pirani, 2010). Ocorre principalmente em solos secos e arenosos, sendo tolerante à seca e geada. Pode ser encontrada em beira de córregos e matas, e principalmente em áreas de campo. (Lorenzi, 1992)

É popularmente conhecida como aroeira-salsa, aroeira, aroeira-folha-de-salço, aroeira-mole, aroeira-periquita, pimenteira entre outros. Em algumas regiões fora do Brasil, ela é conhecida como *Pepper tree*, *California pepper tree*, *Peruvian pepper tree*. (Britannica, 2017)

É uma espécie arbórea comumente utilizada para fins ornamentais na arborização de ruas e paisagismos em geral. Sua altura varia entre 4 e 8 metros possuindo tronco com 25 a 35 cm de diâmetro, de madeira dura e pouco elástica, com boa durabilidade, sendo utilizada para confecção de moirões, esteios e trabalhos de torno. A casca é utilizada para a curtimento do couro e o córtex produz uma resina impregnada de terebintina, um solvente utilizado na mistura de tintas, vernizes e polidores. Suas folhas são compostas, sem estípulas, com 4-12 jugos, folíolos subcoreáceos, glabros, com 3-8 cm de comprimento. As flores amareladas são reunidas em inflorescências durante os meses de agosto a novembro e seus frutos são drupas globosas e de coloração vermelha que amadurecem nos meses de dezembro e janeiro (Lorenzi, 1992), que são apreciados como tempero culinário e em bebidas quentes, pois possuem sabor picante.



Figura 1. *Schinus molle* L.. Fonte: <https://www.ibflorestas.org.br/blog/arvore-aroeira-salsa/>

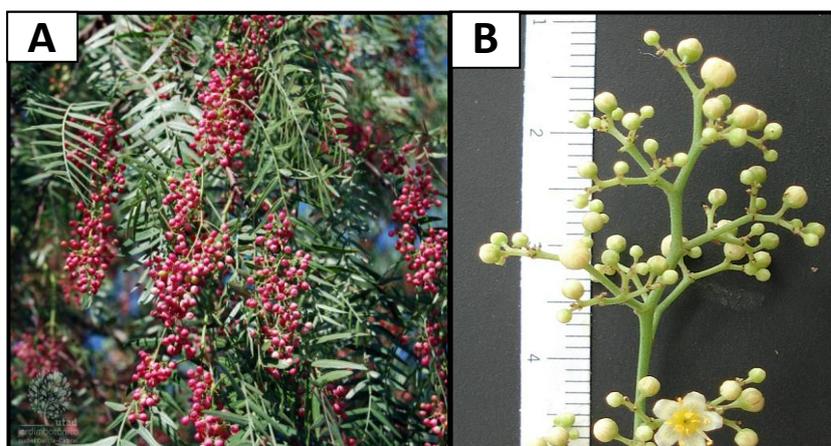


Figura 2. *Schinus molle* L., (A) frutos, (B) flores
Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Schinus_molle

1.1.2 *Schinus molle* L. – Aspectos farmacológicos

A planta *Schinus molle* L. é amplamente utilizada pela medicina popular. Diferentes estruturas, como folhas, frutos e raízes, são utilizadas no tratamento de inflamações, problemas no trato urinário, respiratório, gastrointestinal, problemas menstruais, e também como tratamento para depressão. O óleo essencial tem ação antimicrobiana, bactericida e fungicida além de agir contra vírus de plantas, bem como atividade repelente contra a mosca doméstica. (Machado *et al.*, 2007; Duke, 2008; Bussmann e Sharon, 2015)

Devido ao seu extensivo uso medicinal pela população, *Schinus molle* L. tem despertado interesse no meio científico. Diversos estudos já demonstraram os efeitos biológicos dos diferentes tipos de extratos e do óleo essencial dessa espécie.

Na área da saúde, diversos trabalhos identificaram os efeitos dos diferentes extratos de *Schinus molle* L. Em modelos animais de depressão, o extrato hexânico apresentou efeito antidepressivo em camundongos, reduzindo o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC), sendo proposto o envolvimento do sistema monoaminérgico como mecanismo de ação sem caracterização de alvo específico. (Machado *et al.*, 2007) O extrato etanólico também apresentou efeito antidepressivo no TSC, reduzindo o tempo de imobilidade. Este efeito foi atribuído à presença de um flavonóide, a rutina, que aumenta a disponibilidade de noradrenalina e serotonina no SNC. (Machado *et al.*, 2008).

A exposição cutânea ao extrato hexânico de *Schinus molle* L. durante 24 horas, levou ao aumento na atividade locomotora em ratos. (Bras *et al.*, 2011) Esse efeito também foi observado após tratamento agudo ou subcrônico com a incorporação do extrato etanólico na alimentação durante 1 e 14 dias respectivamente. (Ferrero *et al.*, 2007)

Em estudos *in vitro*, o extrato metanólico (Molina-Garza *et al.*, 2014) e os extratos diclorometano e diclorometano/metanol (Delgado-Altamirano *et al.*, 2017) demonstraram efeito antiparasitário. A partir de componentes isolados do extrato diclorometano de *Schinus molle* L, verificou-se importante ação anti-inflamatória e analgésica. (Yueqin *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2016)

O óleo essencial apresentou efeito bactericida (Gundidza, 1993; Hayouni El *et al.*, 2008; De Mendonca Rocha *et al.*, 2012; Elshafie *et al.*, 2016), antifúngico (Dikshit *et al.*, 1986; Do Prado *et al.*, 2018) e antiparasitário. (Baldissera *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2016; Rey-Valeiron *et al.*, 2018) Também já foram identificados efeitos antioxidante, antitumoral (Diaz *et al.*, 2008; Bendaoud *et al.*, 2010), e citotóxico. (Duarte *et al.*, 2018)

Apesar de haver diversos trabalhos sobre os efeitos farmacológicos dessa planta, é escasso o número de pesquisas que demonstram as possíveis ações no SNC, tais como a ação sedativa, antidepressiva e ansiolítica, que ainda não foram bem esclarecidas.

1.1.3 Composição química do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L.

Em uma análise do perfil químico do óleo essencial de *Schinus molle* L., verificou-se sua riqueza em terpenos, sendo que a maioria das substâncias encontradas foram cubenol (13%), espatulenol (11,7%) e trans- β -guaieno (6,2%), que são sesquiterpenos, além de *trans*-pinocarveol (6,2%) e mirtenol (3,9%) que são monoterpenos. (Batista *et al.*, 2016) É importante observar que diferentes estudos demonstram a variação dos constituintes químicos dessa planta, provavelmente devido à região e ao período da coleta, assim como o método utilizado. (Santos *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2008; Bendaoud *et al.*, 2010; Martins Mdo *et al.*, 2014; Rey-Valeiron *et al.*, 2018)

1.2 Transtornos de Humor – Depressão e Ansiedade

A proporção de transtornos mentais tem crescido em todo o mundo nos últimos anos, gerando impactos sobre a saúde e a qualidade de vida da população, além de significativa importância econômica nos países de sua maior prevalência. (Opas, 2018)

Em 2015, 4,4% da população mundial apresentava transtornos de depressão, enquanto 3,6% sofriam com distúrbios de ansiedade, que estão entre as doenças mentais mais comuns, muitas das vezes em situações de comorbidade. Essas proporções variam de acordo com a região, no Brasil, aproximadamente 5,8% (11.548.577 pacientes) da população sofre de depressão e 9,3% (18.657.943 pacientes) de distúrbios de ansiedade. (Who, 2017)

1.2.1 Depressão

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação de Psiquiatria Norte-americana (MDE-V) (Apa, 2014), os transtornos depressivos são caracterizados pela “presença de humor triste, vazio ou irritável, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo.”. E segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), os pacientes também podem apresentar sentimento de culpa, baixa autoestima, anedonia (falta de interesse e prazer), cansaço

excessivo e distúrbios do sono e de apetite. Esses transtornos podem ser divididos em duas classes principais: transtorno depressivo maior (TDM)/episódio depressivo, e distímia.

O TDM acomete a maioria dos pacientes que sofrem de transtornos mentais, os sintomas são caracterizados pelo *déficit* cognitivo e de memória, perda de motivação e prazer, alterações emocionais, motoras e neurovegetativas. (Dean e Keshavan, 2017) Além disso, pode acontecer em comorbidade com outras doenças, como mal de Parkinson, esclerose múltipla, distúrbios do sono e transtornos de ansiedade. (Boing *et al.*, 2012; Montgomery, 2019; White *et al.*, 2019)

Para o diagnóstico da TDM, os pacientes devem apresentar no mínimo 5 dos sintomas descritos na tabela 1, durante duas ou mais semanas.

Tabela 1. Sintomas do episódio depressivo maior de acordo com o MDE-V., 2014

-
- Humor deprimido ou irritável
 - Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos
 - Perda ou ganho significativo de peso, ou diminuição ou aumento de apetite
 - Insônia ou hipersonia
 - Agitação ou retardo psicomotor
 - Fadiga ou perda de energia
 - Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada
 - Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão
 - Pensamentos de morte recorrentes, ideação suicida, tentativa ou plano suicida.
-

Há uma ampla gama de tratamentos disponíveis para a depressão, contudo, cerca de apenas 2/3 dos pacientes apresentam remissão. Os efeitos adversos dos medicamentos além da demora na melhoria dos sintomas, acabam induzindo muitos pacientes a abandonar o tratamento, além de levar ao aumento do risco de suicídio. (Madhukar H. Trivedi *et al.*, 2006)

Nas últimas décadas, muitos trabalhos têm investigado a causa da TDM, contudo, é importante ressaltar que seus mecanismos ainda não estão bem elucidados. Há alterações na neurotransmissão dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e glutamatérgico, hiperativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, alterações vasculares, aumento da inflamação e do estresse oxidativo e diminuição da neurogênese e da neuroplasticidade. Fatores ambientais e genéticos estão intimamente relacionados às manifestações dessa doença. (Maes *et al.*, 2011; Dean e Keshavan, 2017; Matrov *et al.*, 2019)

As classes de fármacos comumente utilizadas no tratamento da depressão nos dias atuais são um refinamento dos mecanismos de ação dos medicamentos originais: os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da monoamina oxidase além de medicamentos classificados como antidepressivos “atípicos” (tabela 2). (Moreno *et al.*, 1999; Willner *et al.*, 2013)

Tabela 2. Classes de fármacos utilizadas no tratamento da TDM

Classe original	Classes derivadas	Exemplo de fármaco disponível
Antidepressivos tricíclicos	- Inibidores seletivos da recaptção da serotonina (5-HT) (ISRSs) - Inibidores seletivos da recaptção da Noradrenalina (NA) (ISRNs) - Inibidores da recaptção de 5-HT e NA (IRSNs)	Citalopram, Reboxetina Venlafaxina
Antidepressivos “atípicos”	- Agonista de receptores 5-HT _{1A} - Antagonistas de receptores (α_2 , 5-HT _{2C} e 5-HT ₃)	Buspirona Mirtazapina
Inibidores da MAO (iMAOs)	- Inibidor seletivo da MAO-A - Inibidor reversível da MAO-A	Clorgilina Moclobemida

Além dessas classes de fármacos, estudos tem demonstrado a eficácia da quetamina, um antagonista não-competitivo e de alta afinidade pelo receptor NMDA (receptor ativado pelo glutamato), que em uma única dose age de maneira rápida diminuindo os sintomas em pacientes que não respondem ao tratamento com antidepressivos típicos e nos que possuem idealização suicida. (Diazgranados *et al.*, 2010; Machado-Vieira *et al.*, 2012; Zanos e Gould, 2018)

1.2.2 Ansiedade

Do ponto de vista adaptativo, a expressão emocional de medo é uma resposta natural a uma ameaça iminente real ou percebida, enquanto o sentimento de ansiedade é uma antecipação de ameaça futura. (Who, 2017) Essas respostas envolvem funções fisiológicas que incluem comportamentos de defesa, reflexos autonômicos, despertar e alerta, secreção de corticosteroides e emoções negativas. Nesse contexto, a ansiedade é uma emoção básica normal que acontece de forma antecipatória e passa a ser uma doença quando se encontra aumentada, onde os sintomas interferem no conforto emocional, na qualidade de vida, e na realização de tarefas diárias consideradas normais. (Allen *et al.*, 1995; Ströhle *et al.*, 2018) Além disso, distúrbios de ansiedade costumam estar em comorbidade com outros transtornos psiquiátricos, como depressão, epilepsia, autismo, esquizofrenia, doença de Alzheimer e abuso de drogas psicoativas. (Cosoff e Hafner, 1998; Burns e Teesson, 2002; Beyenburg *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2015; Ehrenberg *et al.*, 2018; Lecavalier *et al.*, 2018; Price *et al.*, 2018)

Indivíduos que apresentam transtornos de ansiedade, possuem sintomas como medo e ansiedade excessivos, com perturbações comportamentais. Estes transtornos diferem entre si e

são classificados pela Associação de Psiquiatria Norte-americana conforme tabela 3. (Apa, 2014)

Tabela 3. Classificação dos Transtornos de ansiedade segundo MDE-V., 2014

-
1. Transtorno de Ansiedade de Separação
 2. Mutismo Seletivo
 3. Fobia Específica
 4. Transtorno de Ansiedade Social (Fobia Social)
 5. Transtorno de Pânico
 6. Especificador de Ataque de Pânico
 7. Agorafobia
 8. Transtorno de Ansiedade Generalizada
 9. Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância/Medicamento
 10. Transtorno de Ansiedade Devido a Outra Condição Médica
 11. Outro Transtorno de Ansiedade Especificado
 12. Transtorno de Ansiedade Não Especificado
-

Do ponto de vista anátomo-funcional, nos transtornos de ansiedade estão envolvidas estruturas que compõe o circuito corticolímbico, como amígdala, hipotálamo, hipocampo, núcleo leito da estria terminal (NLET) e córtex pré-frontal medial (Martin *et al.*, 2009; Adhikari, 2014; Janak e Tye, 2015), onde são identificadas alterações na neurotransmissão GABAérgica (Chen *et al.*, 2018), serotoninérgica, noradrenérgica (Jakubovski *et al.*, 2018), glutamatérgica (Amiel e Mathew, 2007; Ferraguti, 2018), e dopaminérgica. (Bahi e Dreyer, 2018)

Como terapia de curto prazo, os benzodiazepínicos estão entre os primeiros na linha de fármacos que têm sido extensivamente utilizados para tratar as diversas formas de ansiedade (Rabbani *et al.*, 2008; Charney *et al.*, 2011). Possuem eficácia comprovada, porém apresentam muitos efeitos adversos, como tolerância e indução de dependência, sendo então interessante o uso alternativo de diferentes substâncias para pacientes que precisam de tratamento em longo prazo. Com o objetivo de se substituir os benzodiazepínicos, tem sido utilizados fármacos como a Buspirona, um agonista parcial do receptor 5HT_{1A}, e antidepressivos como ADTs, ISRSs, IRSNs e iMAOs, além da psicoterapia, que é um importante coadjuvante para uma melhor resposta do paciente ao tratamento. (Sramek *et al.*, 2002; Tyrer e Baldwin, 2006; Charney *et al.*, 2011; Jakubovski *et al.*, 2018)

1.3 Distúrbios do sono

Distúrbios do sono são comuns em toda população mundial. Estima-se que cerca de 1/3 da população, em algum momento da vida, apresentou sintomas de insônia. Esse grupo de

transtornos, também representa um grande impacto na saúde, visto que os pacientes costumam apresentar outras doenças em comorbidade, como transtornos de humor e doenças neurodegenerativas, assim como doenças do sistema imune e endócrino. (Hallit *et al.*, 2019; Lane *et al.*, 2019)

Segundo a Associação de Psiquiatria Norte-americana, os distúrbios do sono são classificados em 10 grupos: transtorno de insônia, transtorno de hipersonolência, narcolepsia, transtornos do sono relacionados à respiração, transtorno do sono-vigília do ritmo circadiano, transtornos de despertar do sono não REM (*rapid eye movement* - movimentos rápidos dos olhos), transtorno do pesadelo, transtorno comportamental do sono REM, síndrome das pernas inquietas e transtorno do sono induzido por substância/medicamento. Esses transtornos têm por características alterações na qualidade e quantidade de sono, causando prejuízo nas atividades diárias do indivíduo. (Apa, 2014)

De forma geral, os distúrbios do sono têm sido associados a disfunções metabólicas e neuroestruturais no sistema reticular, assim como em regiões do encéfalo tais quais diferentes regiões corticais, no tálamo, hipotálamo, amígdala e no hipocampo. Essas alterações irão então prejudicar o ciclo circadiano do paciente, com perturbações durante o sono que resultarão em sintomas durante o período de vigília, como sonolência e cansaço excessivo, déficit de aprendizagem e atenção e problemas de humor. (Desseilles *et al.*, 2008)

A insônia, segundo a Sociedade Brasileira do Sono, é definida como dificuldade em iniciar e/ou manter o sono, sendo este insuficiente, de forma que altere a qualidade de alerta e bem-estar do indivíduo, comprometendo o desempenho nas suas atividades durante o dia. (Poyares *et al.*, 2003) Além de psicoterapia, diferentes classes de fármacos como os antidepressivos e os ansiolíticos, são utilizadas no tratamento da insônia. Um dos grupos de fármacos mais comumente utilizado é o dos benzodiazepínicos, que tem efeito hipno-sedativo com ação agonista no sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, que é o principal responsável pela inibição sináptica rápida do Sistema Nervoso Central. Os benzodiazepínicos melhoram os sintomas da insônia diminuindo o tempo de latência do sono e os despertares noturnos, assim como reduzindo o período de sono REM (período em que há maior atividade cerebral durante o sono). (Kamel e Gammack, 2006; Stojanovic *et al.*, 2016)

1.4 Ácido gama-aminobutírico

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de mamíferos. (Stojanovic *et al.*, 2016) Neurônios GABAérgicos estão em todos os níveis do Sistema Nervoso Central (SNC) em diferentes proporções e são responsáveis por regular a neurotransmissão excitatória. (Madsen *et al.*, 2007; Luscher *et al.*, 2010) Nesse contexto, atuam regulando diversas funções do Sistema Nervoso Central (SNC) tais como o ciclo circadiano (Ono *et al.*, 2018), atividades neurovegetativas (Guyenet, 2006), processamento motor e sensorial, cognição e comportamento emocional (Stork *et al.*, 2000; Fritschy e Panzanelli, 2014; Lowery-Gionta *et al.*, 2018; Woo *et al.*, 2018) As sinapses GABAérgicas também atuam como importantes moduladoras do desenvolvimento do SNC, exercendo um controle sob a excitabilidade neuronal além de mediar a plasticidade sináptica, definindo a formação dos circuitos neurais. (Chugani *et al.*, 2001; Oh e Smith, 2019)

O GABA pode interagir com 3 tipos de receptores: GABA_A, GABA_B, GABA_C. O GABA_B é um receptor metabotrópico, heterodímero, formado por duas subunidades (GABA_{B1} e GABA_{B2}) (Benarroch, 2012), enquanto receptores GABA_A e GABA_C são pentaméricos, associados a um canal iônico de cloreto (Cl⁻). O GABA_C possui uma estrutura simples homooligomérica, composta pelas subunidades $\rho 1$ ou $\rho 2$ (Qian, 2007), contudo, GABA_A é um receptor hetero-oligomérico complexo, composto por uma ampla gama de combinações entre as subunidades $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π e $\rho 1-3$. (Stefanits *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018)

Cada receptor GABA_A contém duas subunidades α e duas β , completado por uma subunidade $\gamma 2$ em receptores sinápticos ou uma subunidade δ em receptores extra-sinápticos. (Almeida *et al.*, 2019) A conformação mais comum no cérebro humano adulto é a composta pelas subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. (Zhu *et al.*, 2018). O sítio ortostérico desse receptor está localizado entre as subunidades $\alpha 1$ e duas $\beta 2$ e a sua ativação pelo GABA leva a uma alteração na conformação do canal, permitindo a passagem de íons cloreto. (Horenstein *et al.*, 2001) Além desse sítio, receptores GABA_A possuem sítios alostéricos para benzodiazepínicos, neuroesteroides, etanol, barbitúricos e outros anestésicos que interagem modulando sua ativação. (Johnston, 1996; Shin *et al.*, 2018)

Os benzodiazepínicos atuam potencializando os efeitos do GABA aumentando a frequência de abertura dos canais de cloreto. (Barker, 1981) Seus efeitos ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivantes e de relaxamento muscular acontecem devido à interação agonista com o seu sítio alostérico localizado na subunidade $\gamma 2$, e adjacente às subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 5$. (Atack *et al.*, 2011)

Tem sido proposto que a ligação de BDZ ao receptor GABA_Aα1 seja responsável por efeitos sedativos, amnésico e anticonvulsivante, enquanto o GABA_Aα2 apresente efeito ansiolítico e GABA_A α5, que é altamente expresso no hipocampo, esteja relacionado ao déficit de memória causado por BDZs. Efeitos de GABA_A α3 ainda não estão totalmente esclarecidos. (Mckernan *et al.*, 2000; Tyrer e Baldwin, 2006; Duke *et al.*, 2018; Pálvölgyi *et al.*, 2018)

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível ação do óleo essencial obtido de folhas de *Schinus molle* L. (aroeira) no sistema nervoso central de camundongos (*Mus musculus*)

2.1 Objetivos específicos

- i. Avaliar a possível atividade depressora e/ou estimulatória do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. (OEFS) no sistema nervoso central de camundongos.
- ii. Avaliar possível efeito ansiolítico e/ou antidepressivo do OEFS.
- iii. Caso exista efeito do OEFS no Sistema Nervoso Central, avaliar se o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A pode estar envolvido no mecanismo de ação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

As folhas de *Schinus molle* L. foram coletadas no município de Volta Redonda – RJ, Brasil (GPS 22° 31'36" 23S;44° 04'31" 62W). Uma exsicata do espécime foi depositada no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (ICBS,UFRRJ, Brasil) e identificado pelo Dr. Pedro Germano Filho sobre o número de registro RBR 35791.

3.2 Extração do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L.

O óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. (OEFS) foi fornecido pelo professor Douglas Siqueira de Almeida Chaves do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Sua extração foi realizada a partir de amostras com peso de 50 g de folhas secas de *S. molle*, que foram submetidas a hidrodestilação usando um *Clevenger* (Batista *et al.*, 2016), um aparelho laboratorial que faz a extração do óleo por destilação através de técnica de arraste de vapor (Santos *et al.*, 2004), obtendo-se rendimento de 1,2% de óleo.

3.3 Animais e tratamentos

Para realização deste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, machos, pesando entre 30 e 35g, fornecidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à água e ração.

O OEFS foi solubilizado em *Tween* 80 a 10%, completando seu volume com solução salina para se obter as concentrações de 2,5; 5; 10 e 20mg/mL. O diazepam (DZP) foi solubilizado em *Tween* 80 a 10% e seu volume completado com salina para obter as concentrações de 0,1 e 0,5mg/mL. A imipramina (IMI) foi solubilizada em água filtrada obtendo-se a concentração de 1,5mg/mL. *Tween* 80 a 10% em solução salina fisiológica foi utilizado como veículo.

Em todos os tratamentos foram respeitados o volume máximo de 0,1ml/10g de peso de animal.

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo 8847/2016-31 (ANEXO 1).

Todos os experimentos foram filmados e posteriormente analisados.

3.4 Avaliação farmacológica

3.4.1 Avaliação geral dos efeitos de OEFS no Sistema Nervoso Central

Para uma avaliação geral do efeito do OEFS no SNC, foi realizado o teste do campo aberto (CA). O aparato utilizado foi adaptado de Rocha (2011), que consistiu em uma caixa retangular confeccionada em acrílico transparente medindo 32 x 47 x 15cm (largura x comprimento x altura), com o assoalho dividido em 18 demarcações (figura 3), o que permitiu a quantificação da movimentação espontânea do animal através do número de cruzamentos entre as demarcações. Foram realizadas 4 sessões, onde o animal era colocado no centro do aparato e seu comportamento registrado durante 5 minutos. Cada sessão foi realizada nos tempos 30, 60, 100 e 130 minutos após o tratamento com veículo, OEFS100 ou OEFS200 pela via intraperitoneal.



Figura 3. Caixa utilizada como campo aberto para avaliação da ação geral do OEFS no SNC

3.4.2 Triagem da atividade no SNC

Quando se precisa identificar o perfil farmacológico de uma determinada substância, se torna necessário avaliar inicialmente se ela possui ou não efeito no SNC. (Almeida, 2006) Portanto, para se investigar esse efeito, foi realizada uma bateria de 3 testes realizados em seqüência validada em nosso laboratório e sensível tanto à fármacos depressores quanto estimulantes, conforme o esquema da figura 4.



Figura 4. Sequência de testes para avaliação de possível efeito do OEFS no SNC. Os mesmos grupos de animais foram utilizados em todos os testes. CA = Teste do campo aberto, TBG = Teste da barra giratória

Nesta triagem, 30 minutos antes do início do teste, os animais foram tratados com OEFS nas doses de 25, 50 ou 100mg/kg, veículo ou controle positivo (DZP 5mg/kg) pela via intraperitoneal. Após o teste da barra giratória (TBG), os animais foram tratados com etomidato na dose de 25 mg/Kg por via subcutânea.

Teste do campo aberto (CA)

O aparato utilizado no teste do campo aberto consiste em uma arena circular (30cm de diâmetro) confeccionado em acrílico e com assoalho demarcado em 8 divisões na região periférica e 4 divisões na região central, o que permite avaliar a atividade exploratória do animal. O aparato foi mantido sob 80 ± 5 Lux de luminosidade (figura 5).



Figura 5. Aparato utilizado para o teste do campo aberto

O animal era colocado no centro do CA e seu comportamento registrado durante 5 minutos para análise posterior. Para avaliar a movimentação espontânea do animal foram utilizados como parâmetros o número de cruzamentos entre as demarcações, número de comportamentos de levantar (“*rearing*”) e o tempo de imobilidade. (Walsh e Cummins, 1976; Royce, 1977)

Teste da barra giratória

Para avaliação da coordenação motora e possível efeito relaxante muscular do OEFS foi utilizado o teste da barra giratória (TBG). O aparelho utilizado consiste em uma barra giratória de 5,5cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, dividida em 5 compartimentos, a uma altura de 25cm da sua base (figura 6). (Dunham e Miya, 1957)



Figura 6. Equipamento utilizado no teste da barra giratória

No dia anterior ao teste, os animais foram submetidos a um treino onde eram colocados sobre a barra giratória durante 2 minutos, sendo reconduzidos quantas vezes fossem necessárias. A barra girava a uma velocidade constante de 15 rotações por minuto. No dia teste foi registrado o tempo de permanência dos animais na barra giratória (em segundos), com no máximo três reconduções durante o tempo de 60 segundos. Substâncias que alterem a coordenação motora ou possuem efeito relaxante muscular, reduzem a capacidade do animal se manter na barra.

Potenciação do sono induzido por etomidato

Para se avaliar se o OSFS exercia efeito depressor ou estimulante sobre o SNC, também foi realizado o teste do sono induzido por etomidato, uma substância não-barbitúrica com efeito hipnótico-sedativo de curta duração. (Janssen *et al.*, 1975)

Após a injeção do etomidato, foram cronometrados (em minutos) e registrados o tempo da perda do reflexo postural (tempo de indução), e o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo postural (duração do sono). Substâncias com efeito depressor central aumentam o tempo de sono, enquanto estimulantes o reduzem.

3.4.3 Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva

Teste do labirinto em cruz elevado

O uso do LCE como modelo para avaliação da ansiedade foi inicialmente proposto por Pellow (Pellow *et al.*, 1985) e validado para camundongos por Lister (Lister, 1987). Consiste em um aparato composto por dois braços abertos opostos (30 x 05 cm cada) e dois braços fechados (30 x 05 x 25cm cada) também opostos, e uma plataforma central (05 x 05 cm), confeccionado em acrílico opaco e fica suspenso a uma altura de 45 cm do chão. Nesse teste os braços abertos e fechados ficaram sob 200 ± 10 e 20 ± 2 Lux de luminosidade, respectivamente (figura 7).



Figura 7. Aparato utilizado para o teste do labirinto em cruz elevado

Neste teste, foi avaliada a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas nos dois tipos de braços, a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total despendido nos dois tipos de braços e o número de comportamentos de avaliação de risco. Alterações significativas nesses parâmetros podem

indicar possível efeito ansiolítico ou ansiogênico da substância testada. Substâncias com efeito ansiolítico aumentam o número e tempo de permanência nos braços abertos e podem reduzir o número de comportamentos de avaliação de risco, e o contrário também é verdadeiro. Também foi analisado o número de entradas nos braços fechados para se avaliar a atividade motora espontânea dos animais. (Rodgers e Johnson, 1995)

Trinta minutos antes do teste, os animais foram tratados com OEFS nas doses de 25 ou 50mg/kg, veículo ou controle positivo (DZP, 1mg/kg) pela via intraperitoneal.

Teste de Esconder Esferas

Para se avaliar o possível efeito do tipo ansiolítico do OESF, foi também realizado o teste de esconder esferas (TEE). (Broekkamp *et al.*, 1986). Para realização do TEE foram utilizadas caixas de polipropileno branco opaco, medindo 32 x 40 x 15 cm (largura x comprimento x altura), forrada com maravalha compactada com uma espessura aproximada de 2 cm contendo 20 bolinhas de vidro (higienizadas com álcool a 10%), distribuídas uniformemente sobre a superfície (figura 8). Os animais foram colocados em caixas individuais sendo avaliado o número de esferas escondidas com pelo menos 2/3 sob a maravalha durante o período de 20 minutos. Quando o animal é submetido à presença de objetos desconhecidos, ele apresenta o “comportamento de enterrar”. Neste teste, fármacos com efeito ansiolítico reduzem este comportamento, diminuindo o número de esferas escondidas.

Trinta minutos antes do teste, os animais foram tratados com OEFS nas doses de 25 ou 50mg/kg, veículo ou controle positivo (DZP 1mg/kg).



Figura 8: Caixa utilizada no teste de esconder esferas

Teste do nado forçado (NF)

Para se avaliar possível ação do tipo antidepressiva foi utilizado o NF. O teste foi realizado em um cilindro plástico de 18 cm de altura e 15 cm de diâmetro contendo 13 cm de água à uma temperatura constante de 23 ± 2 °C (figura 9).



Figura 9. Teste do nado forçado

O animal foi submetido a uma sessão de 6 minutos de natação sendo avaliado nos 4 minutos finais. Foi registrado como tempo de imobilidade o período em que o animal permanecia imóvel, realizando apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. Fármacos com propriedade antidepressiva reduzem o tempo de imobilidade. (Porsolt *et al.*, 1977)

Neste teste, os animais foram tratados com OEFS nas doses de 25 ou 50mg/kg, veículo ou controle positivo (IMI 15mg/kg), 24, 5 e 1 hora antes do início do teste.

3.4.4 Avaliação do envolvimento do sítio benzodiazepínico no mecanismo de ação do OEFS

Para avaliar se o efeito sedativo do OEFS100 era mediado pelo sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, foi realizado o teste CA sendo o flumazenil (FMZ) utilizado como antagonista competitivo do sítio benzodiazepínico. Neste teste, foram avaliados quatro grupos de animais que receberam os seguintes tratamentos: Veículo+Veículo; Veículo+FMZ, Veículo+OSFSS100 ou FMZ+OSFSS100.

Durante o procedimento, os animais foram pré-tratados com FMZ (1,0mg/kg) ou veículo, e vinte minutos depois foi administrado veículo, ou OEFS100, todos pela via intraperitoneal. O teste do CA foi realizado 50 minutos após o pré-tratamento com FMZ ou veículo.

3.5 Análise estatística

Para análise estatística foi realizado a análise de variância (*one way ANOVA*) seguido do pós-teste de Tukey. No teste da barra giratória foi utilizada a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn. Todas as análises foram feitas com o auxílio do *software* GraphPad Prism[®] versão 6.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados assumiram significância estatística quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação geral dos efeitos de OEFS no Sistema Nervoso Central

Para a avaliação geral do OEFS, foi realizado o teste do campo aberto. Foi avaliada a atividade locomotora do animal através do número de quadrantes percorridos, nos tempos de 30, 60, 100, 130 minutos após o tratamento. O grupo OEFS200 apresentou uma redução significativa de 75% no número de cruzamentos em relação ao grupo controle (OEFS200= $32,3 \pm 17,6$ vs. $129,8 \pm 17,1$) no tempo de 30 minutos. Contudo, nos tempos de 60, 100 e 130 minutos, não houve diferença significativa entre os grupos (figura 10). (Para outros resultados, ver ANEXO 2, tabela 4).

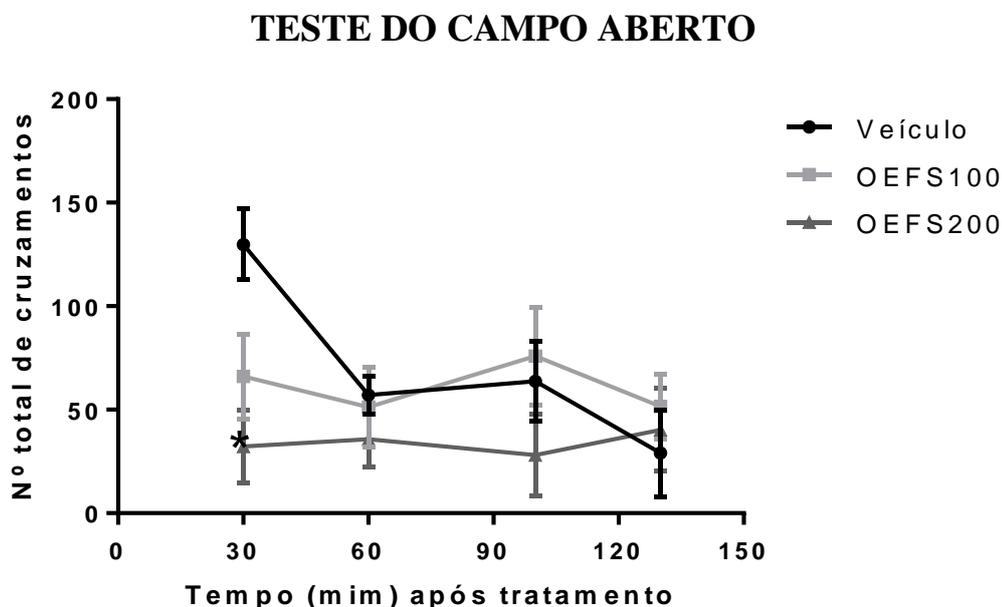


Figura 10. Efeito do tratamento do OEFS na atividade locomotora quantificada pela quantidade de quadrantes percorridos no teste do campo aberto nos tempos 30, 60, 100 130 minutos após o tratamento. n=6. OEFS = óleo essencial de *Schinus molle* L., sendo * $p < 0,05$ significativo comparado ao grupo controle.

4.2 Triagem da atividade no SNC

Para avaliar o possível efeito depressor ou estimulante do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. no SNC, foi realizada uma bateria de testes em sequencia composta pelo teste do campo aberto, teste da barra giratória e teste do sono induzido por etomidato, adaptado de Rocha (2011).

Campo Aberto

No teste do campo aberto foi analisada a atividade locomotora e exploratória do animal, avaliando-se o número de cruzamentos entre as demarcações do assoalho, o número de levantamentos (“rearing”) e tempo de imobilidade. Houve uma redução significativa de 74,0% no número de cruzamentos do grupo OEFS100 em relação ao grupo controle (OEFS100 = $19,1 \pm 6,2$ vs. CT = $73,2 \pm 3,1$)(figura 11-A), assim como a redução em 95,0% do número de “rearing” (OES100 = $1,1 \pm 0,6$ vs. CT = $22,3 \pm 3,6$) (Figura 11-C). O OEFS100 também aumentou significativamente em 2071,0% o tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle (OEFS100 = $165,8 \pm 21,8$ vs. CT = $7,6 \pm 2,6$) (figura 11-B). (Para outros resultados, ver ANEXO 2, tabela 5)

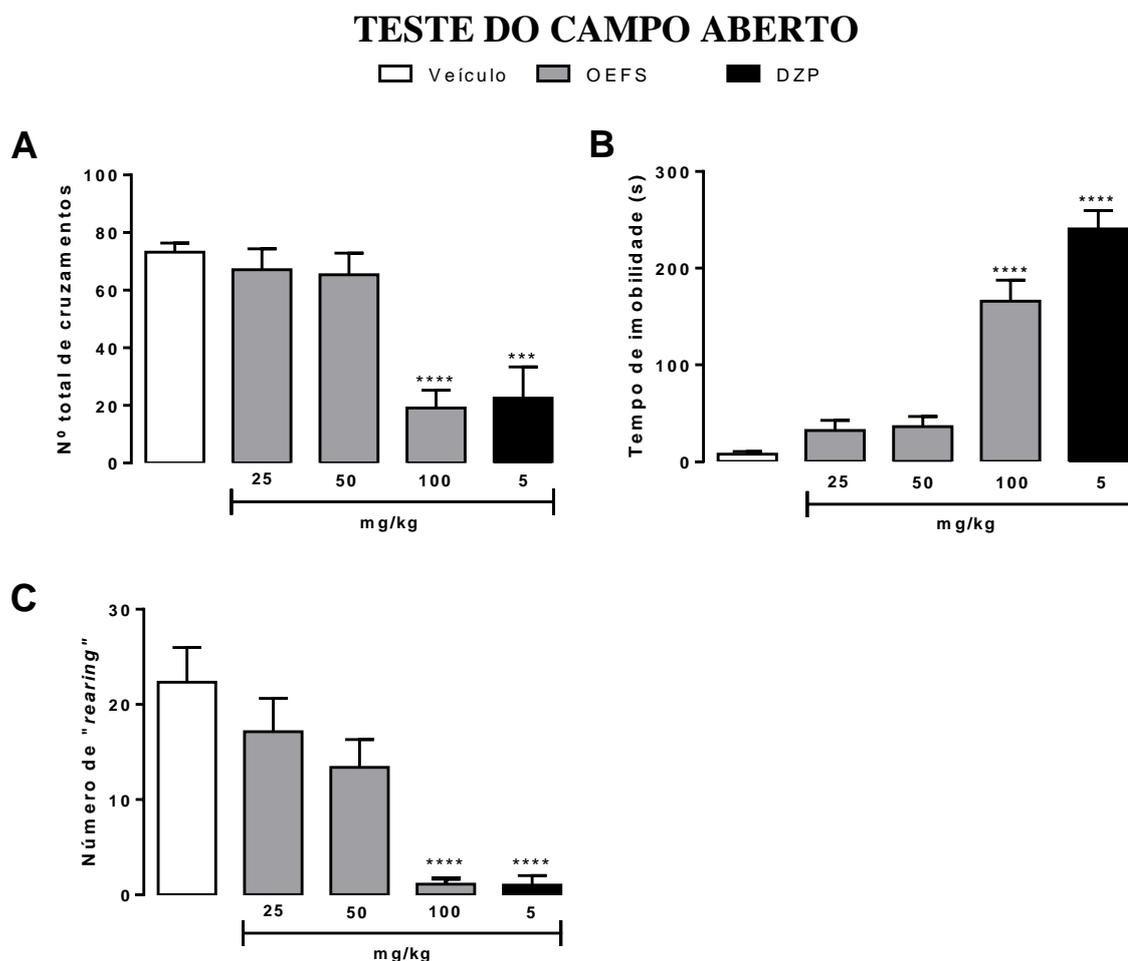


Figura 11. Efeito do tratamento do OEFS na atividade locomotora e exploratória dos animais avaliado através do número total de quadrantes percorridos (A), tempo de imobilidade (B) e número de “rearing” (C) no teste do campo aberto. CT = controle, OESF = óleo essencial de *Schinus molle* L., DZP = diazepam 5mg/kg. Cada coluna representa a média ± EPM (n=6-10), sendo *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ significativo quando comparado ao grupo controle.

Teste da barra giratória

No teste da barra giratória, foi avaliado o número de quedas e o tempo de permanência na barra até a terceira queda, durante o período de 60 segundos. No número de quedas e no tempo de permanência na barra, os grupos tratados com OEFS não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (figura 12). (Para outros resultados, ver ANEXO 2, tabela 6)

TESTE DA BARRA GIRATÓRIA

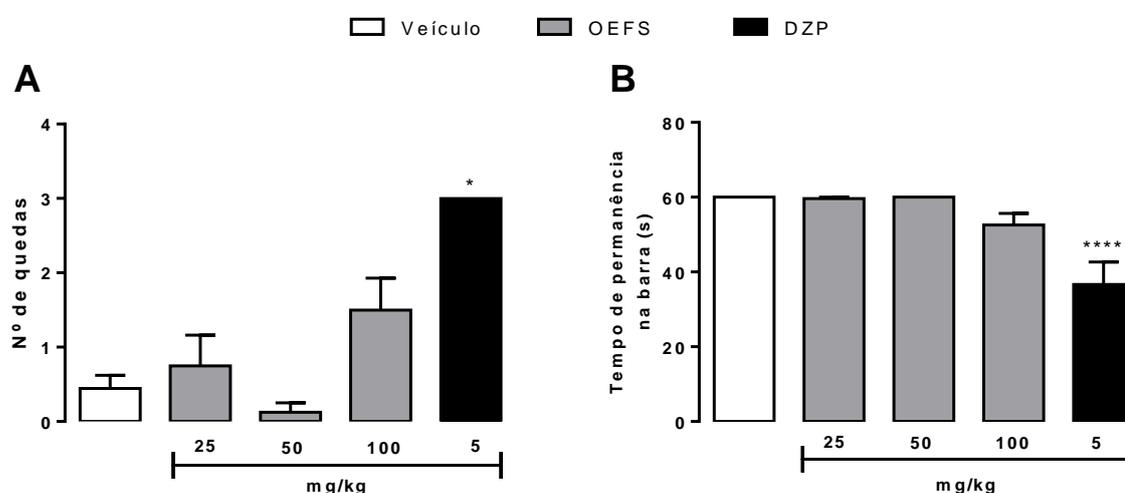


Figura 12. Efeito do tratamento do OEFS na coordenação motora dos animais avaliado através do número de quedas (A) e tempo de permanência na barra até a terceira queda (B), durante o período de 60 segundos. OEFS = óleo essencial de *Schinus molle* L., DZP = diazepam 5mg/kg. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=6-10), sendo * $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) em “A”, e **** $p < 0,0001$ (Anova seguido do teste “t”) em “B”, significativo quando comparado ao grupo controle.

Sono induzido por Etomidato

No teste do sono induzido por etomidato foi avaliado o tempo da perda do reflexo postural (tempo de indução), e o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo postural (duração do sono). O grupo tratado com OEFS100 apresentou aumento significativo de 95,5% no tempo de recuperação do sono em relação ao grupo controle (OEFS100 = $168,4 \pm 15,0$ vs. CT = $86,1 \pm 9,0$ s) (figura 13, A). Contudo, no tempo de indução do sono não houve diferença estatística significativa (figura 13, B). (Para outros resultados, ver ANEXO 2, tabela 7)

TESTE DO SONO INDUZIDO POR ETOMIDATO

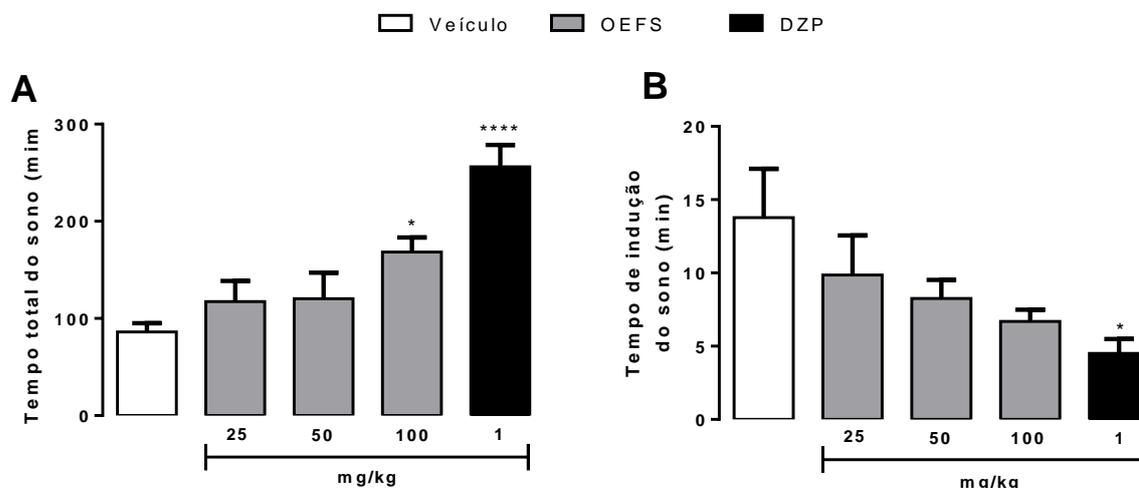


Figura 13. Efeito do tratamento do OFES no tempo total (A) e no tempo de indução (B) do sono induzido por etomidato (A) OEFS = óleo essencial de *Schinus molle* L., DZP = diazepam 5mg/kg. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=6-10), sendo * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ significativo quando comparado ao grupo controle.

4.3 Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva

Teste do labirinto em cruz elevado

No teste do LCE, foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de entradas e de tempo despendido nos braços abertos, tempo na plataforma central, número total de entradas nos dois braços, tempo e número de entradas nos braços fechados, e o número de avaliações de risco realizadas pelo animal. Em nenhum dos parâmetros, o OEFS apresentou diferença estatística significativa (figura 14). (Para outros resultados, ver ANEXO 2, tabela 8)

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

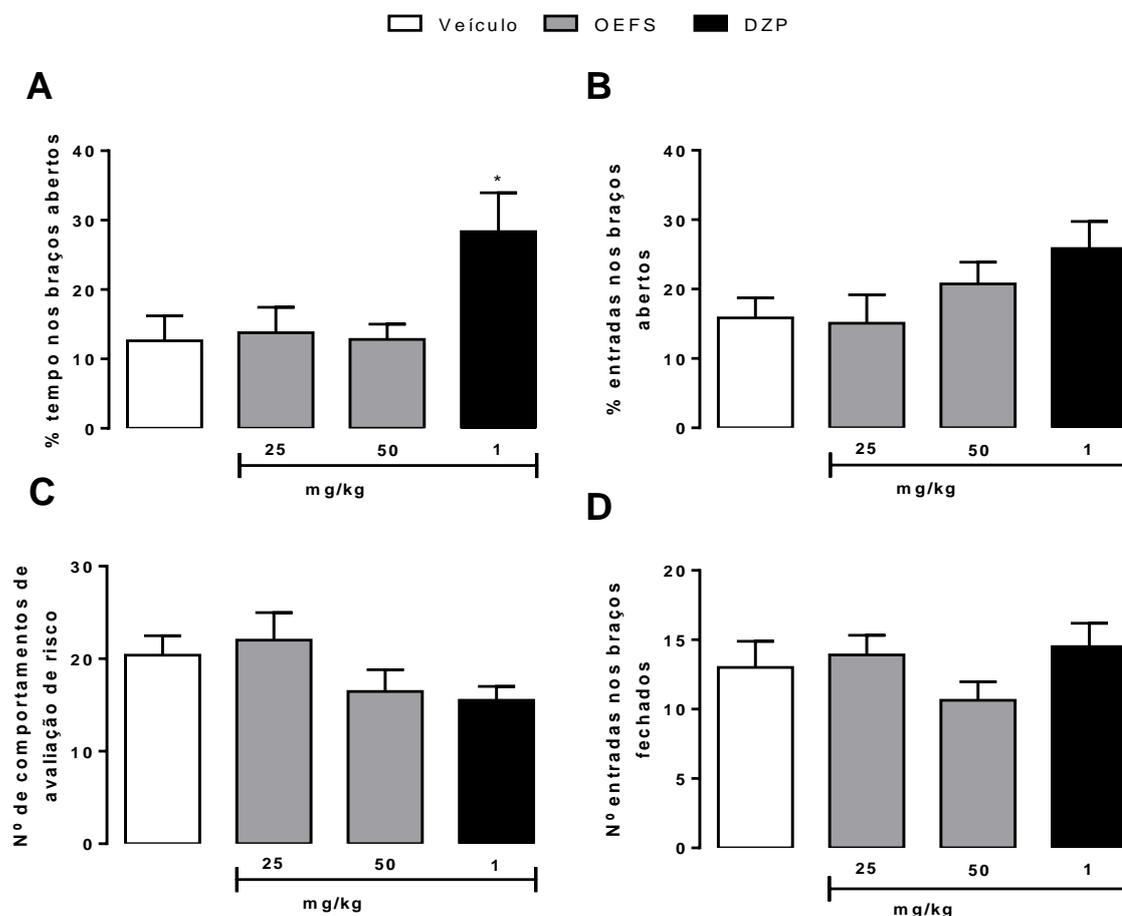


Figura 14. Parâmetros avaliados no Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Foram analisadas porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo despendido nos dois braços (A) a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação às entradas nos dois braços (B), número de comportamentos de avaliação de risco (C), número de entradas nos braços fechados (D). OEFS = óleo essencial de *Schinus molle* L., DZP = diazepam 1mg/kg. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=10-12), sendo $*p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Teste de esconder esferas

No teste de esconder esferas foi avaliado o número de esferas escondidas, com cerca de 2/3 sob a maravalha. Nenhum dos grupos tratados com OEFS apresentou diferença significativa em relação ao controle (CT = $17,0 \pm 1,1$ (n=11); OEFS25 = $13,2 \pm 1,3$ (n=10); OEFS50 = $12,0 \pm 2,4$ (n=8); DZP = $9,8 \pm 1,6$ (n=11)) (figura 15).

TESTE DE ESCONDER ESFERAS

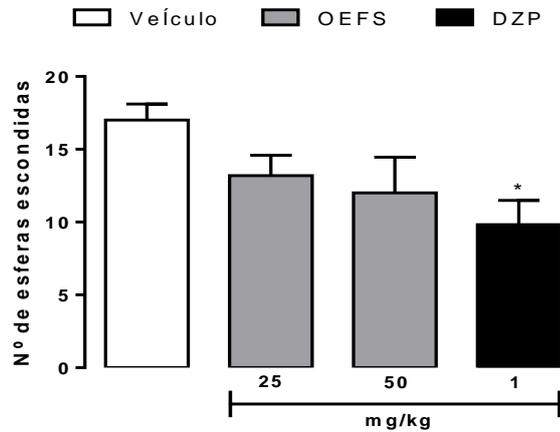


Figura 15. Efeito do tratamento com OEFS no número de esferas escondidas no teste de esconder esferas. OEFS = óleo essencial de *Schinus molle* L., DZP = diazepam 1mg/kg. Cada coluna representa a média ± EPM (n=8-11), sendo * $p < 0,05$ significativo quando comparado ao grupo controle.

Teste do nado forçado

No teste do nado forçado foi avaliado o tempo de imobilidade do animal durante os 4 minutos finais da sessão de 6 minutos. Os animais tratados com o OEFS não apresentaram diferença significativa no tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle (CT = $131,1 \pm 13,3$ (n=9); OEFS25 = $120,1 \pm 8,6$ (n=9); OEFS50 = $141,9 \pm 14,0$ (n=7); IMI = $78,1 \pm 6,1$ (n=9)) (figura 16).

TESTE DO NADO FORÇADO

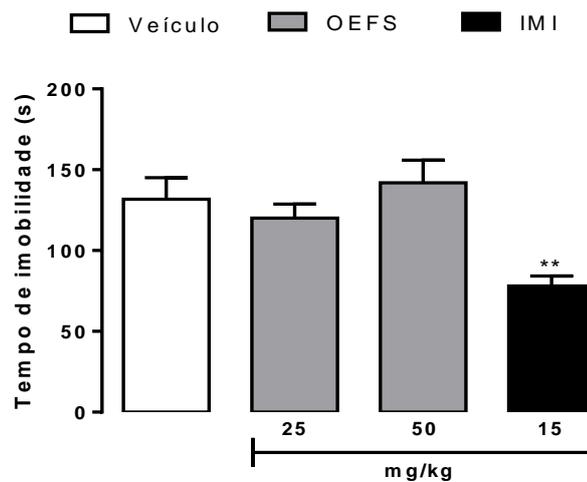


Figura 16. Efeito do tratamento do OEFS no tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado. OESF = óleo essencial de *Schinus molle* L.. OEFS = óleo essencial de *Schinus molle* L., IMI = imipramina 15mg/kg. Cada coluna representa a média ± EPM (n=7-9), sendo ** $p < 0,01$ significativo quando comparado ao grupo controle.

4.4 Avaliação do envolvimento do sítio benzodiazepínico no mecanismo de ação do OEFS

Para avaliar se o efeito sedativo exercido OEFS100 na dose de 100mg/kg, estava envolvido com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, foi avaliada a atividade locomotora e exploratória do animal no campo aberto. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número quadrantes percorridos, comportamentos de levantar (“rearing”) e tempo de imobilidade. (Walsh e Cummins, 1976; Royce, 1977).

O OEFS100 apresentou redução significativa na porcentagem relativa do número de quadrantes percorridos em relação à média do grupo controle (OEFS100 = 45,4 ± 8,1 v.s. CT = 100,0 ± 6,7%) assim como redução da porcentagem de “rearing” (OEFS100 = 21,8 ± 6,5 v.s. CT 100 ± 6,9%). Além disso, o OEFS100 também apresentou aumento significativo da porcentagem relativa do tempo de imobilidade em relação à média do grupo controle (OEFS100 = 7200 ± 1565 v.s. CT = 100 ± 0,0). O flumazenil não foi capaz de reverter os efeitos do OEFS100 nos parâmetros analisados (figura 18). (Para outros resultados, ver ANEXO 2, tabela 9).

TESTE DO CAMPO ABERTO

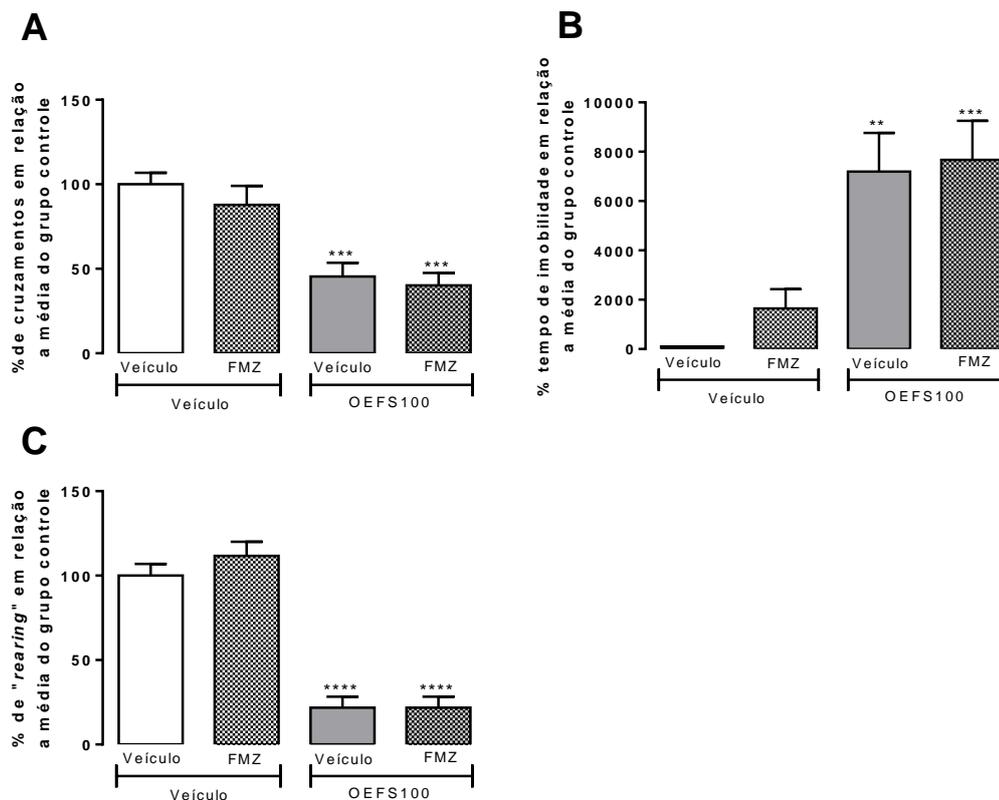


Figura 17. Efeito do tratamento do OEFS na atividade locomotora e exploratória dos animais avaliado através do porcentagem relativa de quadrantes percorridos (A), porcentagem relativa do número de “rearing” (B) e porcentagem tempo de imobilidade (C) no teste do campo aberto. OEFS100 = óleo essencial de *Schinus molle* L. na dose de 100mg/kg, FMZ = flumazenil 1,0mg/kg. Cada coluna representa a média ± EPM (n=9-11), sendo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ significativo comparado ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Schinus molle L. é amplamente utilizada pela medicina popular para diversas finalidades, incluindo o tratamento da depressão. Em estudos anteriores, o extrato hexânico de *Schinus molle* L. reduziu o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC), um importante modelo animal sensível a fármacos antidepressivos de diversas classes. Nesse mesmo estudo, demonstrou-se que esse efeito foi mediado pela interação do extrato hexânico com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico. (Machado *et al.*, 2007) Estudos com o extrato etanólico de *Schinus molle* L também demonstraram redução no tempo de imobilidade no TSC, contudo, não apresentou efeito significativo na redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, que também é um modelo de “comportamento de desespero”. Isso pode ser justificado devido ao fato desses dois testes apresentarem variabilidade da resposta a certas classes de fármacos antidepressivos, indicando substratos e vias bioquímicas diferentes. (Porsolt *et al.*, 1979; Cryan *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008)

Sobre o óleo essencial, não há estudos que demonstrem seus efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC). Então, para uma avaliação geral dos efeitos do OEFS, foi realizado o teste do campo aberto (CA), onde foi registrado o número de cruzamentos (durante 5 minutos) nos tempos 30, 60, 100, 130 minutos após o tratamento com OEFS nas doses 100 e 200mg/kg pela via intraperitoneal (OEFS100 e OEFS200). Aos 30 minutos, o grupo OEFS200 apresentou uma redução significativa no número de quadrantes percorridos. Estes dados sugerem possível efeito do OEFS como agente depressor central e/ou relaxante muscular periférico, pois fármacos que possuem esse efeito causam a redução da movimentação espontânea no CA. (Herrera-Ruiz *et al.*, 2007) Nos testes realizados nos tempos de 60, 100, 130 minutos, não houve diferença no número de cruzamentos dos grupos tratados com OEFS em relação ao grupo controle, que também demonstrou redução na movimentação espontânea. Esses resultados podem ser atribuídos ao aprendizado e habituação do animal ao CA (figura 10). (Haleem *et al.*, 2015)

Com base nesta análise, concluímos que o prazo de 30 minutos após a administração do OEFS é suficiente para o início da avaliação comportamental. Também determinamos as doses utilizadas para a triagem farmacológica (25, 50 e 100mg/kg.), observando-se que o OEFS200 apresentou acentuado efeito depressor, o que impossibilitaria a avaliação em modelos de depressão e ansiedade.

Para avaliar possível efeito depressor ou estimulante do OEFS no sistema nervoso central, foi realizada uma triagem farmacológica composta pelos testes do CA, da barra

giratória (TBG) e do sono induzido por etomidato, adaptado de Rocha, 2011. (Rocha *et al.*, 2011).

No teste do campo aberto, a dose de 100 mg/kg apresentou redução significativa de 74% no número de cruzamentos, assim como redução de 95% no número de levantamentos, e aumentou em 2071% o tempo de imobilidade (figura 11). Considerando a tendência natural do animal em explorar quando inserido em um ambiente novo, no teste do campo aberto é possível avaliar a movimentação espontânea assim como o comportamento exploratório, através do número de quadrantes percorridos, número de episódios de exploração vertical (“*rearing*”) e tempo de imobilidade. Este teste é um modelo bastante difundido para a triagem de novos fármacos, onde depressores centrais ou miorelaxantes reduzem a movimentação, enquanto fármacos estimulantes a aumentam. (Kafkafi e Elmer, 2005) A redução da movimentação dos animais do grupo tratado com OEFS100 indica possível ação depressora do OEFS no SNC e/ou relaxante muscular.

No teste da barra giratória nenhum dos grupos tratados com OEFS apresentou diferença significativa no número de quedas e no tempo de permanência na barra (figura 12). O teste da barra giratória avalia a coordenação motora dos animais que pode ser alterada por fármacos depressores centrais e/ou relaxantes musculares. (Yildirim *et al.*, 2012) Estes dados comparados com resultados obtidos no CA, sugerem ação sedativa mas não miorelaxante do OEFS100.

Após o teste da barra giratória, os animais foram tratados com etomidato para a realização do teste do sono induzido. O etomidato é uma substância não-barbitúrica com efeito hipnótico-sedativo de curta duração. (Janssen *et al.*, 1975) Ele possui seletividade aos receptores GABA_A que contenham as subunidade β_2 e β_3 (Hill-Venning *et al.*, 1997), sendo a ligação ao β_2 responsável pelos seus efeitos sedativos e β_3 pelos efeitos anestésicos (Jurd *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2003). No teste do sono induzido por etomidato é possível avaliar se a substância testada possui efeito hipno-sedativo, pois quando duas substâncias com ação depressora se somam, há um aumento no tempo de sono. O grupo OEFS100 apresentou aumento de 95% no tempo de recuperação do sono em comparação ao grupo controle (figura 13, A). Estes dados sugerem ação depressora da dose de 100mg/kg do OEFS, corroborando os resultados obtidos no teste do campo aberto.

Analisando os efeitos do OEFS nos testes do campo aberto e do sono induzido por etomidato realizados na triagem farmacológica, foi possível observar que OEFS100 apresentou efeito qualitativamente similar ao diazepam na dose hipno-sedativa (5mg/kg). Porém, no teste da barra giratória, o OEFS não obteve efeito sobre a coordenação motora, assim como também

não causou relaxamento muscular, o que acontece com o diazepam utilizado no controle positivo. Com base nesses dados, é possível concluir que a dose OEFS 100mg/kg possui efeito depressor no SNC, com ação sedativa, porém não possui efeito sobre a coordenação motora nem ação miorelaxante.

Observando-se o efeito sedativo do OEFS na dose de 100mg/kg, esta foi descartada para os testes posteriores, sendo então testadas apenas as doses de 25 e 50mg/kg.

Para avaliar o possível efeito ansiolítico do óleo essencial, foram utilizados os testes do labirinto em cruz elevado (Lister, 1987) e esconder esferas. (Broekkamp *et al.*, 1986; Njung'e e Handley, 1991) Para avaliação do possível efeito antidepressivo, foi utilizado o teste do nado forçado. (Porsolt *et al.*, 1977)

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado como um modelo animal de ansiedade para testar fármacos com possível atividade ansiolítica. Este teste é baseado na aversão do animal a áreas abertas, onde a porcentagem do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos em relação aos braços fechados são indicadores de efeito ansiolítico ou ansiogênico de substâncias testadas. Benzodiazepínicos por exemplo, um grupo de fármacos com propriedade ansiolítica, aumentam significativamente estes parâmetros. (Lister, 1987)

Os resultados obtidos no LCE demonstraram que o OEFS nas doses de 25 e 50mg/kg não foram capazes de causar efeito ansiolítico, não alterando significativamente a porcentagem de entradas ou tempo de permanência nos braços abertos em relação aos braços fechados (figura 14). Estudos já demonstraram que o LCE apresenta diferentes sensibilidades a diferentes classes de fármacos ansiolíticos e a diferentes tipos de medo. (File *et al.*, 1993; Hogg, 1996), então se torna necessária a realização de outro teste de ansiedade para se descartar um possível efeito ansiolítico do OEFS. Para isso, foi realizado o teste de esconder esferas (TEE).

O teste de esconder esferas é um importante modelo animal para ansiedade, ele tem como principal parâmetro a quantificação de esferas escondidas pelo animal, visto que camundongos apresentam “comportamento de enterrar” mediante a estímulos aversivos. Este teste é sensível a fármacos com propriedades ansiolíticas, onde é possível observar a redução no número de esferas escondidas. (Broekkamp *et al.*, 1986) Neste trabalho, nenhum dos grupos tratados com OEFS apresentou diferença significativa no número de esferas escondidas em relação ao grupo controle (figura 15), isso corrobora os resultados obtidos no LCE,

demonstrando que o OEFS nas doses de 25, 50 mg/kg não apresenta efeito do tipo ansiolítico em camundongos.

Para se avaliar a possível atividade do tipo antidepressiva, foi realizado o teste do nado forçado. No teste, o animal é colocado em um cilindro com água e submetido a natação forçada durante o período de 6 minutos. No início do teste, o animal demonstra grande movimentação na tentativa de escapar ("*behavioral despair*"), e após esse período, percebendo a impossibilidade de fuga, apresenta desistência assumindo uma postura de apenas flutuação. (Porsolt *et al.*, 1977) Esse teste é sensível a diversas classes de fármacos antidepressivos, que reduzem significativamente o tempo de imobilidade. (Porsolt *et al.*, 1977)

Os resultados obtidos no teste do nado forçado demonstraram que os tratamentos com OEFS nas doses de 25 e 50 mg/Kg não são capazes de induzir efeito antidepressivo (figura 16). Apesar deste resultado, a ação antidepressiva do óleo não pode ser totalmente descartada, visto que alguns fármacos apresentam esta ação apenas após tratamento crônico. (Jiao *et al.*, 2011) Além disso, é importante considerar que comparado ao TSC, outro modelo animal de depressão, o NF apresenta diferenças na variabilidade da resposta a certas classes de fármacos antidepressivos, indicando substratos e vias bioquímicas diferentes. (Porsolt *et al.*, 1979; Cryan *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008) Neste contexto, mais estudos são necessários para se descartar um possível efeito antidepressivo do OEFS no tratamento crônico em conjunto com diferentes modelos de depressão.

O receptor GABA_A quando ativado pelo GABA, se abre permitindo a passagem de íons cloreto, o que causa a hiperpolarização da membrana celular. Ele apresenta diferentes sítios alostéricos que modulam seu funcionamento. O sítio benzodiazepínico, quando ativado, altera conformação do canal, fazendo com que o GABA apresente maior afinidade pelo seu sítio ortostático, aumentando a frequência de abertura do receptor. (Horenstein *et al.*, 2001)

Então, devido ao OEFS100 ter demonstrado efeito depressor no SNC na triagem farmacológica, foi avaliada a possível interação do OEFS com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Para isso, foi realizado pré-tratamento com o fármaco flumazenil, um antagonista competitivo do sítio benzodiazepínico, e após os tratamentos com salina ou OEFS100, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, onde foi analisada a movimentação espontânea. Conforme observado anteriormente, o OESF100 reduziu significativamente o número de quadrantes percorridos assim como a exploração vertical ("*rearing*"). Também provocou o aumento do tempo de imobilidade, confirmando seu efeito depressor identificado na triagem farmacológica. O pré-tratamento com flumazenil na dose de

1,0mg/kg não foi capaz de reverter o efeito depressor causado pelo OEFS100 sobre a movimentação espontânea do animal nos parâmetros analisados (figura 17). Contudo, é importante ressaltar que para se obter reversão do efeito sedativo causado por benzodiazepínicos, outros trabalhos utilizaram doses mais elevadas de flumazenil. (Mckernan *et al.*, 2000; Zapata-Sudo *et al.*, 2010; Ngoupaye *et al.*, 2013) Portanto, apesar dos dados obtidos no experimento sugerirem que o mecanismo envolvido no efeito depressor causado pelo OEFS pode não estar relacionado ao sítio benzodiazepínico, não podemos afirmar com exatidão, sendo necessário experimentos adicionais com doses superiores de flumazenil.

Visto que o receptor GABA_A possui outros sítios alostéricos, como o sítio dos barbitúricos, etanol e esteroides, para se verificar a participação destes no efeito sedativo do OEFS, se tornam necessários mais experimentos com outros antagonistas, assim como um antagonista do sítio ortostático do GABA.

O OEFS possui como um de seus constituintes majoritários, o espatulenol (11,7%). (Batista *et al.*, 2016) Na literatura existe apenas um trabalho que identifica a atividade do espatulenol no SNC. Neste, o espatulenol demonstrou efeito sedativo em peixes, sem apresentar mortalidade mesmo em doses mais altas. (Benovit *et al.*, 2015), Em outro trabalho, o óleo essencial de *Baccharis uncinella*, que possui o espatulenol como um dos componentes majoritários, demonstrou efeito sedativo em camundongos, porém não houve o estudo com essa molécula isolada. (Sens *et al.*, 2012) Estes dados sugerem que o efeito sedativo causado pelo OEFS100 pode ser devido à presença do espatulenol em sua composição. Contudo, mais estudos são necessários para se confirmar essa hipótese e investigar seus possíveis mecanismos de ação.

O OEFS também possui outros componentes que já demonstraram efeito no sistema nervoso central, agindo através da modulação do receptor GABA_A. O mirtenol, que compõe 3,9% do OEFS utilizado neste trabalho, exerce efeito do tipo ansiolítico em camundongos, possivelmente como agonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. (Kessler *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2014; Van Brederode *et al.*, 2016). Além disso, exerce efeito sedativo na dose de 150mg/kg, (De Sousa *et al.*, 2007) o que não seria compatível com a dose apresentada pelo óleo essencial aqui estudado. O *trans*-pinocarveol, encontrado em 6,2% do OEFS utilizado neste trabalho, é o constituinte majoritário do óleo essencial de *Pimpinella peregrina*. O óleo essencial desta planta exerce efeito ansiolítico e antidepressivo em camundongos tratados com escopolamina. A escopolamina é utilizada como modelo animal para indução de demência, apresentando alterações de comportamento nos testes de ansiedade e depressão. (Kessler *et al.*,

2014; Aydin *et al.*, 2016) Outro composto encontrado no OEFS é o α -pineno (3,4%), que possui efeito ansiolítico e hipnótico, sendo dose-dependente em camundongos. (Satou *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016)

Ainda estão presentes no óleo em porcentagens relevantes, o β -pineno (6,7% do OEFS) que possui efeito do tipo antidepressivo demonstrado pela redução do tempo de imobilidade no NF e efeito sedativo, reduzindo a exploração espontânea no CA (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012) e o β -cariofileno (4,6% no OEFS), que no trabalho de Galdino (2012) demonstrou efeito ansiolítico em camundongos, não sendo mediado pelo sítio benzodiazepínico nem pelo receptor 5-HT_{1A}. (Galdino *et al.*, 2012) Em um trabalho mais recente, além de efeito ansiolítico, o β -cariofileno obteve efeito antidepressivo em camundongos, sendo o mecanismo de ação relacionado à ação agonista sobre o receptor endocanabinoide CB₂. (Bahi *et al.*, 2014)

Apesar da presença de várias substâncias com efeito ansiolítico no OEFS testado neste trabalho, o mesmo não apresentou essa propriedade nos modelos animais utilizados. Este fato pode ser devido a sobreposição do efeito sedativo que pode ter sido causado pelo o espatulenol. Como não há trabalhos sobre efeitos do espatulenol no sistema nervoso central, se torna interessante um estudo com essa molécula isolada para se avaliar seus efeitos e seus mecanismos de ação.

6 CONCLUSÕES

- Não foram evidenciados indicativos de ação ansiolítica do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. após tratamento agudo por via intraperitoneal.
- Não foram evidenciados indicativos de ação antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. após tratamento agudo por via intraperitoneal, não descartando possíveis efeitos crônicos.
- O tratamento agudo por via intraperitoneal com o óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. a partir da dose de 100mg/kg apresentou efeito sedativo.
- O efeito sedativo do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. na dose de 100mg/kg parece não ser mediado pelo sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 112, 2014. ISSN 1662-5153 (Print)

1662-5153.

AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007. ISSN 0102-695X.

ALLEN, A. J.; LEONARD, H.; SWEDO, S. E. Current knowledge of medications for the treatment of childhood anxiety disorders. **Journal of the American Academy of child & Adolescent psychiatry**, v. 34, n. 8, p. 976-986, 1995. ISSN 0890-8567.

ALMEIDA, F. B. et al. Hemisphere-dependent Changes in mRNA Expression of GABAA Receptor Subunits and BDNF after Intra-prefrontal Cortex Allopregnanolone Infusion in Rats. **Neuroscience**, v. 397, p. 56-66, 2019/01/15/ 2019. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452218307620> >.

ALMEIDA, R. N. D. **Psicofarmacologia, Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: 2006. 357.

AMIEL, J. M.; MATHEW, S. J. Glutamate and anxiety disorders. **Current psychiatry reports**, v. 9, n. 4, p. 278-283, 2007. ISSN 1523-3812.

APA. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. American Psychiatric Association. Artmed Editora, 2014. ISBN 8582711832.

ATAK, J. et al. MRK-409 (MK-0343), a GABAA receptor subtype-selective partial agonist, is a non-sedating anxiolytic in preclinical species but causes sedation in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 314-328, 2011. Disponível em: < <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0269881109354927> >.

AWAD, R. et al. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 8, p. 1075-1081, 2009. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.2712> >.

AYDIN, E. et al. The effects of inhaled *Pimpinella peregrina* essential oil on scopolamine-induced memory impairment, anxiety, and depression in laboratory rats. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 9, p. 6557-6567, 2016. ISSN 0893-7648.

BAHI, A. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 119-124, 2014/08/01/ 2014. ISSN 0031-9384. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938414003400> >.

BAHI, A.; DREYER, J. L. Dopamine transporter (DAT) knockdown in the nucleus accumbens improves anxiety- and depression-related behaviors in adult mice. **Behav Brain Res**, v. 359, p. 104-115, Oct 24 2018. ISSN 0166-4328.

BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. **Exp Parasitol**, v. 134, n. 3, p. 356-61, Jul 2013. ISSN 0014-4894.

BARKER, J. L. Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 7180-7184, 1981. ISSN 0027-8424.

BATISTA, L. C. et al. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. v. 143, n. 5, p. 627-38, Apr 2016. ISSN 0031-1820.

BENARROCH, E. E. GABA_B receptors. **Structure, functions, and clinical implications**, v. 78, n. 8, p. 578-584, 2012. Disponível em: <
<http://n.neurology.org/content/neurology/78/8/578.full.pdf> >.

BENDAOUD, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **J Food Sci**, v. 75, n. 6, p. C466-72, Aug 1 2010. ISSN 0022-1147.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1675-1689, 2015. ISSN 0001-3765.

BEYENBURG, S. et al. Anxiety in patients with epilepsy: systematic review and suggestions for clinical management. **Epilepsy & Behavior**, v. 7, n. 2, p. 161-171, 2005. ISSN 1525-5050.

BOING, A. F. et al. Associação entre depressão e doenças crônicas: um estudo populacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 617-623, 2012. ISSN 0034-8910.

BRAS, C. et al. Evaluation of the acute dermal exposure of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of *Schinus molle* var. *areira* L. in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 3, p. 1450-6, Oct 11 2011. ISSN 0378-8741.

BRITANNICA, E. O. E. **Encyclopædia Britannica® Online**. BRITANNICA, E. O. E. 2017.

BROEKKAMP, C. L. et al. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 126, n. 3, p. 223-9, Jul 31 1986. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

BURNS, L.; TEESSON, M. Alcohol use disorders comorbid with anxiety, depression and drug use disorders: Findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well Being. **Drug and alcohol dependence**, v. 68, n. 3, p. 299-307, 2002. ISSN 0376-8716.

BUSSMANN, R. W.; SHARON, D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía—La flora mágica y medicinal del Norte de Peru. 2015.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005/08/22/ 2005. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003612> >.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHARNEY, D. S. et al. Pharmacotherapy of Anxiety Disorders. In: 3 (Ed.). **Neurobiology of Mental Illness**. USA: Oxford University Press, 2011. cap. 47,

CHEN, X. et al. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2018/12/05 2018. ISSN 1745-7254. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0185-5> >.

CHUGANI, D. C. et al. Postnatal maturation of human GABAA receptors measured with positron emission tomography. **Annals of Neurology**, v. 49, n. 5, p. 618-626, 2001. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.1003> >.

COSOFF, S. J.; HAFNER, R. J. The prevalence of comorbid anxiety in schizophrenia, schizoaffective disorder and bipolar disorder. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 67-72, 1998. ISSN 0004-8674.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005. ISSN 0149-7634.

DE MENDONCA ROCHA, P. M. et al. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12023-36, Oct 12 2012. ISSN 1420-3049.

DE SOUSA, D. P. et al. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 7-8, p. 563-566, 2007. ISSN 1865-7125.

DEAN, J.; KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian J Psychiatr**, v. 27, p. 101-111, Jun 2017. ISSN 1876-2018.

DELGADO-ALTAMIRANO, R. et al. In vitro antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. **Heliyon**, v. 3, n. 9, p. e00394, 2017/09/01/ 2017. ISSN 2405-8440. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844017314457> >.

DESSEILLES, M. et al. Neuroimaging insights into the pathophysiology of sleep disorders. **Sleep**, v. 31, n. 6, p. 777-794, 2008. ISSN 1550-9109.

DIAZ, C. et al. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. **Nat Prod Res**, v. 22, n. 17, p. 1521-34, 2008. ISSN 1478-6419.

DIAZGRANADOS, N. et al. Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an NMDA antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1605, 2010.

DIKSHIT, A.; NAQVI, A. A.; HUSAIN, A. *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. **Appl Environ Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 1085-8, May 1986. ISSN 0099-2240 (Print)

0099-2240.

DO PRADO, A. C. et al. *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. **J Appl Microbiol**, Nov 15 2018. ISSN 1364-5072.

DOBETSBERGER, C.; BUCHBAUER, G. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, n. 5, p. 300-316, 2011. ISSN 0882-5734. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.2045> >.

DUARTE, J. A. et al. Immunotoxicological Evaluation of Schinus molle L. (Anacardiaceae) Essential Oil in Lymphocytes and Macrophages. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2018, p. 6541583, 2018. ISSN 1741-427X (Print)

1741-427x.

DUKE, A. N. et al. Evidence That Sedative Effects of Benzodiazepines Involve Unexpected GABAA Receptor Subtypes: Quantitative Observation Studies in Rhesus Monkeys. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 366, n. 1, p. 145-157, Jul 2018. ISSN 0022-3565.

DUKE, J. A. **Duke's handbook of medicinal plants of Latin America**. crc press, 2008. ISBN 142004317X.

DUNHAM, N.; MIYA, T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957. ISSN 1930-2304.

EHRENBERG, A. J. et al. Neuropathologic Correlates of Psychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 66, n. 1, p. 115-126, 2018. ISSN 1387-2877.

ELSHAFIE, H. S. et al. An In Vitro Attempt for Controlling Severe Phytopathogens and Human Pathogens Using Essential Oils from Mediterranean Plants of Genus Schinus. **J Med Food**, v. 19, n. 3, p. 266-73, Mar 2016. ISSN 1096-620x.

FERRAGUTI, F. Metabotropic glutamate receptors as targets for novel anxiolytics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 38, p. 37-42, 2018/02/01/ 2018. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489217300644> >.

FERRERO, A. et al. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of Schinus molle in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 113, n. 3, p. 441-7, Sep 25 2007. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741.

FILE, S. E. et al. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v. 111, n. 4, p. 491-494, 1993. ISSN 0033-3158.

FRITSCHY, J.-M.; PANZANELLI, P. GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 11, p. 1845-1865, 2014. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejn.12534> >.

GALDINO, P. M. et al. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 2, p. 276-284, 2012/08/07/ 2012. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027858461200084X> >.

GUNDIDZA, M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. **Central African Journal of Medicine**, v. 39, n. 11, p. 231-234, 1993. ISSN 0008-9176. Disponível em: < https://journals.co.za/content/CAJM/39/11/AJA00089176_18 >.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006. ISSN 1471-003X.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. et al. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 673-679, 2012. ISSN 0378-8741.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. et al. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. **Life Sciences**, v. 128, p. 24-29, 2015/05/01/ 2015. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320515001381> >.

HALEEM, D. J.; INAM, Q.-U.-A.; HALEEM, M. A. Effects of clinically relevant doses of methyphenidate on spatial memory, behavioral sensitization and open field habituation: A time related study. **Behavioural Brain Research**, v. 281, p. 208-214, 2015/03/15/ 2015. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814008274> >.

HALLIT, S. et al. Impact of Sleep Disorders and Other Factors on the Quality of Life in General Population: A Cross-Sectional Study. **J Nerv Ment Dis**, Mar 21 2019. ISSN 0022-3018.

HAYOUNI EL, A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **Int J Food Microbiol**, v. 125, n. 3, p. 242-51, Jul 31 2008. ISSN 0168-1605 (Print)

0168-1605.

HERRERA-RUIZ, M. et al. Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from *Ipomoea stans* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 243-247, 2007/06/13/ 2007. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107001274> >.

HILL-VENNING, C. et al. Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the γ -aminobutyric acid type A receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 5, p. 749-756, 1997. Disponível em: < <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.bjp.0700927> >.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996. ISSN 0091-3057.

HORENSTEIN, J. et al. Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABAA receptor pore-lining M2 segment. **Nature Neuroscience**, v. 4, p. 477, 05/01/online 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/87425> >.

JAKUBOVSKI, E. et al. Systematic review and meta-analysis: Dose–response curve of SSRIs and SNRIs in anxiety disorders. **Depression and anxiety**, 2018. ISSN 1091-4269.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-292, 2015. ISSN 1476-4687

0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592533>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4565157/> >.

JANSSEN, P. A.; NIEMEGEERS, C. J.; MARSBOOM, R. P. Etomidate, a potent non-barbiturate hypnotic. Intravenous etomidate in mice, rats, guinea-pigs, rabbits and dogs. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 214, n. 1, p. 92 -132, 1975/03// 1975. ISSN 0003-9780. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/1156027> >.

JIAO, J. et al. Antidepressant response to chronic citalopram treatment in eight inbred mouse strains. **Psychopharmacology**, v. 213, n. 2-3, p. 509-520, 2011. ISSN 0033-3158.

JOHNSTON, G. A. R. GABAA receptor pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 173-198, 1996/01/01/ 1996. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725895020438> >.

JURD, R. et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABAA receptor β 3 subunit. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 2, p. 250-252, 2003. Disponível em: < <https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fj.02-0611fje> >.

KAFKAFI, N.; ELMER, G. I. Activity density in the open field: a measure for differentiating the effect of psychostimulants. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 80, n. 2, p. 239-249, 2005/02/01/ 2005. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009130570400365X> >.

KAMEL, N. S.; GAMMACK, J. K. Insomnia in the Elderly: Cause, Approach, and Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 463-469, 2006/06/01/ 2006. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934305010569> >.

KESSLER, A. et al. GABAA receptor modulation by terpenoids from *Sideritis* extracts. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 4, p. 851-862, 2014. ISSN 1613-4125.

LAI, H. M. X. et al. Prevalence of comorbid substance use, anxiety and mood disorders in epidemiological surveys, 1990–2014: A systematic review and meta-analysis. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 154, p. 1-13, 2015/09/01/ 2015. ISSN 0376-8716. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376871615002811> >.

LANE, J. M. et al. Biological and clinical insights from genetics of insomnia symptoms. **Nature Genetics**, v. 51, n. 3, p. 387-393, 2019/03/01 2019. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0361-7> >.

LECAVALIER, L. et al. An exploration of concomitant psychiatric disorders in children with autism spectrum disorder. **Compr Psychiatry**, v. 88, p. 57-64, Nov 6 2018. ISSN 0010-440x.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. São Paulo: EDITORA PLANTARUM LTDA, 1992. 352.

LOWERY-GIONTA, E. G. et al. GABA neurons of the ventral periaqueductal gray area modulate behaviors associated with anxiety and conditioned fear. **Brain Struct Funct**, v. 223, n. 8, p. 3787-3799, Nov 2018. ISSN 1863-2653.

LUSCHER, B.; SHEN, Q.; SAHIR, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 16, p. 383, 11/16/online 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/mp.2010.120> >.

LUZ, C. L. D. S.; PIRANI, J. R. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. JANEIRO, J. B. D. R. D. Rio de Janeiro. 1 2010.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 678-87, Feb 2012. ISSN 0091-3057.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1, p. 163-168, 2008/06/10/ 2008. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299908003580> >.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 421-428, 2007/03/30/ 2007. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027858460600399X> >.

MADHUKAR H. TRIVEDI et al. Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR*D: Implications for Clinical Practice. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 28-40, 2006. Disponível em: < <https://ajp.psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/appi.ajp.163.1.28> >.

MADSEN, K. K.; LARSSON, O. M.; SCHOUSBOE, A. Regulation of excitation by GABA neurotransmission: focus on metabolism and transport. In: (Ed.). **Inhibitory Regulation of Excitatory Neurotransmission**: Springer, 2007. p.201-221.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-692, 2011/04/29/ 2011. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584610001776> >.

MARTIN, E. I. et al. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clinics**, v. 32, n. 3, p. 549-575, 2009. ISSN 0193-953X.

MARTINS MDO, R. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **J Ethnopharmacol**, v. 151, n. 1, p. 485-92, 2014. ISSN 0378-8741.

MATROV, D. et al. Cerebral oxidative metabolism mapping in four genetic mouse models of anxiety and mood disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 356, p. 435-443, 2019/01/01/ 2019. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432818305837> >.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 20, n. 7, p. 519-530, 2006. ISSN 0951-418X.

MCKERNAN, R. et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA A receptor α 1 subtype. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 587, 2000. ISSN 1546-1726.

MIRODDI, M. et al. Passiflora incarnata L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791-804, 2013/12/12/ 2013. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113006983> >.

MISCHOULON, D. Update and critique of natural remedies as antidepressant treatments. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 36, n. 4, p. 789-x, 2009. ISSN 1558-0474

0889-8545. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944301> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2786903/> >.

MOLINA-GARZA, Z. J. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Trop**, v. 136, p. 14-8, Aug 2014. ISSN 0001-706x.

MONTGOMERY, S. A. Depression with high levels of anxiety. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 34, n. 3, p. 109, May 2019. ISSN 0268-1315.

MOREIRA, M. R. C. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: A monoterpene alcohol. **Neuroscience letters**, v. 579, p. 119-124, 2014. ISSN 0304-3940.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. D. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999. ISSN 1516-4446.

NGOUPAYE, G. T. et al. The anticonvulsant and sedative effects of Gladiolus dalenii extracts in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 28, n. 3, p. 450-456, 2013/09/01/ 2013. ISSN 1525-5050. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525505013002928> >.

NJUNG'E, K. U.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63-67, 1991/01/01/ 1991. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009130579190590X> >.

OH, W. C.; SMITH, K. R. Activity-dependent development of GABAergic synapses. **Brain Research**, v. 1707, p. 18-26, 2019/03/15/ 2019. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899318305663> >.

ONO, D. et al. Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. **J Physiol Sci**, v. 68, n. 4, p. 333-343, Jul 2018. ISSN 1880-6546.

OPAS. **Folha informativa - Transtornos mentais**. Organização Pan-Americana da Saude 2018 2018.

PÁLVÖLGYI, A. et al. Loop F of the GABAA receptor alpha subunit governs GABA potency. **Neuropharmacology**, v. 128, p. 408-415, 2018/01/01/ 2018. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390817305099> >.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, Jan-Jun 2012. ISSN 0976-2787

0973-7847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22654398>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3358962/> >.

PORSOLT, R. D. et al. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European journal of pharmacology**, v. 57, n. 2-3, p. 201-210, 1979. ISSN 0014-2999.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, Oct 1977. ISSN 0003-9780 (Print)

0003-9780.

POYARES, D. et al. I consenso brasileiro de insônia. **CEP**, v. 4020, p. 060, 2003.

PRICE, M. et al. The symptoms at the center: Examining the comorbidity of posttraumatic stress disorder, generalized anxiety disorder, and depression with network analysis. **J Psychiatr Res**, v. 109, p. 52-58, Nov 21 2018. ISSN 0022-3956.

QIAN, H. GABA_A receptors in the vertebrate retina. 2007.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 2, p. 181-6, Jun 2008. ISSN 1741-427X (Print)

1741-427x.

REY-VALEIRON, C. et al. Acaricidal effect of *Schinus molle* (Anacardiaceae) essential oil on unengorged larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol**, v. 76, n. 3, p. 399-411, Nov 2018. ISSN 0168-8162.

REYNOLDS, D. S. et al. Sedation and Anesthesia Mediated by Distinct GABA_A Receptor Isoforms. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 24, p. 8608-8617, 2003. Disponível em: <
<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/23/24/8608.full.pdf>>.

ROCHA, F. F. et al. Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae, extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 115-120, 2011. ISSN 0102-695X.

RODGERS, R.; JOHNSON, N. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995. ISSN 0091-3057.

ROYCE, J. R. On the construct validity of open-field measures. **Psychological bulletin**, v. 84, n. 6, p. 1098, 1977. ISSN 1939-1455.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Belém - PA: Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento: 6 p. 2004.

SATOU, T. et al. Daily Inhalation of α -Pinene in Mice: Effects on Behavior and Organ Accumulation. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 9, p. 1284-1287, 2014. ISSN 0951-418X.

SENS, S. L. et al. Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella* AU - Ascari, J. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 1, p. 113-119, 2012/01/01 2012. ISSN 1388-0209. Disponível em: <
<https://doi.org/10.3109/13880209.2011.634423>>.

SHAKERI, A.; SAHEBKAR, A.; JAVADI, B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 188, p. 204-228, 2016/07/21/ 2016. ISSN 0378-8741. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874116302732>>.

SHIN, D. J. et al. Analysis of GABAA receptor activation by combinations of agonists acting at the same or distinct binding sites. **Mol Pharmacol**, Oct 18 2018. ISSN 0026-895x.

SRAMEK, J. J.; ZAROTSKY, V.; CUTLER, N. R. Generalised anxiety disorder. **Drugs**, v. 62, n. 11, p. 1635-1648, 2002. ISSN 0012-6667.

STEFANITS, H. et al. GABAA receptor subunits in the human amygdala and hippocampus: Immunohistochemical distribution of 7 subunits. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 2, p. 324-348, 2018. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.24337> >.

STOJANOVIC, T. et al. The $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, and $\gamma 2$ subunits of GABAA receptors show characteristic spatial and temporal expression patterns in rhombencephalic structures during normal human brain development. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 9, p. 1805-1824, 2016. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.23923> >.

STORK, O. et al. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. **Brain research**, v. 865, n. 1, p. 45-58, 2000. ISSN 0006-8993.

STRÖHLE, A.; GENSICHEN, J.; DOMSCHKE, K. The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 115, n. 37, p. 611, 2018.

TAIWO, A. E. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. **Indian journal of pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 189, 2012.

TAYLOR, A. et al. Assessment of the analgesic, anti-inflammatory and sedative effects of the dichloromethanol extract of *Schinus molle*. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 2, p. 372-80, 2016. ISSN 1128-3602.

TYRER, P.; BALDWIN, D. Generalised anxiety disorder. **The Lancet**, v. 368, n. 9553, p. 2156-2166, 2006/12/16/ 2006. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673606698656> >.

VAN BREDERODE, J. et al. The terpenoids Myrtenol and Verbenol act on delta subunit-containing GABAA receptors and enhance tonic inhibition in dentate gyrus granule cells. **Neurosci Lett**, v. 628, p. 91-7, Aug 15 2016. ISSN 0304-3940.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976. ISSN 1939-1455.

WHITE, E. K.; SULLIVAN, A. B.; DRERUP, M. Short Report: Impact of Sleep Disorders on Depression and Patient-Perceived Health-Related Quality of Life in Multiple Sclerosis. **Int J MS Care**, v. 21, n. 1, p. 10-14, Jan-Feb 2019. ISSN 1537-2073 (Print)

1537-2073.

WHO. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, 2017.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, Part 1, p. 2331-2371, 2013/12/01/ 2013. ISSN 0149-7634. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763412002163> >.

WOO, J. et al. Control of motor coordination by astrocytic tonic GABA release through modulation of excitation/inhibition balance in cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201721187, 2018. ISSN 0027-8424.

YANG, H. et al. α -Pinene, a Major Constituent of Pine Tree Oils, Enhances Non-Rapid Eye Movement Sleep in Mice through GABA_A-benzodiazepine Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 530-539, 2016. Disponível em: <
<http://molpharm.aspetjournals.org/content/molpharm/90/5/530.full.pdf> >.

YILDIRIM, E.; EROL, K.; ULUPINAR, E. Effects of sertraline on behavioral alterations caused by environmental enrichment and social isolation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 2, p. 278-287, 2012/04/01/ 2012. ISSN 0091-3057. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305711004382> >.

YUEQIN, Z. et al. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-Inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Med**, v. 69, n. 10, p. 893-8, Oct 2003. ISSN 0032-0943 (Print)

0032-0943.

ZANOS, P.; GOULD, T. D. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. **Molecular Psychiatry**, v. 23, p. 801, 03/13/online 2018. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.255> >.

ZAPATA-SUDO, G. et al. Sedative and anticonvulsant activities of methanol extract of *Dorstenia arifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 9-12, 2010/07/06/ 2010. ISSN 0378-8741. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110001753> >.

ZHU, S. et al. Structure of a human synaptic GABAA receptor. **Nature**, v. 559, n. 7712, p. 67-72, 2018/07/01 2018. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3> >.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação das ações ansiolíticas e antidepressivas de extratos de óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *Schinus molle* L. (*Aroeira safra*", protocolo CEUA nº 8847/2016-31 sob responsabilidade do Professor Fabio Fagundes da Rocha que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.089, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, em reunião de 08 de junho de 2017.

Vigência do Projeto	Junho de 2017 a junho de 2018
Especie/habitagem	Macaco, Social
Nº de animais	568 (quinhentos e sessenta e oito)
Procedência	35-40g, 60 a 70 dias
Sexo	Macho
Origem	História de Criação de Rodeiros do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

We certify that the protocol CEUA nº 8847/2016-31, entitled "Avaliação das ações ansiolíticas e antidepressivas de extratos de óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *Schinus molle* L. (*Aroeira safra*)" is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Federal Rural University of Rio de Janeiro in 88/96/2017.

Coordenador CEUA/ICBS/UFRRJ

Denise Monizal Neves
Dep. Genética/ICBS/UFRRJ
BAPN: 133011

ANEXO 2

Tabela 4. Efeito do OEFS sobre atividade locomotora no teste do campo aberto

Tratamento	Número de cruzamentos / tempo (minutos)			
	30 min	60	100	130
CT	129,8 ± 17,1	57,0 ± 9,1	63,8 ± 19,4	29,0 ± 20,8
OEFS100	66,0 ± 20,64	58,6 ± 20,52	75,8 ± 23,4	51,5 ± 15,6
OEFS200	32,3 ± 17,6*	35,6 ± 13,4	28,1 ± 19,9	40,3 ± 19,9
n	6	6	6	6

Os valores estão representados como média ± EPM, sendo * p<0,05 significativo comparado ao grupo controle.

Tabela 5: Efeitos do OEFS em parâmetros do teste do campo aberto

Parâmetros avaliados	Tratamento				
	CT	OEFS25	OEFS50	OEFS100	DZP
Nº de cruzamentos	73,2 ± 3,1	67,1 ± 7,2	65,3 ± 7,4	19,1 ± 6,2*****	22,5 ± 10,8***
Tempo de imobilidade (s)	7,6 ± 2,6	32,0 ± 10,5	36,1 ± 10,4	165,8 ± 21,8*****	240,5 ± 19,2*****
Nº de “rearing”	22,3 ± 3,6	17,1 ± 3,5	13,3 ± 2,9	1,1 ± 0,6*****	1,0 ± 1,0*****
n	9	8	8	10	6

Os valores estão representados como média ± EPM, sendo *** p<0,001 e ***** p<0,0001 significativo quando comparado ao grupo controle.

Tabela 6: Efeitos do OEFS em parâmetros do teste da barra giratória

Parâmetros avaliados	Tratamento				
	CT	OEFS25	OEFS50	OEFS100	DZP
Nº de quedas	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,1 ± 0,1	1,4 ± 0,4	3,0 ± 0,0*
Tempo de permanência na barra	60,0 ± 0,0	59,6 ± 0,0	60,0 ± 0,3	52,6 ± 3,0	36,6 ± 6,0*****
n	9	8	8	10	6

Os valores estão representados como média ± EPM, sendo *p<0,05 e *** p<0,001 significativo quando comparado ao grupo controle.

Tabela 7. Efeito do OEFS em parâmetros do teste de sono induzido por etomidato

Parâmetros Avaliados	Tratamento				
	CT	OEFS25	OEFS50	OEFS100	DZP
Tempo total sono	86,1 ± 9,0	117,3 ± 21,2	120,4 ± 26,6	168,4 ± 15,0*	256,2 ± 22,3****
Tempo indução do sono	13,7 ± 3,3	9,8 ± 2,6	8,5 ± 1,2	6,7 ± 0,7	4,5 ± 0,9*
n	9	8	8	10	6

Os valores estão representados como média ± EPM, sendo * p<0,05 e **** p<0,0001 significativo comparado ao controle

Tabela 8. Efeito do OEFS em parâmetros do labirinto em cruz elevado

Parâmetros avaliados	Tratamentos			
	CT	OEFS25	OEFS50	DZP
% tempo nos braços abertos	12,6 ± 3,6	13,7 ± 3,6	12,8 ± 2,2	28,35 ± 5,6*
% entradas nos braços abertos	15,8 ± 2,9	15,0 ± 4,0	20,7 ± 3,1	26,3 ± 4,2
Nº avaliação de risco	20,4 ± 2,0	22,0 ± 2,9	16,4 ± 2,3	15,5 ± 1,5
Nº de entradas nos braços fechados	13,0 ± 1,8	13,9 ± 1,4	11,5 ± 1,1	14,5 ± 1,6
n	10	11	11	12

Os valores estão representados como média ± EPM, sendo * p<0,05, significativo comparado ao controle.

Tabela 9. Avaliação do efeito do flumazenil sobre atividade sedativa do OEFS no teste do campo aberto

Parâmetros avaliados	Tratamento			
	Veículo	FMZ+Veículo	Veículo+OEFS100	FMZ+OEFS100
Nº cruzamentos	100,0 ± 6,7	87,8 ± 11,1	45,4 ± 8,1***	40,2 ± 7,3****
Nº de "rearing"	100,0 ± 6,9	111,7 ± 8,3	21,8 ± 6,5****	21,8 ± 6,4****
Tempo de imobilidade (s)	100,00 ± 0,0	1392,0 ± 683,3	7200 ± 1565**	7673,0 ± 1582***
n	10	11	9	11

Os valores estão representados como média ± EPM, como porcentagem relativa à média do grupo controle, sendo ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001, significativo comparado ao controle.