

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

Quelen Iane Garlet

ATIVIDADE DE SESQUITERPENÓIDES ISOLADOS DE *Nectandra grandiflora* Nees SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Santa Maria, RS
2018

Quelen Iane Garlet

**ATIVIDADE DE SESQUITERPENÓIDES ISOLADOS DE *Nectandra grandiflora* Nees
SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia**.

Orientador: Prof^a Dr^a Berta Maria Heinzmann
Co-Orientador: Prof^o Dr. Carlos Fernando Mello

Santa Maria, RS
2018

Garlet, Quelen Iane

Atividade de sesquiterpenoides isolados de *Nectandra grandiflora* Nees sobre o Sistema Nervoso Central / Quelen Iane Garlet.- 2018.

220 p.; 30 cm

Orientadora: Berta M. Heinzmann

Coorientador: Carlos F. Mello

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Ansiolítico 2. Anticonvulsivante 3. Sedação 4. Jundiá 5. Camundongos I. Heinzmann, Berta M. II. Mello, Carlos F. III. Título.

Quelen Iane Garlet

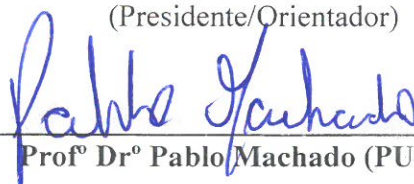
ATIVIDADE DE SESQUITERPENOIDES ISOLADOS DE *Nectandra grandiflora* Nees
SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

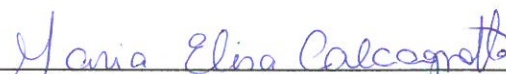
Aprovado em 17 de dezembro de 2018:



Profª Drª Berta Maria Heinzmann. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Profº Drº Pablo Machado (PUCRS)



Profª Drª Maria Elisa Calcagnotto (UFRGS)



Profº Drº Mauro Schneider Oliveira (UFSM)



Profª Drª Vania Lucia Loro (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a ela, que sempre colocou minha educação em primeiro lugar, minha mãe, Dona Maria Cenira de Souza Garlet.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar o meu caminho na busca dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Santa Maria por todas as oportunidades oferecidas a mim desde a graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro via bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e aos seus mestres que tive a oportunidade de conhecer e com eles adquirir o conhecimento necessário para completar meus estudos.

Ao Laboratório de Extrativos Vegetais e à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Berta Maria Heinzmann, pela oportunidade de estudo e trabalho.

Ao Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos F. de Mello, pela recepção, amizade, conselhos e ensinamentos recebidos.

Ao Laboratório de Fisiologia de Peixes e ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, pelo espaço cedido para a realização dos testes e parceria de trabalho.

À minha família que sempre me incentivou a perseguir meus sonhos e sempre esteve presente nos momentos bons e ruins me dando apoio. Ao meu irmão Marcio Garlet por ter me ajudado a escolher a profissão de farmacêutica. Ao meu irmão Sgto Moacir Garlet que nunca duvidou um segundo de mim e sempre teve a palavra certa pra me motivar. À minha cunhada Janaína Scheffler pelo apoio e amizade e por ter me dado minha sobrinha linda, Giovana Scheffler Garlet. À minha irmã Camila Garlet pela amizade, cumplicidade, apoio, amor e carinho. Agradeço especialmente à minha mãe, pois sem ela nada disso teria acontecido, por acreditar em mim e pelo incentivo à minha educação desde criança, agradeço pelo exemplo de mulher, batalhadora, inteligente, generosa, e que sempre me inspirou a ser uma pessoa melhor.

Ao meu namorado, André Luís Londero pela ajuda e participação nos experimentos desta tese, pelo amor, paciência, companheirismo, conselhos, por sempre me fazer rir, por nunca duvidar da minha capacidade e sempre me incentivar a perseguir meus objetivos.

Aos colegas de pós-graduação e aos parceiros em experimentos, em especial à farmacêutica Patrícia Rodrigues pela ajuda em meus experimentos sempre com boa vontade e pela amizade construída ao longo desses anos de convivência; à Msc. Adriane E. Bianchini, pela parceria de trabalho e pela amizade e alegria.

Às amigas e ex-colegas de laboratório, Dr^a Daniela Thomas da Silva, Msc. Luana da Costa Pires, Dr^a Lenise de Lima Silva e Dr^a Fernanda Rossatto Temp Fava pelos momentos bons e difíceis compartilhados nesta caminhada e pelo apoio recebido.

Aos meus queridos amigos Dr^a Cláudia Sirlene de Oliveira, Dr^a Luciana Assis Gobo, Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari e Matheus Viegas pelo apoio, risadas e amizade.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e não estão nominalmente citados.

EPÍGRAFE

“An experiment is a question which Science poses to Nature, and a measurement is the recording of Nature’s answer.”

— *Max Planck*

RESUMO

ATIVIDADE DE SESQUITERPENOIDES ISOLADOS DE *Nectandra grandiflora* Nees SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

AUTORA: Quelen Iane Garlet
ORIENTADOR: Berta Maria Heinzmann
CO-ORIENTADOR: Carlos Fernando Mello

A espécie *Nectandra grandiflora* (Lauraceae), nativa do Rio Grande do Sul, Brasil, é produtora de óleo essencial (OE) rico em sesquiterpenoides, entre eles (+)-deidrofuquinona (DHF), (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) e os compostos de estrutura química inédita (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-epóxido de deidrofuquinona (DFX). Um dos principais mecanismos farmacológicos pelo qual compostos terpenoides exercem seus efeitos depressores do Sistema Nervoso Central (SNC) é a modulação do sistema GABAérgico. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a interação de DHF, SEL, ERM e DFX com o SNC e com os receptores GABA α usando diferentes modelos experimentais. Desta forma, foi proposta a investigação: (1) do efeito de DHF (10^{-3} - 10^2 μ M), DFX, ERM e SEL (0,1-100 μ M) sobre o potencial de membrana e mobilização do cálcio em sinaptossomas de camundongos; (2) do efeito de DHF (3; 10; 30 ou 100 mg/kg, i.p.) frente a crises epilépticas induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ; 50 mg/Kg, i.p.) em camundongos; (3) do efeito da longa exposição a SEL, ERM e DFX (12,5-25 mg/L) e a modulação de genes codificadores de subunidades do receptor GABA α por estes compostos e pelo OE em peixes da espécie *Rhamdia quelen* (jundiás); (4) do potencial ansiolítico (testes: campo aberto e labirinto em cruz elevado) do OE e dos compostos DHF, SEL, ERM e DFX (10, 30 e 100 mg/ kg, v.o.) em camundongos; (5) da participação dos receptores GABA α nos efeitos do OE e constituintes isolados sobre o SNC; (6) da presença dos compostos isolados no córtex total de cérebro de camundongos por cromatografia gasosa. As metodologias empregadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria. Os resultados desta tese indicam que: DHF, SEL, ERM e DFX facilitam a hiperpolarização da membrana e inibem o influxo de cálcio em sinaptossomas; DHF atenua crises epilépticas induzidas pelo PTZ; o OE de *N. grandiflora* e os compostos DHF, SEL, ERM e DFX induzem efeito tipo-ansiolítico em camundongos; o OE e os compostos SEL, ERM e DFX induzem sedação persistente em peixes; o OE induz o aumento da expressão da subunidade $\alpha 2$ /GABA α , o composto SEL aumenta a expressão da subunidade $\beta 1$, δ e $\gamma 2$ do receptor GABA α , enquanto o composto ERM diminui a expressão da subunidade $\alpha 1$ deste receptor em peixes; Os efeitos depressores do SNC relatados para o OE e os compostos DHF SEL, ERM e DFX são principalmente decorrentes da interação com os receptores GABA α . No entanto, não se descarta outros alvos moleculares. Os resultados desta tese contribuem para a caracterização farmacológica da espécie *N. grandiflora* e propõem: a aplicação de seu óleo essencial e compostos isolados como agentes sedativos para a prática de piscicultura; e, um potencial desta planta para o tratamento de patologias que envolvam o aumento da excitabilidade neuronal, como a epilepsia e os transtornos de ansiedade.

Palavras-chave: Ansiolítico. Anticonvulsivante. Sedação. Jundiá. Sinaptossoma. Deidrofuquinona. Selin-11-en-4- α -ol. Eremofil-11-en-10-ol. Epóxido de deidrofuquinona.

ABSTRACT

CENTRAL NERVOUS SYSTEM ACTIVITY OF SESQUITERPENOIDS ISOLATED FROM *Nectandra grandiflora* Nees

AUTHOR: Quelen Iane Garlet
ADVISOR: Berta Maria Heinzmann
CO-ADVISOR: Carlos Fernando Mello

Nectandra grandiflora (Lauraceae) is a native species from Rio Grande do Sul, Brazil, whose essential oil (EO) is rich in sesquiterpenoids, such as, (+)-dehydrofukinone (DHF), (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL), and the compounds of unprecedented chemical structures, (+)-eremophil-11-en-10-ol (ERM) and (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX). The GABAergic system is the major target for the terpenoids that diminish the Central Nervous System (CNS) excitability. Therefore, this work aims to evaluate the interaction of DHF, SEL, ERM and DFX with the GABA_A receptors. For this purpose, it was conducted an investigation of: (1) (10^{-3} - 10^2 μ M) DHF and (0,1-100 μ M) DFX, ERM and SEL effect on membrane potential and calcium mobilization in synaptosomes from mice cortex; (2) DHF (3; 10; 30 or 100 mg/kg) effect against pentylenetetrazole (PTZ; 50 mg/Kg, i.p.)-induced seizures in mice; (3) the long-term exposure to (12,5-25 mg/L) SEL-, ERM- and DFX-induced sedation on silver catfish (*Rhamdia quelen*); (4) the anxiolytic potential (open field and elevated plus maze tests) of the EO and isolated compounds DHF SEL, ERM e DFX (10, 30 e 100 mg/ kg, v.o.) in mice; (5) the involvement of the GABA_A receptors in the actions of the EO and compounds on the CNS; (6) the compounds presence in the mice cerebral cortex by gas chromatography. Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Santa Maria. Results showed that: DHF, DFX, ERM and SEL facilitate the membrane hyperpolarization and inhibit the downstream calcium influx in synaptosomes; DHF blunted PTZ-induced seizures in mice. EO and compounds induce anxiolytic effects in mice; SEL, ERM e DFX induce persistent sedation in fish; EO induced an increase in the GABA_A/ α 2 subunit expression, SEL increase the GABA_A/ β 1, δ and γ 2 subunits expression, while the compound ERM decrease the GABA_A/ α 1 subunit expression in silver catfish; The CNS effects displayed by the *N. grandiflora* EO and compounds are mostly due to their interaction with GABA_A receptors. However, we did not rule out the possibility of other molecular targets. These thesis results improved the pharmacological characterization of *N. grandiflora*, whose EO and isolated compounds may be useful as sedatives on fish farming procedures and indicating a therapeutic potential of this species for the treatment of CNS pathologies, such as epilepsy and anxiety disorders.

Key-words: Anxiolytic. Anticonvulsant. Sedation. Silver catfish. Synaptosome. Dehydrofukinon. Selin-11-en-4- α -ol. Eremophil-11-en-10-ol. Dehydrofukinone epoxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Nectandra grandiflora</i> (A). Detalhe: inflorescências (B) e frutos (C)	25
Figura 2- Estrutura química do composto (+)-deidrofuquinona.....	28
Figura 3- Estrutura química do composto (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL).....	30
Figura 4. Estrutura química do composto (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM)	31
Figura 5. Estrutura química do composto (+)-epóxido de deidrofuquinona (DFX).....	32
Figura 6. Modelo do receptor GABA _A na membrana plasmática	40
Figura 7- Diferentes arranjos das subunidades do receptor GABA _A e suas funções.	41
Figura 8- Esquematização estrutural da sinapse e de um sinaptossoma.....	54
Figura 9. Protocolos de ensaios com sinaptossomas.....	62
Figura 10- Protocolo de avaliação de atividade anticonvulsivante	66
Figura 11- Protocolo do ensaio de mecanismo de ação da atividade anticonvulsivante de DHF em camundongos.....	67
Figura 12. Protocolo de avaliação de atividade tipo-ansiolítica.....	68
Figura 13. Protocolo de administração subcrônica na avaliação de atividade tipo-ansiolítica	68
Figura 14. Protocolo de avaliação do mecanismo de ação da atividade tipo-ansiolítica	69
Figura 15- Protocolo de avaliação da recuperação da sedação induzida por SEL, ERM e DFX em peixes.....	72
Figura 16. Protocolo comportamental para a avaliação da expressão de genes codificadores de subunidades do receptor GABA _A	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Categorias terapêuticas de fármacos derivados de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento.....	13
Tabela 2- Potencial farmacológico de óleos essenciais de algumas espécies vegetais	17
Tabela 3- Fármacos sedativos utilizados na clínica.....	19
Tabela 4. Atividade ansiolítica de OEs em modelos animais de avaliação de ansiedade	23
Tabela 5- Perfil farmacológicos de <i>Nectandra grandiflora</i>	27
Tabela 6-Principais fármacos anticonvulsivantes.....	34
Tabela 7. Fármacos atualmente prescritos para o tratamento de transtornos de ansiedade.....	38
Tabela 8. Fármacos em estudo clínico para o tratamento de transtornos de ansiedade.	39
Tabela 9. Subunidades do receptor GABA _A associadas a doenças neurológicas.....	42
Tabela 10- Efetividade anticonvulsivante de fármacos antiepiléticos no modelo do PTZ.	49
Tabela 11- Escores de intensidade de crises epiléticas segundo a escala de Racine modificada.....	50
Tabela 12- Concentração sinaptossomal de diferentes íons.	54
Tabela 13- Escores de recuperação de sedação ou anestesia.....	73
Tabela 14. Sequências oligonucleotídeas dos primers utilizados para q-PCR.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α 1R	Receptor α 1-adrenérgico
aCSF	Líquido cérebro-espinhal artificial
ADT	Antidepressivo tricíclico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DHF	(+)-Deidrofuquinona
DSM	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DZP	Diazepam
DFX	(+)-Epóxido de deidrofuquinona
ERM	(+)-Eremofil-11-en-10-ol
FMZ	Flumazenil
GABA	Ácido gama-amino butírico
H1R	Receptor de histamina 1
IMAO	Inibidor da monoamina oxidase
ISRS	Inibidor da recaptção da serotonina
ISRN	Inibidor da recaptção da serotonina/norepinefrina
LDH	Lactato desidrogenase
LogP	Coefficiente de partição octanol/ água
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO	Monoamina oxidase
NET	Transportador de norepinefrina
OE	Óleo essencial
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTZ	Pentilenotetrazol
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SEL	(-)-Selin-11-en-4- α -ol
SERT	Transportador de serotonina
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TAS	Transtorno de ansiedade social
TEPT	Transtorno do estresse pós-traumático
TOC	Transtorno obsessivo-compulsivo
TP	Transtorno do pânico

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs)	16
2.1.1 Propriedades sedativas de constituintes de OEs	19
2.1.2 Propriedades anticonvulsivantes de constituintes de OEs	21
2.1.3 Propriedades ansiolíticas dos OEs	22
2.2 GÊNERO <i>NECTANDRA</i>	24
2.3 <i>NECTANDRA GRANDIFLORA</i>	25
2.3.1 (+)-Deidrofuquinona (DHF)	28
2.3.2 (-)-Selin-11-en-4-α-ol (SEL)	29
2.3.3 (+)-Eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-Epóxido de deidrofuquinona (DFX)	31
2.4 EPILEPSIA	32
2.6 RECEPTORES GABA _A	40
2.6.1 Receptores GABA_A: modulação farmacológica	43
2.6.2 Receptores GABA_A e epilepsia	44
2.6.3 Receptores GABA_A e ansiedade	46
2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS	48
2.7.1 Modelo de crises epilépticas induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)	48
2.7.2 Modelos de avaliação de comportamento tipo-ansioso	50
2.7.2.1 Teste do Campo Aberto	50
2.7.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	52
2.7.3 Sinaptossomas	53
2.7.4 <i>Rhandia quelen</i> como modelo experimental em farmacologia	55
3 PROPOSIÇÃO	57
3.1 HIPÓTESES	57
3.2 OBJETIVO GERAL	57
3.2.1 Objetivos específicos	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO OE	58
4.2 ANÁLISE QUÍMICA	58
4.3 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DHF, SEL, ERM E DFX	59
4.4 FÁRMACOS E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	60
4.5 ANIMAIS	61
4.6 PREPARAÇÃO DOS SINAPTOSSOMAS	61
4.7 POTENCIAL DE MEMBRANA	63
4.8 MOBILIZAÇÃO DE [Ca ⁺²] _i EM SINAPTOSSOMAS	65
4.9 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE DHF	65
4.10 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABA _A NO EFEITO ANTICONVULSIVANTE DE DHF	66
4.11 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	67
4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TIPO-ANSIOLÍTICA	67
4.12.1 Teste do campo aberto	69
4.12.2 Teste do labirinto em cruz elevado	70
4.13 QUANTIFICAÇÃO DO OE E COMPOSTOS NO CÓRTEX	70

4.14 MECANISMO DE AÇÃO DE SEDAÇÃO INDUZIDA POR SEL, ERM E DFX EM PEIXES	71
4.15 ENSAIO DE LONGA EXPOSIÇÃO AOS COMPOSTOS SEL, ERM E DFX.....	73
4.16 MODULAÇÃO DE GENES DO RECEPTOR GABAA.....	74
4.16.1 PCR EM TEMPO REAL.....	75
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
4.17 COMITÊ DE ÉTICA.....	78
5 ARTIGO 1	79
6 MANUSCRITO 1.....	97
7 MANUSCRITO 2.....	123
8 DISCUSSÃO.....	177
9 CONCLUSÃO	185
ANEXO A- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>NECTANDRA GRANDIFLORA</i>	187
ANEXO B- COMITÊ ÉTICA: TESTES EM CAMUNDONGOS	188
ANEXO C- COMITÊ ÉTICA: TESTES EM PEIXES	190
ANEXO D – RESUMO GRÁFICO DA TESE.....	191
10 REFERÊNCIAS.....	192

1 APRESENTAÇÃO

Produtos naturais constituíram ao longo da história a principal fonte de moléculas bioativas utilizadas na medicina. As ciências da saúde há muito fazem uso de plantas, animais e micro-organismos como fontes de agentes terapêuticos para tratar doenças humanas e veterinárias. Antes do advento das técnicas de “*screening*” de alta eficiência, mais de 80% dos fármacos eram originários de produtos naturais ou inspirados quimicamente nos mesmos (LEAL et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). Apesar do desenvolvimento e uso corriqueiro destas técnicas modernas, dados da literatura revelam que cerca de 50% dos novos fármacos que entraram no mercado entre 1994-2007 eram estruturas químicas naturalmente produzidas por plantas ou animais ou então modificadas a partir desses compostos naturais (Tabela 1), a exemplo dos fármacos exenatida (usado no tratamento do diabetes mellitus), ziconotida (analgésico), ixabepilona (antitumoral), retapamulina (antibiótico) e trabectedina (antitumoral), galantamina e huperzina (utilizadas no tratamento do Alzheimer) (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008). Adicionalmente, na última década, cerca de 100 compostos derivados de plantas ou micro-organismos entraram em fase de ensaios clínicos (HARVEY, 2008; LEAL et al., 2016).

Tabela 1- Categorias terapêuticas de fármacos derivados de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento.

Classe terapêutica	Estudos pré-clínicos	Fase I	Fase II	Fase III	Pré-registro	Total
Antineoplásicos	34	15	26	9	2	86
Anti-infecciosos	25	4	7	2	2	40
Neurofármacos	6	3	9	4	0	22
Fármacos para o tratamento de doenças dos sistemas cardiovascular/gaстрintestinal	9	0	5	6	0	20
Anti-inflamatórios	6	2	9	1	0	18
Metabólicos	7	3	6	1	0	17
Fármacos para o tratamento de doenças dermatológicas	7	1	2	0	0	10
Hormônios	3	0	2	1	0	6
Imunossupressores	2	2	0	2	0	6
Total	99	30	66	26	4	225

Fonte: Adaptado de Harvey, 2008 e Leal et al., 2016

Substâncias derivadas de produtos naturais são interessantes farmacologicamente por apresentarem, na grande maioria dos casos, um melhor perfil de biodegradabilidade e absorção (principalmente aquelas com alto Log P, ou seja, mais lipofílicas) no organismo quando comparadas com substâncias sintéticas. Apesar dessas vantagens, a indústria farmacêutica demonstrou, nas últimas décadas, menor interesse pelos produtos naturais com a finalidade de descoberta de novos fármacos. Essa diminuição do interesse por parte da indústria se deve à dificuldade de acesso, cultivo, extração e padronização de compostos e fitocomplexos originários do metabolismo vegetal e animal (LAM, 2007; RISHTON, 2008; RODRIGUES et al., 2016).

Mesmo com todas essas limitações, as estruturas químicas sofisticadas e de arranjos complexos resultantes do metabolismo de organismos vivos, despertam interesse farmacológico por facilmente interagirem com sistemas biológicos. Essa interação facilitada pode ser explicada pela co-evolução dos seres vivos no decorrer de milhões de anos, onde a probabilidade de se encontrar ligantes para proteínas humanas e animais (por exemplo, receptores) em metabólitos de plantas é muito maior em comparação com substâncias de origem sintética (GONZALEZ-SABIN, 2012). Aliado a isso, há um forte interesse em se buscar novas estratégias terapêuticas para o tratamento e prevenção de doenças. Neste contexto, moléculas de origem natural contemplam uma diversidade química que facilita promover inovação na área da saúde. Por essa razão, ainda se advoga fortemente pela expansão da exploração da natureza como fonte de novos agentes terapêuticos ou que sirvam como base para a semissíntese de moléculas farmacologicamente ativas. Para contornar as dificuldades de se estudar em grande escala compostos de origem natural, algumas estratégias são seguidas, como por exemplo ensaios bioguiados de fitocomplexos até se obter a uma molécula ou grupo de moléculas responsáveis pela ação farmacológica em estudo, além dos processos de semi-síntese anteriormente citados (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2012; GRABLEY; THIERICKE, 1999). Como exemplo, o fracionamento bioguiado de extratos vegetais e óleos essenciais permite investigar, através do isolamento das substâncias contidas nesses fitocomplexos, qual (ais) composto (s) retém a ação farmacológica (BENOVIT et al., 2015).

Apesar do imenso arsenal de moléculas já conhecidas e caracterizadas quantos aos seus efeitos biológicos, estima-se que cerca de 80% da biodiversidade mundial ainda é inexplorada para finalidades terapêuticas (GELFUSO et al., 2014). A diversidade da flora brasileira é significativa neste cenário e desta forma fomenta a grande produção científica em torno de produtos naturais derivados do metabolismo vegetal. No Brasil, estima-se que existam cerca de 56.000 espécies vegetais, das quais 18.932 são endêmicas do país (FORZZA et al., 2010). A

Mata Atlântica, com uma extensão de cerca de 1.110.182 km², constitui um bioma que contém um grande portfólio de espécies vegetais (BRITO; BRITO, 1993). O estado do Rio Grande do Sul é permeado por esta floresta e demonstra ser um território rico em espécies nativas ainda inexploradas quanto ao seu potencial químico e farmacológico (LIMBERGER et al., 2004). Uma espécie que vem despertando o interesse de pesquisadores é *Nectandra grandiflora* Nees (Lauraceae), a qual possui em seu óleo essencial substâncias de estrutura química farmacologicamente ativas (GARLET et al., 2016; SILVA, D. T., 2013, 2016).

Neste trabalho, será apresentado um estudo farmacológico envolvendo quatro constituintes sesquiterpênicos isolados do óleo essencial de *N. grandiflora* e suas atividades biológicas sobre o Sistema Nervoso Central, tais como atividade tipo-ansiolítica, anticonvulsivante e sedativa. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostram que o constituinte majoritário do óleo essencial desta espécie, o composto (+)-deidrofuquinona (DHF), promove diminuição da atividade neuronal promovendo sedação profunda e anestesia em peixes (GARLET et al., 2016; HEINZMANN et al., 2016). Os sesquiterpenoides (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL), (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-epóxido de deidrofuquinona (DFX) também estão presentes no óleo essencial de *N. grandiflora* e possuem estrutura química relacionada à DHF. Os compostos SEL, ERM e DFX também induzem sedação em peixes (dados não publicados) mas seu mecanismo de ação até o momento é desconhecido e ainda não foram investigados seus efeitos em mamíferos. Os estudos prévios com a substância DHF, já publicados, e com os compostos SEL, ERM e DFX foram delineados de forma a utilizar um modelo experimental com animal não-mamífero, o qual mostrou um alto grau preditivo das propriedades biológicas desses compostos (GARLET et al., 2016). Assim, dando continuidade à investigação das propriedades neuroativas destas moléculas, esta tese contempla a avaliação do mecanismo de ação dos efeitos sedativos dos sesquiterpenoides em modelo utilizando peixes da espécie *Rhamdia quelen* antes de se prosseguir os estudos em modelos *in vitro* e em diferentes modelos de avaliação comportamental em roedores. Este trabalho está organizado de forma a apresentar: um artigo completo relativo aos resultados encontrados de atividade anticonvulsivante do composto DHF em modelo murino; um manuscrito com os resultados do mecanismo de ação da atividade sedativa dos compostos SEL, ERM e DFX e sua ação sobre a expressão de subunidades do receptor GABA_A em modelo utilizando o jundiá (*R. quelen*); e por fim, um manuscrito contendo resultados da atividade tipo-ansiolítica do OE de *N. grandiflora* e dos compostos isolados DHF, SEL, ERM e DFX em camundongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs)

Óleos essenciais são caracterizados como líquidos que variam do incolor até uma coloração amarela, solúveis em solventes orgânicos, instáveis na presença de luz, calor, umidade e metais (SIMÕES et al., 2017). Este tipo de extrativo vegetal é constituído de metabólitos secundários voláteis, principalmente de estrutura fenilpropanoide ou terpênica. Compostos terpênicos são resultado da condensação de unidades de isopreno (C_5H_8), podendo estar presentes grupos funcionais como aldeído, álcool ou cetona, entre outros (DEWICK, 2002). Essa classe de metabólitos secundários é classificada de acordo com o número de unidades isoprênicas como hemiterpenoides (C_5), monoterpenoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), sesterpenoides (C_{25}), triterpenoides (C_{30}), tetraterpenoides (C_{40}) e politerpenoides ($> C_{40}$) (LIMA et al., 2016). Uma peculiaridade marcante dos OEs é sua volatilidade e intenso odor e por essa razão são chamados de óleos voláteis ou óleos aromáticos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Nas plantas, os OEs apresentam-se em concentrações que variam em média de 1-3% do peso fresco do órgão vegetal de origem e geralmente são armazenados em vacúolos ou estruturas secretoras especiais como tricomas glandulares, ductos ou canais (SIMÕES et al., 2017). Os OEs são resultado do metabolismo secundário das plantas, o qual produz moléculas que tem a função de interagir com o ambiente visando aprimorar o desenvolvimento e manutenção da espécie em um determinado ecossistema (SHARIFI-RAD et al., 2017). Do ponto de vista evolucionário, as funções destes metabólitos, incluindo os OEs, permitiram que os organismos vegetais colonizassem eficientemente ambientes terrestres. Neste contexto, os componentes dos OEs agregam atividades responsáveis pela defesa contra predadores, atratividade de polinizadores e pelas demais interações da planta com o meio que a cerca (FIGUEIREDO et al., 2009). Os seres humanos há muito se beneficiam das propriedades dos OEs, visto que este extrativo é amplamente utilizado para produção de perfumes, cosméticos, produtos alimentícios, farmacêuticos e de higiene, por apresentarem atividades terapêuticas, aromatizantes e flavorizantes (SPEZIALI, 2012). A Tabela 2 apresenta alguns estudos que descrevem o potencial farmacológico dos OEs. Contudo, os OEs podem apresentar variabilidade qualitativa e quantitativa em relação a seus constituintes dependendo dos aspectos genéticos, do tipo de solo em que a planta está enraizada, da estação do ano, da incidência de luz solar, entre outros fatores (LIMA et al., 2003). Devido a essa variabilidade, torna-se difícil muitas vezes estabelecer a dose correta de OE a ser usada na terapêutica. Desta

forma, visa-se isolar a substância ou grupo de substâncias responsável pela ação farmacológica atribuída ao OE. A partir desse achado busca-se então determinar concentrações apropriadas para sua utilização considerando a concentração do constituinte bioativo na mistura, visando um produto comercialmente viável e de prática aplicação.

Tabela 2- Potencial farmacológico de óleos essenciais de algumas espécies vegetais

Espécie	Atividade biológica	Referencia
<i>Aniba canelilla</i>	Antinociceptivo e analgésico	(LIMA, A. B. et al., 2009)
<i>Anthemis nobilis</i>	Ansiolítico	(DOBETSBERGER, 2011)
<i>Aloysia gratissima</i>	Sedativo	(BENOVIT, et al., 2015)
<i>Ballota hispanica</i>	Antimicrobiano	(RICCOBONO et al., 2016)
<i>Casimiroa edulis</i>	Hipotensor, sedativo e indutor de sono	(MILLER; HABER; SETZER, 2009)
<i>Cinnamomum verum</i>	Sedativo e ansiolítico	(DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011)
<i>Citrus bergamia</i>	Antinociceptivo, analgésico, anticonvulsivante e anti-inflamatório	(SAKURADA et al., 2009)
<i>Citrus sinensis</i>	Antinociceptivo, analgésico, anticonvulsivante, anti-inflamatório e sedativo	(SAKURADA et al., 2009)
<i>Citrus sp.</i>	Ansiolítico	(DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011)
<i>Cordia verbenacea</i>	Antinociceptivo	(CHAVES, J. S. et al., 2008)
<i>Cymbopogon proximus</i>	Anticonvulsivante e antiemético	(ROZZA; PELLIZZON, 2013)
<i>Eremanthus erythropappus</i>	Analgésico, anti-inflamatório e antinociceptivo	(SOUSA, O. V. et al., 2008)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Antinociceptivo	(LIAPI et al., 2007)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Anticolinesterásico	(AAZZA; LYOUSSI; MIGUEL, 2011)
<i>Eugenia uniflora</i>	Antinociceptivo e hipotérmico	(AMORIM et al., 2009)
<i>Hyptis mutabilis</i>	Sedativo	(SILVA, L. L. et al., 2013)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Ansiolítico e antinociceptivo	(DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011)
<i>Lavandula hybrida</i>	Antinociceptivo	(SAKURADA et al., 2009)
<i>Ligustici Chuanxiong</i>	Analgésico e neuroprotetor	(GUO et al., 2009)
<i>Nectandra megapotâmica</i>	Sedativo	(TONDOLO et al., 2013)

Tabela 2- Potencial farmacológico de óleos essenciais de algumas espécies vegetais (Continuação e conclusão)

Espécie	Atividade biológica	Referencia
<i>Mentha spicata</i>	Antinociceptivo	(GONCALVES et al., 2008)
<i>Mentha x villosa</i>	Antiespasmódico, antinociceptivo e anti-inflamatório	(SOUSA et al., 2009)
<i>Myristica fragrans</i>	Anticonvulsivante (mioclonias e crise de ausência)	(WAHAB et al., 2009)
<i>Nardostachys chinensis</i>	Sedativo	(TAKEMOTO; YAGURA; ITO, 2009)
<i>Ocimum basilicum</i>	Anticonvulsivante	(OLIVEIRA et al., 2009)
<i>Origanum vulgare</i>	Bacteriostáticos	(DORMAN; DEANS, 2000)
<i>Ormenis mixta</i>	Antinociceptivo e anti-inflamatório	(HAJJAJ, 2016)
<i>Pelargonium graveolens</i>	Bacteriostáticos	(DORMAN; DEANS, 2000)
<i>Piper nigrum</i>	Bacteriostáticos	(DORMAN; DEANS, 2000)
<i>Pogostemon cablin</i>	Sedativo	(ITO et al., 2016)
<i>Rosa damascena</i>	Ansiolítico	(DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Antiespasmódico, analgésico, antirreumático, carminativo e antinociceptivo	(TAKAKI et al., 2008)
<i>Salvia sclarea</i>	Antinociceptivo, analgésico, ansiolítico anticonvulsivante e anti-inflamatório	(SAKURADA et al., 2009)
<i>Salvia sp.</i>	Antimicrobiano, antitumoral, antimalárico e anti-inflamatório	(KAMATOU, 2008)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Bacteriostático	(DORMAN; DEANS, 2000)
<i>Thymus vulgaris</i>	Antioxidante e antinociceptivo	(AAZZA; LYOUSSI; MIGUEL, 2011; SAKURADA et al., 2009)
<i>Valeriana officinalis</i>	Sedativo e hipnótico	(WU; HUO; DU, 2007)

2.1.1 Propriedades sedativas de constituintes de OEs

Sedação é um efeito requerido em procedimentos médicos, odontológicos, veterinários e na pesquisa científica com experimentação animal, bem como tratamento de distúrbios do sono e uso como tratamento paliativo em pacientes terminais (APPUKUTTAN, 2016; BOWKER et al., 2014; CORCUERA-FLORES et al., 2016; HENRY, 2016; ÖZMERT; SEVER; TIRYAKI, 2016; SHI et al., 2016). Tanto em humanos como em animais, agentes sedativos são utilizados para diminuir a excitabilidade neuronal e proporcionar relaxamento e conforto ao indivíduo (CORCUERA-FLORES et al., 2016). Entretanto, os sedativos de mecanismo GABAérgico disponíveis na clínica induzem efeitos colaterais indesejados (Tabela 3), o que por sua vez fomenta a busca por terapias alternativas.

Tabela 3- Fármacos sedativos utilizados na clínica, com mecanismo de ação GABAérgico e potenciais efeitos adversos

Sedativo	Mecanismo	Efeitos colaterais
Benzodiazepínicos <i>Midazolam</i> <i>Lorazepam</i> <i>Diazepam</i> <i>Alprazolam</i>	Agonistas do receptor GABA _A	Depressão respiratória Hipotensão Delirium
Propofol	Agonista do receptor GABA _A	Diminuição do débito cardíaco Bradicardia Depressão respiratória Hipotensão Hipertrigliceridemia

Fonte: Adaptado de CAROFF; SZUMITA; KLOMPAS (2016)

Produtos naturais, principalmente OEs e seus compostos são frequentemente relatados como contendo propriedades sedativas, como pode ser observado na Tabela 2. Na literatura,

estudos descrevem o efeito sedativo de monoterpenoides, como o linalol (em modelo murino e em peixes) (CLINE et al., 2008; GASTÓN et al., 2016; HELDWEIN et al., 2010; LINCK et al., 2009), acetato de linalila (CHIOCA et al., 2013b), hidroxidiidrocarvona (SOUSA; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2006), terpinoleno (ITO,; ITO, 2013), terpinen-4-ol (SILVA et al., 2013). Compostos sesquiterpênicos também apresentam efeito sedativo, como é o caso do globulol (SILVA et al., 2013b), (+)- α -santalol (SATOU; OGAWA; KOIKE, 2015), aristolen-1(10)-en-9-ol (TAKEMOTO et al., 2015), valerena-4,7(11)-dieno (TAKEMOTO et al., 2014), caripilenol A, madolina A, ácido volvalerênico A, 15-hidroxiespatulenol, volvalerenal D (WU et al., 2014), α -humuleno e derivados da zerumbona (OGAWA et al., 2014). Os OEs e seus constituintes são cada vez mais aplicados em aromaterapia para induzir sedação e relaxamento (DOBETSBERGER et al., 2011; SWAMY; SINNIHAH, 2016). Os principais OEs utilizados terapeuticamente como sedativos incluem os OEs de bergamota, limão, laranja, canela, citronela, lavanda, jasmim, entre outros (ALI et al., 2015).

Na última década tem-se observado o uso crescente de sedativos em piscicultura, já que esta é uma prática em ascensão no país e no mundo (BALDISSEROTTO et al., 2017). O uso de sedativos naturais é bastante aplicado nesta área para facilitar o manejo animal, assim como em procedimentos científicos que utilizam peixes como animal experimental (BOWKER; TRUSHENSKI, 2011; BOWKER et al., 2014). Portanto, há uma demanda por compostos sedativos e os produtos naturais suprem este mercado, principalmente quando se requer efeito sedativo leve (CAROFF; SZUMITA; KLOMPAS, 2016) e com menor incidência de efeitos colaterais indesejados (DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011). Neste sentido, diversos estudos têm sido publicados mostrando o benefício dos OEs na prática de piscicultura devido a sua eficiência em promover sedação em espécies de peixes de alta demanda no mercado, como é o caso do jundiá e da tilápia. Entre estes estudos podemos destacar aqueles envolvendo os OEs de *Lippia alba* (CUNHA et al., 2010a; HELDWEIN et al., 2014; HOHLENWERGER et al., 2017), *Aloysia gratissima* (BENOVIT et al., 2015), *Aloysia triphylla* (DANIEL et al., 2014; GRESSLER et al., 2012) *Hyptis mutabilis* (SILVA et al., 2013b), *Hesperozygis ringens* e *Lippia sidoides* (SILVA et al., 2013; TONI et al., 2013), *Ocimum gratissimum* (BENOVIT et al., 2012; SILVA et al., 2012), *Aniba rosaeodora* e *Aniba parviflora* (BALDISSEROTTO et al., 2018).

2.1.2 Propriedades anticonvulsivantes de constituintes de OEs

Devido as suas propriedades depressoras do SNC, constituintes de OEs podem desempenhar atividade anticonvulsivante (ADAMS et al., 2012; CHEN et al., 2013). Os mecanismos pelos quais estes compostos protegem contra crises epilépticas e/ou convulsões incluem: efeitos anti-inflamatório e imunomodulador, efeito antioxidante, inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes, inibição de liberação de glutamato, bloqueio de receptores glutamatérgicos, intensificação de correntes inibitórias GABAérgicas, o que inclui o agonismo de receptores do GABA (ALVES et al., 2010; AZANCHI; SHAFAROODI; ASGARPAHAH, 2014; CHEN et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2012; FONSÊCA et al., 2016; HINTERSTEINER et al., 2014; JAVED et al., 2016; SALGADO et al., 2015; SASAKI et al., 1996; SCHUWALD et al., 2013; WANG; HEINBOCKEL, 2018). Uma característica importante para as ações neuroativas dos OEs, entre elas a anticonvulsivante, é a sua alta lipofilicidade, o que permite passar com facilidade a barreira hematoencefálica e assim ter uma alta biodisponibilidade no SNC (LIU; TESTA; FAHR, 2011; MANAYI et al., 2016). Frequentemente a atividade anticonvulsivante de OEs é atribuída a um ou mais constituintes de sua composição, não sendo raros estudos em que constituintes isolados desempenham uma performance mais satisfatória como estratégia terapêutica que o seu OE de origem. Alguns estudos podem ser citados como exemplo, como é o caso dos monoterpenos α - e β -pineno e α -tujeno, os quais são apontados como os responsáveis pelo efeito anticonvulsivante do OE de *Ferula gumosa* (SAYYAH et al., 2001). Desta forma, muitas vezes se faz a avaliação *in vivo* diretamente dos compostos isolados de um determinado OE. Neste contexto, podem-se destacar o composto mentol (monoterpenoide), cuja atividade anticonvulsivante é atrelada à diminuição da excitabilidade neuronal via aumento da atividade inibitória do receptor GABA_A (sítio de ligação do propofol) (WATT et al., 2008; ZHANG et al., 2008). Já o constituinte citronelol desempenha atividade anticonvulsivante via mecanismos GABAérgicos associados ao bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes (MANAYI et al., 2016). O monoterpenoide timoquinona foi eficaz ao reduzir episódios convulsivos em casos de epilepsia infantil e seu mecanismo de ação envolve a participação dos receptores GABA_B1 e a modulação de quinases dependentes de calmodulina (AKHONDIAN et al., 2011; HOSSEINZADEH; PARVARDEH, 2004; ULLAH et al., 2015). Os fenilpropanoides metileugenol e eugenol, reconhecidos por suas propriedades sedativas, também detém efeito anticonvulsivante (SAYYAH; VALIZADEH; KAMALINEJAD, 2002). Compostos de estrutura sesquiterpênica também podem produzir efeito anticonvulsivante, a exemplo de nerolidol (anti-inflamatório e antioxidante) (AZANCHI;

SHAFAROODI; ASGARPANAH, 2014; BAXENDALE et al., 2012), huperzina A (modulação dos receptores GABA_A) (GERSNER et al., 2015), ésteres do ácido valerênico (modulação dos receptores GABA_A) (HINTERSTEINER et al., 2014), β-cariofileno (anti-inflamatório e antioxidante, bloqueio de canais de cálcio) (OJHA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; PINHO-DA-SILVA et al., 2012), bilobalida (neuroprotetor) (MANAYI et al., 2016) e isociperol (anti-inflamatório e sequestrador de radicais livres) (SEO et al., 2016).

2.1.3 Propriedades ansiolíticas dos OEs

Historicamente, plantas produtoras de OEs são popularmente associadas a efeitos calmantes, a exemplo do jasmim, da lavanda, da laranjeira e da erva-cidreira e camomila (COOKE; ERNST, 2000). Pesquisas têm sido conduzidas para confirmar o efeito calmante dos OEs e atualmente, encontra-se um número crescente de estudos mostrando o efeito dos OEs e seus constituintes isolados na redução do estresse emocional/ansiedade patológica (WANG; HEINBOCKEL, 2018). Ainda, uma variedade de OEs são aplicados em forma de aromaterapia (via inalatória, tópica) como terapia adjuvante para transtornos de ansiedade (ALI et al., 2015). Entre as espécies utilizadas nesta prática destacam-se *Lavandula angustifolia*, *Rosa damascena*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon*, *Santalum album*, *Salvia sclarea*, *Anthemis nobilis*, e *Pelargonium* spp. (SETZER, 2009). Entretanto, deve-se considerar evidências científicas baseadas em resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos, identificando os compostos responsáveis pelo efeito ansiolítico que estes OEs venham a apresentar. Neste sentido, testes em animais de laboratório são uma ferramenta útil para a triagem de OEs/compostos isolados com alta eficácia como ansiolíticos. A Tabela 4 mostra OEs produzidos por diferentes espécies que induzem efeitos ansiolíticos em animais experimentais. Um exemplo que merece ser citado é o OE de lavanda, cujo efeito ansiolítico foi detectado em testes como o labirinto em cruz elevado, campo aberto e teste de enterrar esferas utilizando diferentes espécies animais (ratos, camundongos, gerbil) (SOUSA, D. P. d., 2013). Como consequência destes resultados, uma série de ensaios clínicos foram conduzidos utilizando diferentes formas de administração, sendo que a mais eficaz foi a administração por via oral (PERRY et al., 2012). Adicionalmente também se encontram em fase de estudo clínico os OEs de *Mentha* spp. e *Citrus* spp. (SHARIFI-RAD et al., 2017).

Tabela 4. Atividade ansiolítica de OEs em modelos animais de avaliação de ansiedade

Espécie vegetal	Animal	Dose/via	Modelo de ansiedade	Mecanismo de ação	Referência
<i>Achillea wilhemsii</i>	Ratos	1 mg/kg i.p	LCE	–	(MAJNOONI et al., 2013)
<i>Alpinia zerumbet</i>	Cam.	8,7 ppm In.	LCE	–	(MURAKAMI et al., 2009)
<i>Angelica sinensis</i>	Cam.	30 mg/kg v.o.	LCE; CCE	–	(CHEN, S. W. et al., 2004)
<i>Cananga odorata</i>	Cam.	1% v/v In.	LCE	5-HT/DA	(ZHANG, N. et al., 2018)
<i>Celastarus paniculatus</i>	Ratos	1,5 g/kg v.o.	LCE; Vogel	5-HT	(RAJKUMAR et al., 2007)
<i>Citrus aurantium</i>	Cam.	0,5 - 1 g/kg v.o.	LCE; CA; CCE	5-HT	(CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002; COSTA, C. A. R. A. et al., 2013; PULTRINI ADE; GALINDO; COSTA, 2006)
<i>Citrus junos</i>	Cam.	6.7 mg/L In.	LCE; CCE	–	(SATOU et al., 2012)
<i>Citrus limon</i>	Cam.	100 - 400 µL In.	LCE; CA	–	(VIANA et al., 2016)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Cam.	10 mg/kg v.o.	LCE; CA; CCE	GABAérgico	(COSTA, C. A. R. D. A. et al., 2011)
<i>Ducrosia anethifolia</i>	Cam.	25 mg/kg v.o.	LCE	GABAérgico	(HAJHASHEMI et al., 2010)
<i>Ferulago angulata</i>	Ratos	200 µL In.	LCE	GABAérgico	(BAGCI et al., 2016)
<i>Foeniculum vulgare</i>	Cam.	200 mg/kg v.o.	LCE; CA		(MESFIN; ASRES; SHIBESHI, 2014)
<i>Juniperus virginiana</i>		800 mg/kg i.p.	LCE	5-HT/DA	(ZHANG, K.; YAO, 2018)
<i>Lavandula officinalis</i>	Cam.	800 mg/kg i.p.	Vogel; Geller	–	(UMEZU et al., 2006)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Cam.	1 - 5% In.	LCE	5-HT	(CHIOCA et al., 2013a)
<i>Lippia alba</i>	Cam.	3 mg/kg i.p.	LCE	CCVD	(SCHUWALD et al., 2013)
<i>Lippia citriodora</i>	Cam.	15 mg/kg i.p	LCE; CA	GABAérgico	(BONYANI; SAJJADI; RABBANI, 2018)
<i>Ocimum basilicum</i>	Cam.	200 mg/kg i.p.	LCE		(RABBANI; SAJJADI; VAEZI, 2015)
<i>Pelargonium roseum</i>	Cam.	10 mg/kg i.p.	LCE	5-HT	(ABOUHOSSEINI TABARI et al., 2018)
<i>Rose centifolia</i>	Cam.	400 mg/kg i.p.	Vogel; Geller	–	(UMEZU, 2000)
<i>Spiranthera odoratissima</i>	Cam.	500 mg/kg v.o.	LCE; CA	5-HT	(GALDINO et al., 2012)
<i>Stachys tibetica</i>	Ratos	25 mg/kg v.o.	LCE; CA	–	(KUMAR, D. et al., 2012)
<i>Thymus vulgaris</i>	Cam.	4 µL/L In.	LCE	–	(SATOU et al., 2018)

5-HT= Serotoninérgico; CA= Campo aberto; Cam.= Camundongos; CCVD= Canais de cálcio voltagem-dependente; CCE= Caixa claro-escluro; DA= Dopaminérgico; Geller= Teste de conflito de Geller; In.= inalação LCE= Labirinto em cruz elevado; Vogel= Teste de conflito de Vogel.

Adicionalmente, constituintes isolados de OEs são alvos para a pesquisa de novas moléculas com atividades ansiolíticas. Testes em animais já demonstraram efeito tipo-ansiolítico para os compostos mirtenol, verbenol, estragol, carvacrol, pinenos, limoneno (WANG; HEINBOCKEL, 2018), 1,8 cineol, mirtenol, asarona, beta-cariofileno, citral, metil-

isoeugenol, carvona mirreno, linalol e vanilina (CHIOCA et al., 2013b; CLINE et al., 2008; DE SOUSA et al., 2015; FAJEMIROYE et al., 2014; GALDINO et al., 2012; HATANO et al., 2012; MOREIRA, M. R. C. et al., 2014; TIAN et al., 2017). Quanto ao mecanismo de ação ansiolítica, estudos mostram que os OEs e seus constituintes promovem efeitos ansiolíticos devido a interação com o sistema GABAérgico e serotoninérgico, como exemplificado na Tabela 4 (WANG; HEINBOCKEL, 2018). Ainda, alguns OEs modulam canais iônicos como os canais de sódio (WANG; HEINBOCKEL, 2018) e canais de cálcio voltagem-dependente (SCHUWALD et al., 2013). Independente do mecanismo de ação, a maioria dos OEs induz sedação decorrente da depressão do SNC, o que em animais é observado pela alteração da atividade motora em testes como o campo aberto (DE SOUSA et al., 2015). Dependendo do efeito pretendido pela terapia ansiolítica, este efeito sedativo pode ser desejado ou não.

2.2 GÊNERO *Nectandra*

Nectandra é o segundo maior gênero da família Lauraceae, depois de *Ocotea*, englobando cerca de 120 espécies descritas (GRECCO et al., 2016; VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). Este gênero foi descrito pela primeira vez por Rottboel em 1778, com as espécies *N. sanguinea* Rol. ex Rottb. e *N. bijuga* Rottb (ROHWER et al., 1992) e distribui-se por regiões tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Oceania (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001). É um gênero composto por árvores de folhas simples, alternas, raramente opostas e subopostas, com frutos do tipo baga (ALVES, F. M. et al., 2009). São descritas para este gênero 46 espécies brasileiras permeando os biomas da floresta Amazônica e Atlântica, caatinga, cerrado e pantanal (QUINET et al., 2015).

As espécies do gênero *Nectandra* agregam valor na área de alimentos como temperos e especiarias, na indústria química e farmacêutica e ainda tem seu uso preconizado na medicina popular (MARQUES, 2001; MELO et al., 2006). Plantas deste gênero tem demonstrado propriedades biológicas, incluindo utilização no tratamento da dor, inflamação, febre, hipertensão arterial e infecções parasitárias, bacterianas e fúngicas (APEL et al., 2006; BRITO; MORENO, 2009; OLIVEIRA DE MELO et al., 2006; TRUITI et al., 2005; YANG et al., 1999). O primeiro composto identificado deste gênero foi o caparrapiol, um sesquiterpenoide encontrado na espécie *N. caparrapi*, em 1898 (GRECCO et al., 2016). Outros compostos característicos do gênero e responsáveis pelas propriedades farmacológicas das espécies de *Nectandra* incluem alcaloides, lignanas, flavonoides, esteroides, cumarinas, lactonas, ácidos graxos, fenilpropanoides e compostos terpênicos (BRITO; MORENO, 2009; CICCIO et al.,

2009; GARCEZ et al., 2009; GARLET et al., 2016; GOTTLIEB, 1972; MORENO et al., 1993; OLIVEIRA DE MELO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2002). Tais atividades biológicas atribuídas a diferentes classes de metabólitos secundários bioativos, tem inspirado o estudo farmacológico das espécies deste gênero (GRECCO et al., 2016).

2.3 *Nectandra grandiflora*

Nectandra grandiflora Nees (Figura 1) é uma espécie nativa e endêmica do Brasil e apresenta domínios fitogeográficos no Cerrado e Mata Atlântica, distribuindo-se predominantemente no sudeste e sul do país (QUINET et al., 2015). É encontrada predominantemente em formações florestais abertas, como matas de galeria ou vegetação secundária, ocorrendo ainda na floresta de Araucária, entre 600 e 1300 m de altitude (ROHWER, 1992; BARBOSA, 2009).

Figura 1- *Nectandra grandiflora* (A). Detalhe: inflorescências (B) e frutos (C)



Fonte: Autor.

As sinonímias oficiais de *N. grandiflora* incluem *Gymnobalanus regnellii* Meisn., *Nectandra glauca* Warm. ex Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *cuneata* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *latifolia* Nees, *Nectandra grandiflora* var. *longifolia* Meisn., *Nectandra grandiflora* var. *oblongifolia* Nees e *Nectandra grandiflora* var. *obovata* Meisn (QUINET et al., 2015; ROHWER et al., 1992). É conhecida popularmente como canela, canela-cheirosa, canela-amarela, canela-fedida, canela-nhuva, caneleira e niúva (BAITELLO, 2003; MARQUES, 2007). É caracterizada como uma árvore de cerca de 10-15 m de altura, perene, com copa globosa e densa. Suas folhas apresentam-se como alternadas, simples e geralmente glabras em ambas as faces (LORENZI, 2002). Sua floração ocorre de abril a dezembro, com um pico de agosto a outubro, frutificando de outubro a fevereiro (BARBOSA, 2009).

As aplicações de *N. grandiflora* já descritas referem-se a usos medicinais, ornamentais, devido sua copa densa, e ecológicos (MARQUES, 2007). O último se traduz no fato de seus frutos serem bem apreciados pelos pássaros (LORENZI, 2002). Na medicina popular, é utilizada como antirreumática, diurética e digestiva (RAGGI, 2008). O perfil químico e farmacológico de compostos isolados de *N. grandiflora* é mostrado na Tabela 5. *N. grandiflora* é uma espécie produtora de OE e este extrativo vem sendo analisado quanto ao seu potencial biológico/ farmacológico (BARBAS et al., 2017; CUNICO et al., 2016; GRECCO et al., 2016; MORENO et al 1993; SILVA, 2016). O rendimento do OE das folhas é cerca de 0,5%, não sendo afetado por procedimento de secagem do material vegetal à temperatura ambiente. Ainda, o rendimento varia sazonalmente, apresentando um pico do teor na estação da primavera, podendo alcançar até 0,75% da massa fresca (SILVA, 2013). A composição química do OE é distinta para indivíduos coletados em locais diferentes. Por exemplo, *N. grandiflora* encontrada no estado do Paraná, Brasil (CUNICO et al., 2010) não produz os sesquiterpenoides deidrofuquinona (DHF), (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) (SILVA, 2013), (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-epóxido de deidrofuquinona (DFX) encontrados em indivíduos coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (SILVA, D. T., 2016). Tais constituintes serão particularmente discutidos a seguir.

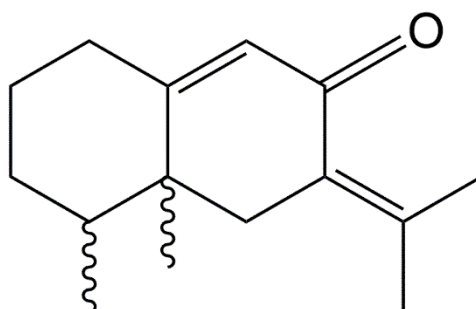
Tabela 5- Perfil farmacológicos de *Nectandra grandiflora*. Onde C: cascas, F: folhas, I: inflorescências, FR: frutos

Composto	Classe química	Órgao vegetal	Potencial farmacológica	Referência
Ácido cóstico	Alcaloide	C	Imunomodulador	(LIM et al., 2015)
(+)-Laurotetanina	Alcaloide	C	Antihipertensivo, antiarrítmico	(GRECCO et al., 2016)
Boldina	Alcaloide	C	Antiviral e antioxidante	(TOMŠÍK et al., 2016)
Isoboldina	Alcaloide	C	Antibacteriano, antiparasitário	(FENG et al., 2009; MOLLATAGHI et al., 2012)
Aporfina	Alcaloide	–	Antitumoral, antioxidante	(MORENO et al., 1993; RIBEIRO et al., 2002)
Laurolitsina	Alcaloide	–	Antitumoral, antioxidante	(CHEN et al., 1994; MORENO et al., 1993; RIBEIRO et al., 2002)
3-O- β -ramnosilquercetina	Flavonoide	F	–	(RIBEIRO et al., 2002)
3-O- β -rhamnosilcamferol	Flavonoide	F	-	(RIBEIRO et al., 2002)
Afzelin	Flavonoide	F	Antifúngico, gastroprotetor, anticâncer e antiasmático	(DE BARROS et al., 2016)
Quercitrina	Flavonoide	F	Antifúngico, anticâncer, ansiolítico e anti-lúpus	(LI et al., 2016; TRUONG et al., 2016)
Burchellina	Lignana	F	–	(GRECCO et al., 2016)
Ácido protocatecuico	Composto fenólico	F	Anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, anticâncer, anti-asmático	(RIBEIRO et al., 2005)
Lapachol	Composto fenólico	F	–	(GRECCO et al., 2016)
Deidrofuquinona	Sesquiterpenoide	F, C, I, FR	Antimicrobiano, antioxidante, sedativo e anestésico	(GARLET et al., 2016; HEINZMANN et al., 2016; PONOMARENKO et al., 2016; SILVA, 2013)
Selin-11-en-4- α -ol	Sesquiterpenoide	F, C, I, FR	Sedativo (dado não publicado), antimicrobiano, repelente	(CANTRELL; CARROLL; KLUN, 2007; RASOANAIVO et al., 2013; RODRIGUES, P. et al., 2016)
(+)-Eremofil-11-en-10-ol	Sesquiterpenoide	F, C, I, FR	Sedativo	Dados não publicados
(+)-Epóxido de deidrofuquinona	Sesquiterpenoide	F, C, I, FR	Sedativo	Dados não publicados

2.3.1 (+)-Deidrofuquinona (DHF)

O sesquiterpenoide deidrofuquinona (Figura 3), (IUPAC: 4a,5-dimetil-3-propan-2-iliden-5,6,7,8-tetraidro-4H-naftalen-2-ona), também pode ser denominado de diidrocaranona (ALKHATHLAN et al., 2005); possui fórmula molecular $C_{15}H_{22}O$, peso molecular 218.34 g/mol, LogP= 4.1 (PUBCHEM, 2016) e pico de absorção na faixa do ultravioleta em 249 nm (LIZARRAGA et al., 2013). O composto DHF possui uma estrutura carbônica bicíclica com 3 duplas ligações (SCHENATO et al., 2001). A estrutura química deste composto é bastante estável devido à presença dos dois anéis de seis membros conectados e ligados a um grupo isopropilideno e um grupo cetônico. Ainda, DHF foi descrita pela primeira vez em uma espécie vegetal por Naya e colaboradores em 1972 (NAYA; TSUJI; HAKU, 1972). Este sesquiterpenoide foi posteriormente isolado de espécies do gênero *Senecio*, incluindo *S. aureus* (raiz) e de partes aéreas de *S. glaucus* subsp. *coronopifolius*, *S. desfontainei*, *S. humillimus*, *S. linearifolius*, *Senecio adenotrichius* e de *Senecio platensis* (AHMED, 1991; BOHLMANN et al., 1981; BOLZAN, 2007; NACHMAN, 1983; NIEMEYER, 2009; POOTER; BUYCK; SCHAMP, 1986; ZDERO et al., 1990). Também já foi isolado da madeira (ALKHATHLAN et al., 2005) e do extrato metanólico da raiz de *Casalia hastata* (HAYASHI; NAKAMURA; MITSUHASHI, 1973). Entretanto, o isômero (+)-DHF foi caracterizado apenas no OE de folhas, frutos, inflorescências e cascas de *N. grandiflora* em 2013 (SILVA, 2013). O composto DHF encontra-se em um teor de 22% (m/m) no OE das folhas de *N. grandiflora* (Anexo A).

Figura 2- Estrutura química do composto deidrofuquinona



Fonte: Autor

Adicionalmente, DHF pode ser obtida por semissíntese a partir do composto fuquinona, através de desidrogenação com 2,3 dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona dando origem a deidrofuquinona com bom rendimento (NAYA et al., 1968). Da mesma forma, outras rotas para a síntese da deidrofuquinona vêm sendo descritas desde a década de 1960. Uma rota sintética,

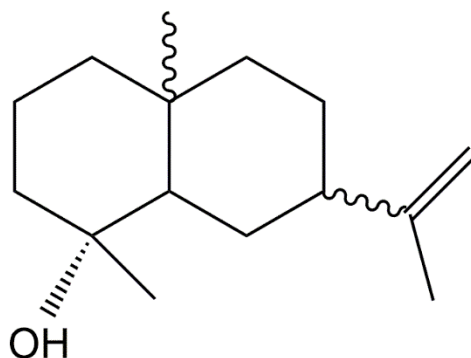
a partir do isoxasol, também resultou na mistura racêmica de \pm deidrofuquinona, com espectros de massas comparáveis aos da deidrofuquinona obtida a partir da fuquinona de origem natural (OHASHI, 1969). Também foi proposta uma via para a síntese de (-)-deidrofuquinona, em dois passos reacionais e com 71% de rendimento total de reação. Trata-se de uma rota eficiente e estereoseletiva a partir de uma enona, obtida por anelação quiral de Robinson, a partir da (R)-pulegona (SCHENATO et al., 2001). Entretanto, não há relatos na literatura descrevendo rota de síntese estereoseletiva para o isômero dextro-giratório da deidrofuquinona.

Como mencionado na Tabela 5, estudos mostram que DHF possui atividade antimicrobiana (BOLZAN, 2007; GARLET et al., 2015), antioxidante (atenua a produção de espécies reativas do oxigênio em macrófagos) (PONOMARENKO et al., 2016) e diminui a excitabilidade neuronal (GARLET et al., 2016; HEINZMANN et al., 2016). Em relação ao efeito antimicrobiano, DHF isolada de *Senecio platensis* foi eficaz frente ao *Bacillus cereus* cepa ATCC 14579 e cepa hospitalar (CIM: 256 $\mu\text{g/ml}$) (BOLZAN, 2007). Ainda, (+)-DHF isolada de *N. grandiflora* apresentou atividade bacteriostática e bactericida, respectivamente, frente a *Pseudomonas shigelloides* (200 e 200 $\mu\text{g/ml}$), *Acinetobacter calcoaceticus* (800 e >3200 $\mu\text{g/ml}$), *Citrobacter freundii* (3200 e >3200 $\mu\text{g/ml}$), *Aeromonas hydrophila* (200 e 400 $\mu\text{g/ml}$) (GARLET et al., 2015). Também foi descrita sua atividade antifúngica contra fungos apodrecedores da madeira, *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum* (SILVA et al. 2016). A ação sedativa e anestésica de (+)-DHF em juvenis de jundiás foi detectada recentemente. O efeito sedativo e anestésico de (+)-DHF foi equivalente àquele proporcionado pelo anestésico de esqueleto fenilpropanoide, eugenol. Adicionalmente, (+)-DHF demonstrou um perfil de segurança superior ao eugenol neste modelo animal (CUNHA et al., 2010b; HEINZMANN et al., 2016). Tais efeitos depressores do SNC induzidos pelo composto foram atenuados pelo antagonista específico do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, flumazenil (GARLET et al., 2016).

2.3.2 (-)-Selin-11-en-4- α -ol (SEL)

O sesquiterpenoide (-)-selin-11-en-4- α -ol (Figura 3) (IUPAC: (1R)-1,4a-dimetil-7-prop-1-en-2-il-2,3,4,5,6,7,8,8a-octaidronaftalen-1-ol) é um hidrocarboneto de esqueleto eudesmano associado a um grupo funcional álcool e possui fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$, peso molecular 222.372 g/mol e LogP= 4.5 (PUBCHEM, 2016). SEL compõe cerca de 4% do OE de *N. grandiflora* (Anexo A). Moléculas de esqueleto eudesmano ocorrem frequentemente em outras espécies do gênero *Nectandra* (GARCEZ et al., 2010; JULIANTI et al., 2012)

Figura 3- Estrutura química do composto (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL)



Fonte: Autor.

O composto SEL tem ocorrência relatada em óleos essenciais de diferentes espécies: *Eugenia protenta* (18%) (ZOGHBI et al., 2011); *Myrcia sylvatica* (24%) (ZOGHBI et al., 2003); *Artemisia asiatica* (12%) (KALEMBA; KUSEWICZ; ŚWIADER, 2002); *Psidium guajava* (6,9%) (ADAM et al., 2011); *Litsia paludosa* (2,3%) (AHMAD et al., 2005); *Athanasia brownii* (24%) (RASOANAIVO et al., 2013); *Neolitsea fischeri* (14%) (JOHN et al., 2008); *Piper anonifolium* (20%) (SILVA et al., 2014) e *Erythrina stricta* (6.8%) (AKTER et al., 2016).

A síntese do composto SEL a partir do eudesmol foi descrita por CHETTY; ZALKOW; ZALKOW em 1968. Ainda, pode ser sintetizado a partir da molécula octahidro-8-hidroxi-4a,8-dimetil-2(1H) – naftalenona (KESSELMANS et al., 1991). Este composto tem semelhança química com o intermedeol, embora a espectroscopia de massas consiga distinguir esses dois compostos. O sinal do selin-11-en-4 α -ol no espectro de massas revela um pico de intensidade média-alta em 135 m/z, enquanto que este mesmo pico do espectro do intermedeol é de intensidade baixa (CHETTY; ZALKOW; ZALKOW, 1968). Este composto tem espectro de massas com um pico em 222 m/z e outro em 204 m/z, caracterizando a perda de uma molécula de H₂O e explicitando a presença de seu grupo alcoólico (CHANOTIYA; SAMMAL; MATHELA, 2005).

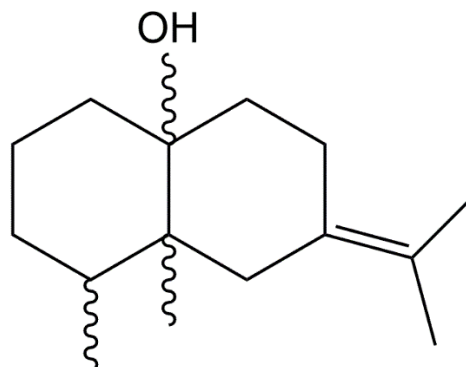
Como mencionado na Tabela 5, o composto SEL apresenta potencial farmacológico, refletido pelas atividades antimicrobiana e repelente de carrapatos já relatadas na literatura (CANTRELL; CARROLL; KLUN, 2007; RASOANAIVO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016). Ainda, este composto apresentou atividade citotóxica frente a células P-388 (células de linfoma de camundongo) com ED₅₀ (50% de redução da absorbância em ensaio de MTT) igual a 3,86 μ g/mL (DUH et al., 1999). O OE de *Globba sessiliflora* (Zingiberaceae) contém 11% de

selin-11-en-4 α -ol e induz atividade miorelaxante em isolado duodenal e atividade antioxidante frente ao radical DPPH (KUMAR et al., 2012). O OE de *Athanasia brownii* com 24,6% de selin-11-en-4 α -ol tem atividade neutralizadora de radicais livres e inibe o crescimento de células tumorais A375 (melanoma maligno) e HCT 116 (carcinoma de cólon) com valores de IC₅₀ iguais a 19,85 e 29,53 μ g/ml, respectivamente (RASOANAIVO et al., 2013). Em pesquisa realizada em bancos de patentes livres e também através do *software* Orbit®, um portal pago de busca de patentes, não foi encontrado nenhum registro de patente, até o momento, para o composto isolado, bem como para qualquer atividade que ele possa exercer em animais. Apenas uma patente foi detectada, a qual se trata de uma formulação de um desodorante contendo, entre outros sesquiterpenos, o composto SEL (BRAHMS et al., 2005). Adicionalmente, devido a este composto possuir estrutura química semelhante à substância DHF, nosso grupo de pesquisa investigou sua ação sobre o SNC em modelo utilizando o jundiá. Os nossos resultados mostraram que SEL possui atividade sedativa (dados não publicados), entretanto o mecanismo desta atividade ainda é desconhecido.

2.3.3 (+)-Eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-Epóxido de deidrofuquinona (DFX)

Os sesquiterpenoides ERM e DFX estão presentes com teores em torno de 6 e 10%, respectivamente, no OE de *N. grandiflora* (Anexo A) e suas estruturas químicas inéditas foram elucidadas recentemente (SILVA, 2016). Ambos compostos possuem estrutura carbônica bicíclica semelhante à substância DHF. O composto ERM é um hidrocarboneto sesquiterpenoide associado a um grupo funcional álcool, assim como o composto SEL, e possui fórmula molecular C₁₅H₂₆O, peso molecular 222 g/mol (Figura 4). O composto DFX, também um hidrocarboneto sesquiterpenoide, contém uma função epóxido (Figura 5).

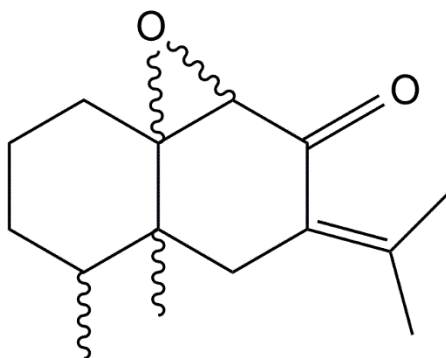
Figura 4. Estrutura química do composto (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM)



Fonte: Autor.

Uma vez que suas estruturas foram descritas recentemente, ainda não foram relatados quaisquer estudos referentes às propriedades biológicas destes compostos. Todavia, o nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em caracterizar farmacologicamente estes compostos, juntamente com as substâncias DHF e SEL.

Figura 5. Estrutura química do composto epóxido de deidrofuquinona (DFX)



Fonte: Autor.

2.4 EPILEPSIA

A Organização Mundial da Saúde descreve a epilepsia como:

Epilepsia é uma doença crônica caracterizada por crises recorrentes, as quais variam de um breve lapso de atenção ou espasmos musculares até convulsões graves e prolongadas. As crises convulsivas são causadas por descargas elétricas excessivas em um grupo de células (neurônios) de forma repentina. Na maioria dos casos pode ser tratada com sucesso por fármacos antiepiléticos (WHO, 2015).

A epilepsia (episódios recorrentes e espontâneos de crise epilética) acomete cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, afetando em diferentes intensidades indivíduos de todas as faixas etárias. Estima-se que entre 6% e 69% dos pacientes não respondem às terapias médicas e cirúrgicas convencionais, seguindo a desenvolver crises. Alguns dados têm mostrado que a nível mundial, a disponibilidade média de medicamentos antiepiléticos no setor público é menor que 50% (TELLEZ-ZENTENO et al., 2014; WHO, 2015) e a falta de controle de crises epiléticas tem consequências drásticas para o paciente, pois diminui a sua qualidade de vida (SORENSEN; KOKAIA, 2012). Pacientes refratários aos tratamentos atuais disponíveis para a

epilepsia frequentemente relatam intolerância ao medicamento, piora da memória e depressão (comorbidade) (LUONI et al., 2011). O progresso na pesquisa de novos fármacos revelou antiepiléticos com melhor perfil de tolerabilidade, efeitos adversos e interação com outros medicamentos. Entretanto, esses novos fármacos não superam os medicamentos antiepiléticos clássicos em termos de eficácia clínica (LOSCHER; SCHMIDT, 2011). Desta forma, no setor público ainda se opta por fármacos como carbamazepina, fenitoína e ácido valpróico, mantendo assim a alta taxa de pacientes refratários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Crises epiléticas são resultado de um desbalanço entre inibição e excitação neuronal, seja por mutações genéticas, dano tecidual/ morte neuronal (após trauma, derrame, transtornos degenerativos ou infecção no SNC), inflamação, alteração da função da Na^+/K^+ ATPase, aumento excessivo do “*input*” excitatório ou prejuízo no controle neuronal inibitório (BAULAC et al., 2001; GOLDBERG; COULTER, 2013; KRAMER et al., 2016; PITKANEN et al., 2007; PRINCE et al., 2009; SCHARFMAN; BROOKS-KAYAL, 2014; SORENSEN; KOKAIA, 2012; STALEY, 2015; VEZZANI et al., 2016). As crises epiléticas podem ser de início focal, generalizado ou ainda de início desconhecido. As crises focais se originam em um local específico e o nível de consciência do paciente pode ser utilizado como caracterizador deste tipo de crise (FISHER et al., 2017). As crises generalizadas são resultado de uma integração entre sinapses corticais e subcorticais, as quais desencadeiam uma atividade neuronal sincrônica e paroxística (BREVARD et al., 2006) e são classificadas em crises motoras e não-motoras (crises de ausência) (FISHER et al., 2017). O termo “convulsão” é utilizado não-oficialmente para designar atividade motora durante uma crise epilética e tal atividade poder ser tônica, clônica, mioclônica ou tônico-clônica (FISHER et al., 2017).

Normalmente em condições de atividade excessiva há uma diminuição (sub regulação) das condutâncias excitatórias e um aumento (supra regulação) das condutâncias inibitórias, a fim de reduzir a excitabilidade neuronal. Após a ocorrência de um dano ao tecido cerebral, estes mecanismos são uma importante maneira de prevenir a hiperatividade neuronal e o desenvolvimento de crises epiléticas. Este sistema de reparo do desbalanço excitatório/inibitório funciona com sucesso na maioria das circunstâncias (STALEY, 2015). Entretanto, uma das razões pelas quais alguns pacientes desenvolvem a epilepsia é que tal mecanismo de manutenção da homeostase sináptica não funciona corretamente. As causas deste distúrbio na restauração da homeostase são frequentemente devidas ao mau funcionamento de canais iônicos (canalopatias), uma vez que a maioria dos genes implicados na causa da epilepsia codificam pra este tipo de proteína (BROOKS-KAYAL et al., 1998; MCNAMARA; HUANG;

LEONARD, 2006; ZAMPONI et al., 2015). A maioria dos fármacos antiepiléticos são moduladores de canais iônicos, a exemplo da carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, ácido valpróico, topiramato, pregabalina, entre outros (Tabela 6). Adicionalmente, a proteção contra crises epiléticas é alcançada em modelos experimentais através do bloqueio de canais de sódio ou cálcio, facilitação de canais de potássio, inibição de receptores glutamatérgicos ou aumento da inibição neuronal através da ativação de receptores GABA_A (KAMINSKI; ROGAWSKI; KLITGAARD, 2014; ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004).

Tabela 6-Principais fármacos anticonvulsivantes.

	Anticonvulsivante	Principal mecanismo de ação	Ano de aprovação	Limitações
Fármacos de 1ª geração	Brometo de potássio	Potencialização do GABA	1857	Utilizado apenas como adjuvante, atua como sedativo.
	Fenobarbital	Potencialização do GABA via ativação do receptor GABA _A	1912	Indutor enzimático, pode causar hipersensibilidade da pele e não deve ser usado para crises de ausência.
	Fenitoína	Bloqueador de canal de sódio	1938	Indutor enzimático, pode causar hipersensibilidade da pele e não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias, apresenta farmacocinética não linear.
	Trimetadiona	Bloqueador de canal de cálcio do tipo T	1946	Não é mais utilizado, causa teratogênese.
	Primidona	Potencialização do GABA via ativação do receptor GABA _A , bloqueio de canais de sódio	1954	Indutor enzimático, pode causar hipersensibilidade da pele e não deve ser usado para crises de ausência, atua como sedativo.
	Etossuximida	Bloqueador de canal de cálcio do tipo T	1958	Sonolência, perda de apetite, náuseas, vômitos, soluços, depressão, episódios psicóticos, insônia, raramente causa anemia aplástica.
Fármacos de 2ª geração	Diazepam	Agonismo do receptor GABA _A	1963	Utilizado como adjuvante, uso em emergência, atua como sedativo, leva à tolerância (perda de eficácia).
	Carbamazepina	Bloqueador de canal de sódio	1964	Indutor enzimático, pode causar hipersensibilidade da pele e não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.
	Valproato	Potenciação do GABA, inibição de receptores NMDA, bloqueio de canais de sódio e cálcio tipo T	1967	Inibidor enzimático, teratogênico, aumento de peso.
	Clonazepam	Agonismo do receptor GABA _A	1968	Utilizado como adjuvante, atua como sedativo, leva à tolerância (perda de eficácia).
	Clobazam	Agonismo do receptor GABA _A	1975	Utilizado como adjuvante, atua como sedativo, leva à tolerância (perda de eficácia).

Tabela 6- Principais fármacos anticonvulsivantes (Continuação e conclusão)

Anticonvulsivante	Principal mecanismo de ação	Ano de aprovação	Limitações
Progabide	Pró-fármaco: se converte em GABA no organismo	1985	Hepatotoxicidade, não é amplamente utilizado.
Vigabatrina	Inibição da GABA transaminase	1989	Não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias, pode causar perda de visão e ganho de peso.
Lamotrigina	Bloqueador de canal de sódio e cálcio tipo L, N e P	1990	Indutor enzimático, pode causar hipersensibilidade da pele.
Oxcarbazepina	Bloqueador de canal de sódio	1990	Indutor enzimático, pode causar hipersensibilidade da pele e não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.
Felbamato	Potenciação do GABA, inibição dos receptores NMDA, bloqueio do canal de sódio e de canal de cálcio	1993	Utilizado como adjuvante; pode causar anemia aplástica, hepatotoxicidade, hipersensibilidade da pele, não é mais amplamente utilizado.
GABA-pentina	Bloqueador de canal de cálcio	1993	Utilizado como adjuvante, pode causar ganho de peso, não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.
Topiramato	Potenciação do GABA, inibição dos receptores AMPA, bloqueio do canal de sódio e de canal de cálcio	1995	Sonolência, tontura, disfunção cognitiva, problemas de fala, pedras nos rins, perda de peso.
Tiagabina	Inibidor da receptação do GABA por inibição do transportador de GABA (GAT-1)	1996	Utilizado como adjuvante, não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.
Levetiracetam	Modulação da proteína da vesícula sináptica SV2A	2000	Não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.
Zonisamida	Bloqueador de canal de sódio e potássio	2000	Utilizado como adjuvante, atua como sedativo.
Estiripentol	Potencialização do GABA, bloqueador de canal de sódio	2002	Utilizado apenas como adjuvante.
Pregabalina	Bloqueador de canal de cálcio (subunidade $\alpha_2\delta$)	2004	Utilizado como adjuvante, ganho de peso, não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.
Rufinamida	Bloqueador de canal de sódio	2004	Utilizado apenas como adjuvante.
Lacosamida	Lento reforço da inativação de canais de sódio dependentes de voltagem	2008	Utilizado apenas como adjuvante.
Acetato de eslicarbazepina	Bloqueador de canais de sódio	2009	Indutor enzimático, utilizado apenas como adjuvante.
Retigabina	Ativador do receptor de potássio	2011	Utilizado como adjuvante; disfunção da retina; não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias; não é mais amplamente utilizado.
Perampanel	Antagonista de receptores AMPA	2012	Utilizado como adjuvante, não deve ser usado para crises de ausência e mioclonias.

Fonte: Adaptado de: (GREENFIELD (2013); LÖSCHER et al. (2013); ROGAWSKI; LÖSCHER (2004))

2.5 ANSIEDADE

Ansiedade é uma emoção natural e rotineira, resultado de um processo evolutivo que visa auxiliar na resiliência do indivíduo em um ambiente hostil (MCNAUGHTON, 2018). Desta forma, níveis normais de ansiedade incitam sinais de alerta que ativam mudanças comportamentais, fisiológicas e cognitivas que permitem que o organismo seja capaz de lidar com situações novas (FEDOCE et al., 2018). Porém, quando esta resposta ocorre em situações inapropriadas, em um grau exagerado, entende-se que há uma má adaptação desta resposta ao ambiente e então a ansiedade se torna patológica (STEIN; STECKLER, 2010).

Durante o século XVIII, especialistas descreviam transtornos de ansiedade como “ansiedade fora do normal”, “panofobia” (medo de tudo), “transtornos nervosos” e “neuroses” (STEIN; HOLLANDER; ROTHBAUM, 2010). A classificação da ansiedade como um transtorno psiquiátrico é relativamente recente, sendo oficialmente caracterizada como tal no século XX (CROCQ, 2015). Transtornos de ansiedade são diagnosticados utilizando qualquer um dos dois sistemas: (1) Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), o qual inclui como transtornos de ansiedade, pânico, fobia simples, ansiedade social, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, entre outros; (2) ICD-10, que separa transtornos do pânico dos transtornos de ansiedade (WHO, 2010). A atualização mais recente do DSM, o DSM-5 traz a seguinte descrição dos transtornos de ansiedade:

“Transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionados. Medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura. Esses dois estados se sobrepõem, mas também se diferenciam, com o medo sendo com mais frequência associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato, e a ansiedade sendo mais frequentemente associada à tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquivas. [...] O transtorno de ansiedade generalizada é caracterizado por ansiedade e preocupação excessivas (expectativa apreensiva), ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses, com diversos eventos ou atividades (tais como desempenho escolar ou profissional) e o indivíduo considera

difícil controlar a preocupação” (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Os transtornos de ansiedade têm grande potencial de cronicidade, afetam indivíduos jovens e são os tipos mais comuns e prevalentes de doenças psiquiátricas (STEIN; STECKLER, 2010; WHO, 2018). Estimativas demonstram que cerca de 10% da população irá experimentar algum tipo de transtorno de ansiedade durante sua vida (MURROUGH et al., 2015). Estes distúrbios tem um efeito debilitante no indivíduo, levando a uma diminuição significativa na qualidade de vida (WITTCHEN; JACOBI, 2005). Uma grande parcela de portadores de transtornos de ansiedade é não tratada ou demora a procurar tratamento devido a barreiras econômicas, incerteza de onde procurar ajuda e estigma social (OLFSON et al., 2000; RAPAPORT et al., 2005). Os transtornos de ansiedade são frequentemente relatados como comorbidades em pacientes portadores de epilepsia, promovendo uma piora ainda maior na qualidade de vida destes indivíduos (KANNER, 2011; KWON ; PARK, 2014). A prevalência dos transtornos de ansiedade em pacientes epiléticos pode chegar ao dobro da prevalência em não-epiléticos (KANNER, 2011).

Ao longo dos anos, estudos tem elucidado as estruturas cerebrais responsáveis pela resposta de ansiedade. As regiões-chave envolvidas na resposta mal adaptativa nos transtornos de ansiedade incluem o hipocampo, a amígdala, o núcleo leito da estria terminal, o córtex pré-frontal ventromedial, orbitofrontal, dorsomedial e dorsolateral e a ínsula anterior. Ainda, o córtex cingulado, que é altamente conectado com as regiões anteriormente citadas, apresenta alterações funcionais e estruturais em pacientes com ansiedade (GRUPE; NITSCHKE, 2013). Recentemente, um estudo demonstrou que o cerebelo faz conexões com áreas cerebrais envolvidas na expressão do medo e ansiedade e este órgão tem participação funcional em tais comportamentos (MORENO-RIUS, 2018). Uma das regiões mais estudadas no que se refere aos comportamentos de medo e ansiedade é a amígdala. O silenciamento da atividade da amígdala basolateral reduz o estresse crônico em roedores (TRIPATHI et al., 2019). O hipocampo é uma estrutura crítica para os processos cognitivos, como memória e percepção espacial, e está altamente envolvido nos comportamentos de medo e ansiedade. A região hipocampal CA1 ventral é rica em células que são recrutadas para a expressão do comportamento de esquiva e são particularmente ativadas (aumento na mobilização do cálcio citosólico) por ambientes ansiogênicos (JIMENEZ et al., 2018).

Ainda, existe a participação hormonal envolvida na resposta ansiosa. Quando o indivíduo experimenta a sensação de perigo iminente ou antecipa o perigo, o eixo hipotálamo-

pituitária-adrenal estimula a produção e liberação de glicocorticoides (hormônios do estresse). Essas moléculas são responsáveis pela resposta de “luta ou fuga”, ou seja, preparam o organismo para lidar com situações que ameaçam seu bem-estar (GRUPE; NITSCHKE, 2013). Desta forma, um fármaco que modifique/atenuar qualquer destes processos envolvidos na resposta ansiosa é capaz de reduzir a expressão patológica da ansiedade. Além do uso da psicoterapia (FULTON et al., 2018), os tratamentos farmacológicos para os transtornos de ansiedade incluem: os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) e os inibidores da recaptação de serotonina/norepinefrina (ISRN). Ambas classes medicamentosas figuram como tratamentos de primeira linha. Ainda, os benzodiazepínicos, alguns fármacos antidepressivos e a buspirona compõem o arsenal medicamentoso utilizado na clínica para o tratamento da ansiedade (ver Tabela 7).

Tabela 7. Fármacos atualmente prescritos para o tratamento de transtornos de ansiedade.

Classe farmacológica	Fármaco	Alvo molecular	Indicação	Dose diária (mg)	Efeitos adversos comuns
ISRS	Escitalopram	SERT	TAG	10 - 20	Náusea, diarreia, cefaléia, insônia, sonolência, disfunção sexual
	Fluoxetina	SERT	TOC, TP	20 - 60	
	Fluvoxamina	SERT	TOC, TAS	100 - 300	
	Paroxetina	SERT	TAG, TOC, TP, TEPT, TAS	20 - 50	
	Sertralina	SERT	TOC, TP, TEPT, TAS	50 - 200	
IRSN	Duloxetina	SERT, NET	TAG	60 - 120	
	Venlafaxina	SERT, NET	TAG, TP, TAS	75 - 225	
BDZ	Alprazolam	Receptor GABA _A	Ansiedade (n.e.), TP	1 - 4	Sonolência, disfunção cognitiva, mudanças de apetite, fadiga
	Clordiazepóxido	Receptor GABA _A	Ansiedade (n.e.), TP	15 - 40	
	Clonazepam	Receptor GABA _A	Ansiedade (n.e.)	1 - 4	
	Diazepam	Receptor GABA _A	Ansiedade (n.e.)	2 - 10	
	Lorazepam	Receptor GABA _A	Ansiedade (n.e.)	1 - 6	
ADT	Oxazepam	Receptor GABA _A	Ansiedade (n.e.)	30 - 120	Boca seca, constipação, retenção urinária, sonolência, tontura, ganho de peso, disfunção sexual
	Clomipramina	SERT, NET, mACh, α 1R, H1R	TOC, TP	25 - 250	
	Doxepina	SERT, NET, mACh, α 1R, H1R	Ansiedade (n.e.)	75 - 300	
IMAO	Imipramina	SERT, NET, mACh, α 1R, H1R	TP	100 - 200	Sedação, boca seca, tontura, cefaléia
	Fenelzina	MAO	TP	45 - 90	
ti-histaminico	Hidroxizina	Receptor H1	Ansiedade (n.e.)	200 - 400	Náusea, tontura, cefaléia
Outros	Buspirona	Receptor 5-HT _{1A}	Ansiedade (n.e.)	20 - 60	cefaléia

antidepressivo tricíclico; α 1R: receptor α 1-adrenérgico; BDZ: benzodiazepínicos; TAG: transtorno de ansiedade generalizada; H1R: receptor de histamina 1; MAO: monoamina oxidase; IMAO: inibidor da MAO; IRSN: inibidor da recaptação de serotonina e norepinefrina; ISRS: inibidor seletivo da recaptação de serotonina; mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina; n.e.: não específico; NET: transportador de norepinefrina; TEPT: transtorno do estresse pós-traumático; TOC: transtorno obsessivo-compulsivo; TP: transtorno do pânico; SERT: transportador de serotonina; TAS: transtorno de ansiedade social.

Tais substâncias, mesmo os fármacos de primeira escolha, induzem uma série de efeitos adversos e, portanto, a pesquisa por novas terapias é altamente incentivada. Até o ano de 2015, alguns fármacos, na maioria já aprovados para o tratamento de outros transtornos mentais, estariam em fase de estudo clínico para uma potencial aplicação da terapia da ansiedade (Tabela 8). Além disso, muitos pacientes fazem uso de terapias complementares como a utilização de produtos naturais, entre eles os OEs para atenuar e/ou prevenir os sintomas dos transtornos de ansiedade (SAVAGE; FIRTH, 2018; WANG; HEINBOCKEL, 2018) (ver sessão ‘2.1.3 Propriedades ansiolíticas dos OEs’).

Tabela 8. Fármacos em fase de estudo clínico para o tratamento de transtornos de ansiedade.

Fármaco	Mecanismo de ação: alvo molecular	Indicação	Fase do estudo (até 2015)
Vortioxetina	SERT, agonismo 5-HT1A, 5HT1B; antagonismo 5HT1D, 5-HT3 E 5HT7	TAG	Fase III
Vilazodone	SERT, agonismo parcial 5-HT1A	TAG	Fase III
PRX-03140	Agonismo parcial 5-HT4	TEPT	Fase II
Agomelatina	Agonismo do receptor M1 e M2, antagonismo do receptor 5HT2C	TAG, TOC	Fase III (TAG), II (TOC)
Guanfacine	Agonismo do receptor α_2	TAG, TAS	Fase II
Nepicastat	Inibição dopamina β -hidroxilase	TEPT	Fase II
Aripiprazol	Agonismo parcial D2, antagonismo 5HT2A	TEPT	Fase II
Brexpiprazol	Agonismo parcial de receptores D2 e D4	TEPT	Fase III
Pregabalina	Inibição de canal de cálcio voltagem-dependente	TAS	Fase III
Cetamina	Antagonismo do receptor NMDA	TEPT	–
Ganaxolona	Modulação alostérica positiva do receptor GABA _A	TEPT	Fase II
Itriglumida	Antagonismo do receptor de colecistocinina	TAG, TP	Fase II
Verucerfont	Antagonismo do fator de liberação de corticotrofina	TEPT	Fase II

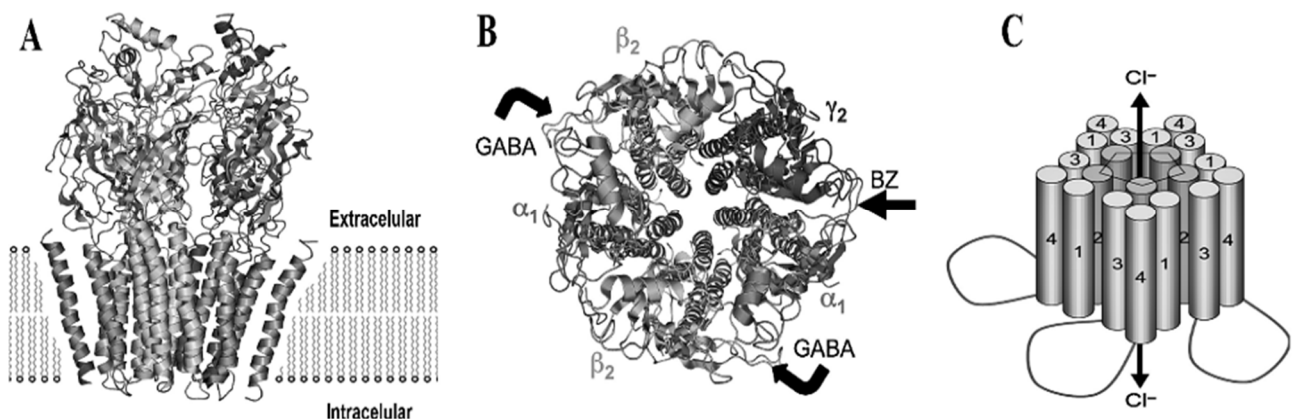
5-HT: 5-hidroxi-triptamina; ASG: antipsicótico de segunda geração; α : adrenérgico TAG: transtorno de ansiedade generalizada; TEPT: transtorno do estresse pós-traumático; TOC: transtorno obsessivo-compulsivo; TP: transtorno do pânico; SERT: transportador de serotonina; TAS: transtorno de ansiedade social.

2.6 RECEPTORES GABA_A

O ácido gama-amino butírico (GABA) é sintetizado a partir do ácido glutâmico pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (CHIKHALE et al., 2012). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, regula a transmissão neuronal através da ação nos receptores GABAérgicos, os quais encontram-se distribuídos em basicamente três subtipos GABA_A, GABA_B e GABA_C (KUMAR; KUPPAST, 2012). A ação lenta e prolongada deste neurotransmissor é mediada pelos receptores GABA_B (metabotrópico, acoplado à proteína G), cuja ativação inibe a adenilatociclase, diminui a condutância de íons cálcio e fosforila canais de potássio levando a despolarização neuronal (GAO et al., 2007). Já a ação inibitória rápida do GABA é mediada via ativação dos receptores ionotrópicos do tipo GABA_A no encéfalo e GABA_C na retina (COSTA et al., 2002).

Os receptores GABA_A (Figura 6) pertencem à superfamília de receptores ‘*cys-loop*’ (caracterizados por possuírem dois resíduos de cisteína separados por uma cadeia curta de aminoácidos), juntamente com os receptores glicinérgicos, colinérgicos nicotínicos e serotoninérgicos 5-HT₃ (KNOFLACH; HERNANDEZ; BERTRAND, 2016). Estes receptores são amplamente expressos no tecido nervoso e constituem-se de um canal iônico regulado por ligante. Após a ligação do neurotransmissor GABA em seu sítio extracelular, o poro deste canal se abre e permite o livre fluxo dos ânions cloreto (Figura 6, C) e bicarbonato.

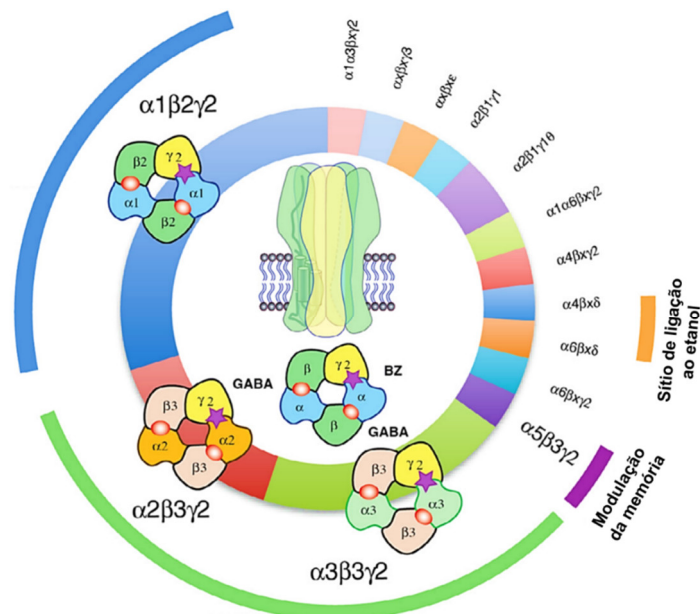
Figura 6. Modelo do receptor GABA_A na membrana plasmática. A topologia do receptor em vista lateral (A) e de cima (B) mostra a distribuição espacial do pentâmero. O sítio de ligação para o GABA é indicado entre as subunidades α e β (flechas dobradas) e para os benzodiazepínicos (BZ) entre as subunidades α e γ (flecha reta). (C) Arranjo esquemático das cinco subunidades formando o pentâmero com um poro central



Fonte: Adaptado de GREENFIELD (2013).

Na ausência de um ligante ortostérico, os receptores GABA_A permanecem em estado fechado impossibilitando a passagem desses ânions (KAILA et al., 1989; MIHIC; HARRIS, 1997; SIGEL; STEINMANN, 2012). O receptor GABA_A teve sua estrutura peptídica e topologia completa determinada em 1987 por Schofield e colaboradores (SCHOFIELD et al., 1987) e desde então outros estudos vieram a complementar a elucidação deste receptor em termos de estrutura e função (FAHEEM et al., 2014; JOHNSTON 1996; JOHNSTON, 2005; MIHIC; HARRIS, 1997; OLSEN; TOBIN, 1990; SIGEL; STEINMANN, 2012). Os receptores GABA_A são proteínas transmembranares (Figura 6,A) compostos por diferentes subunidades, α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ e π e ρ (BRAAT; KOOY, 2015). Até o momento são descritos no genoma de mamíferos 19 genes que codificam para essas subunidades. Seis genes codificam para as subunidades α , três para as subunidades β , três para as subunidades γ , um gene para δ e ϵ , respectivamente, e os restantes codificam para as subunidades θ e π e ρ (KNOFLACH; HERNANDEZ; BERTRAND, 2016). Um receptor funcional deve resultar da união de cinco subunidades, como esquematizado na Figura 7.

Figura 7- Diferentes arranjos das subunidades do receptor GABA_A e suas funções. Proporções relativas da expressão dos diferentes arranjos são mostradas por demarcações no círculo central e o sítio de ligação aos benzodiazepínicos (BZ) é indicado pela estrela em cor roxa.



Fonte: Adaptado de KNOFLACH; HERNANDEZ; BERTRAND (2016).

Cada subunidade do receptor permeia quatro vezes a membrana plasmática e contribui igualmente para a formação do poro. A maioria dos receptores GABA_A são constituídos de no

mínimo duas subunidades diferentes, sendo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ a principal configuração expressa no encéfalo em uma estequiometria 2:2:1. Adicionalmente, as funções fisiológicas e farmacológicas deste receptor vão depender dos tipos de subunidade que ele é composto enquanto que a expressão das subunidades é dependente do tipo de tecido, célula e estágio de desenvolvimento (GREENFIELD, 2013; JOHNSTON, 2005; KNOFLACH; HERNANDEZ; BERTRAND, 2016; MIHIC; HARRIS, 1997). Algumas subunidades do receptor GABA_A têm grande importância na fisiopatologia, bem como no tratamento de diversas doenças neurológicas e a Tabela 9 traz as principais subunidades associadas a transtornos como epilepsia e ansiedade.

Tabela 9. Subunidades do receptor GABA_A associadas a doenças neurológicas

Subunidade	Função/ modulação	Referência
$\alpha 1$	Codificada pelo gene GABRA1. Sítio de ligação aos benzodiazepínicos/ Modulado pelo FMZ. Subunidade mais abundante. Expressão diminuída pelo consumo crônico de etanol. Mutações neste gene estão ligadas a diferentes tipos de epilepsia. Alteração desta subunidade modula o tempo de sono induzido pelo midazolam. Animais nocaute para este gene apresentam níveis maiores de ansiedade.	(CHOI et al., 2015; DEVAUD et al., 1997; JOHANNESSEN et al., 2016; LUND et al., 2008; YE et al., 2010)
$\alpha 2$	Codificada pelo gene GABRA2. Sítio de ligação aos benzodiazepínicos/ Modulado pelo FMZ. Mutações neste gene estão envolvidas em epilepsias. Medeia os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos. Agonistas específicos desta subunidade tem menor probabilidade de induzir tolerância. Subunidade envolvida na regulação de comportamentos emocionais e dor crônica. Alvo terapêutico para o tratamento da ansiedade, depressão e esquizofrenia.	(BHAT et al., 2018; ENGIN; LIU; RUDOLPH, 2012; MAY et al., 2018; ORENSTEIN et al., 2018)
$\alpha 3$	Codificada pelo gene GABRA3. Sítio de ligação aos benzodiazepínicos/ Modulado pelo FMZ. Medeia os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos. Mutações neste gene estão associadas à epilepsia.	(BHAT et al., 2018; ENGIN; LIU; RUDOLPH, 2012; MAY et al., 2018; NITURAD et al., 2017; RUDOLPH; KNOFLACH, 2011)
$\beta 1$	Codificada pelo gene GABRB1. Mutações neste gene estão associadas a epilepsias. Envolvida em processos de sedação e anestesia.	(BHAT et al., 2018; JANVE et al., 2016; YANOVSKY et al., 2012)
δ	Codificada pelo gene GABRD. Sítio extrassináptico/ Insensível FMZ. Envolvida na tolerância e dependência induzida pelo etanol. Animais nocaute para esta subunidade apresentam um aumento no comportamento de medo contextual e maior susceptibilidade a crises epiléticas.	(ADAM et al., 2011; HOOPER; PARACHA; MAGUIRE, 2018; RAVINDRAN; STEIN, 2010; ZHANG et al., 2017)
$\gamma 2$	Codificada pelo gene GABRG2. Sítio de ligação aos benzodiazepínicos. Crítica para o tráfego, agrupamento e manutenção sináptica do receptor. Diminuição da expressão deste gene está associada a epilepsias.	(BHAT et al., 2018; FARRANT; NUSSER, 2005; SAARI et al., 2011; SCHIPPER et al., 2015; WEI et al., 2017)

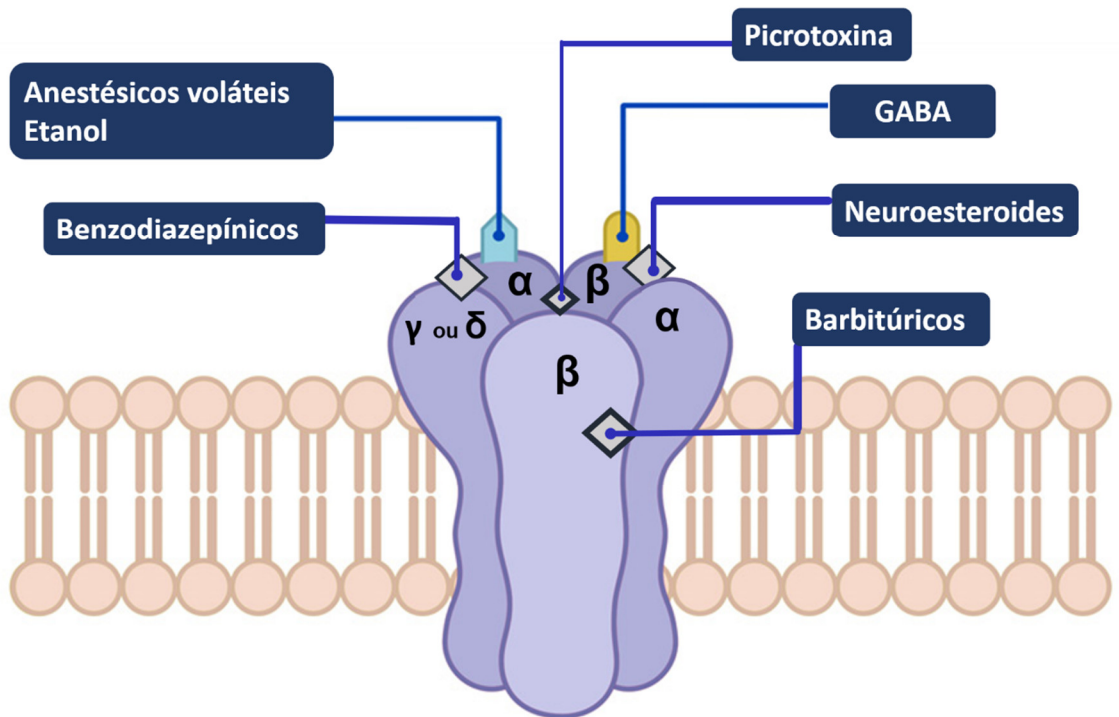
Os receptores GABA_A medeiam dois tipos de neurotransmissão inibitória: a inibição fásica e a tônica. A inibição fásica é caracterizada por correntes rápidas e de curta duração, desencadeadas pela ativação de receptores localizados em áreas sinápticas (constituídos em sua maioria por subunidades $\alpha\beta\gamma$ em estequiometria 2:2:1). Tais receptores estão sujeitos a altas concentrações do neurotransmissor (faixa de milimolar) e por consequência são mais propensos à dessensibilização (FARRANT; NUSSER, 2005). Por outro lado, a inibição tônica é persistente e mediada por receptores extrassinápticos (constituídos por subunidades $\alpha\beta\delta$ em estequiometria 2:2:1). Estes receptores estão expostos a concentrações basais de GABA, pelo qual exibem alta afinidade, e estão menos sujeitos à dessensibilização (PAVLOV; WALKER, 2013; SCHIPPER et al., 2015). Estes dois tipos de inibição mediadas pelos receptores GABA_A contribuem para a prevenção da hiperexcitação neuronal, evitando o desenvolvimento de atividade sináptica anormal (FARRANT; NUSSER, 2005). O distúrbio do equilíbrio entre excitação e inibição no SNC está implicado na patogênese de várias doenças neuropsiquiátricas, como por exemplo autismo, Alzheimer, ansiedade e epilepsia (BRAAT; KOOY, 2015; JEMBREK; VLAINIC, 2015).

2.6.1 Receptores GABA_A: modulação farmacológica

Além do GABA, outras substâncias endógenas ligam-se aos receptores GABAérgicos, a exemplo dos neuroesteroides e do endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol (modulador alostérico) (JEMBREK; VLAINIC, 2015). Ligam-se também a este receptor os fármacos benzodiazepínicos, barbitúricos, anestésicos voláteis, etanol, neurosteroides (Figura 8). Outros ligantes incluem os agonistas zolpidem, etomidato, muscimol e os antagonistas bicuculina, pentilenotetrazol e picrotoxina (FROLUND et al., 2002; SIGEL; STEINMANN, 2012). Substâncias que ligam no sítio benzodiazepínico apenas modulam a resposta do receptor ao GABA, enquanto que ligantes dos sítios dos barbitúricos, neuroesteroides e anestésicos voláteis são capazes de ativar o receptor na ausência de GABA (GARCIA; KOLESKY; JENKINS, 2010; SIEGHART; SPERK, 2002). O fármaco flumazenil, considerado um antagonista competitivo do sítio benzodiazepínico, liga-se a este sítio sem afetar a função do receptor e é utilizado como antídoto para intoxicação com benzodiazepínicos (BRAAT; KOOY, 2015; SHANNON et al., 1997). Além, disso o flumazenil é uma ferramenta útil no ambiente científico, pois permite, através de ensaios farmacológicos, identificar o mecanismo de ação de diferentes moléculas que por sua vez se ligam ao sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A

(COSTA, J. P. et al., 2013; HALL et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2018)

Figura 8- Representação esquemática do receptor GABA_A e alguns de seus ligantes



Fonte: Adaptado de (CHAGRAOUI et al. (2016); GREENFIELD (2013); JOHNSTON, (2005)).

A ativação dos receptores GABA_A resulta em efeitos ansiolítico, sedativo, hipnótico, miorelaxante, anestésico e pode produzir amnésia anterógrada. Entretanto, esses efeitos não são necessariamente concomitantes e são dependentes do tipo de subunidade ativada. Já o antagonismo dos receptores GABA_A leva ao aumento da vigília, ansiedade e crises epiléticas (bloqueio do canal) (JEMBREK; VLAINIC, 2015). Portanto, a modulação destes receptores é um alvo para o tratamento da ansiedade, insônia e epilepsia.

2.6.2 Receptores GABA_A e epilepsia

Mutações, diminuição ou perda de função dos receptores GABA_A ou ainda danos/ morte de neurônios inibitórios GABAérgicos têm sido implicados no processo de epileptogênese e na alteração no tráfego desses receptores, o que culmina no prolongamento de crises epiléticas em animais (BANNAI et al., 2015; STALEY, 2015). Adicionalmente, antagonistas deste

receptor, como a picrotoxina, bicuculina e pentilenotetrazol são reconhecidos como indutores de crises epiléticas em animais experimentais (LÖSCHER et al., 2013). Aliado a isto, o aumento farmacológico do tônus inibitório mediado pelos receptores GABA_A é o mecanismo de ação de vários fármacos antiepiléticos (ver Tabela 6).

A ação de fármacos agonistas do receptor GABA_A intensifica sua sinalização inibitória, reduzindo a probabilidade de que um evento despolarizante ocorra (FARRANT; NUSSER, 2005). O efeito anticonvulsivante resultante desses fármacos se dá, portanto, pela estabilização das correntes excitatórias, evitando assim os disparos sincronizados característicos de crises epiléticas (GREENFIELD, 2013; KWAN; BRODIE, 2004). Adicionalmente, a hiperpolarização resultante da ativação de receptores GABA_A pós-sinápticos inibe a entrada de cálcio para o meio intracelular através dos canais de cálcio voltagem-dependentes. (GREENFIELD, 2013; MICELI et al., 2015; ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004; TRITSCH; GRANGER; SABATINI, 2016). Esta inibição evita a excitotoxicidade induzida pelo excesso de Ca⁺² intracelular, observada em condições patológicas (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003). Embora a elevação fisiológica dos níveis citosólicos de Ca⁺² seja essencial para diversas funções, o seu excesso em compartimentos intracelulares pode induzir processos apoptóticos. Adicionalmente, elevações no Ca⁺² intracelular estão intimamente ligadas aos eventos que geram crises epiléticas (KULAK et al., 2004; STEINLEIN, 2014).

O diazepam começou a ser utilizado no tratamento de crises epiléticas em humanos (GASTAUT et al., 1965) seguido pelo clonazepam e clobazam (menor efeito sedativo) para o mesmo fim (CHAPMAN; HORTON; MELDRUM, 1978). Os fármacos benzodiazepínicos são efetivos na prevenção de crises epiléticas na maioria dos modelos experimentais, principalmente em modelos de crises induzidas pelo pentilenotetrazol (GREENFIELD, 2013). Na clínica, fármacos desta classe são amplamente utilizados, principalmente no uso hospitalar, a exemplo do midazolam, lorazepam e diazepam (tratamento de epilepsia infantil) (ZHAO et al., 2016).

O fenobarbital (Tabela 6), tem alta eficácia clínica frente a crises convulsivas. Entretanto, induz alguns efeitos adversos, como sedação, déficit cognitivo e hiperatividade em crianças e por isso teve seu uso diminuído em favor de terapias mais modernas (KWAN; BRODIE, 2004). Apesar disso, no Brasil ainda é um antiepilético prescrito e de uso recomendado no sistema público de saúde (RENAME, 2014). A galaxona, derivado sintético do neuroesteroide alopregnanolona, se mostra eficaz na prevenção de crises e com poucos efeitos colaterais em humanos. Este fármaco tem utilidade principalmente em mulheres com

epilepsia catamenial (GREENFIELD, 2013; MONAGHAN; MCAULEY; DATA, 1999). Outros fármacos antiepiléticos, cujo mecanismo de ação se dá pelo aumento do tônus GABAérgico, incluem o topiramato, ezogabina, losigamona, ácido valpróico, tiagabina e vigabatrina (ver Tabela 6). Apesar do grande arsenal de fármacos antiepiléticos disponíveis, ainda se busca novas alternativas para o tratamento desta doença, inclusive utilizando os receptores GABA_A como alvo de ação (KNOFLACH; HERNANDEZ; BERTRAND, 2016). Isso se deve ao fato de que nem todos os tipos de epilepsias são completamente tratáveis, do grande número de pacientes refratários às terapias não-convencionais e dos efeitos colaterais provocados pela maioria dos fármacos em uso (CHONG; LERMAN, 2016; GAO; LI, 2016; OCHOA; KILGO, 2016; SORENSEN; KOKAIA, 2012).

A pesquisa por novos agentes antiepiléticos tem levado ao estudo de produtos naturais com propriedades anti- crise. Dentre o grande portfólio de moléculas encontradas na natureza, estudos envolvendo substâncias que modulam positivamente os receptores GABA_A têm sido bastante promissores em destacar potenciais agentes terapêuticos (JOHNSTON, 2005; JOHNSTON et al., 2006). Produtos naturais que influenciam a função GABAérgica podem ser encontrados em bebidas como chás (de plantas com propriedades sedativas) e vinho e em preparações fitoterápicas, já disponíveis no mercado (DEHKORDI et al., 2017; DOBETSBERGER, C.; BUCHBAUER, 2011; KESSLER et al., 2012; SAVAGE; FIRTH, 2018; WANG; HEINBOCKEL, 2018). Adicionalmente, uma fonte rica em moléculas que modulam receptores GABA_A é encontrada em OEs de plantas, como já discutido anteriormente nesta tese. Dentro deste contexto, a busca por novas moléculas que inibam ou atenuem crises epiléticas e que possuam um potencial terapêutico interessante para o tratamento da epilepsia pode encontrar sucesso com substâncias que sabidamente diminuem a excitabilidade no SNC.

2.6.3 Receptores GABA_A e ansiedade

A razão de tantas moléculas moduladoras dos receptores GABA_A atuarem terapêuticamente numa variedade de transtornos mentais, é devido a estes receptores terem papel crucial na regulação de diversos processos neurofisiológicos como cognição, dor, sono e ansiedade (SAVAGE; FIRTH, 2018). O mau funcionamento cognitivo e neurofisiológico encontrado nos transtornos de ansiedade decorre dentre outros fatores, do desequilíbrio dos estímulos inibitórios e excitatórios nas vias de sinalização do sistema límbico e regiões pré-frontais do encéfalo (ETKIN; WAGER, 2007). O sistema GABAérgico age como o grande

“freio” da transmissão nervosa (JEMBREK; VLAINIC, 2015) e desta forma, alterações na arquitetura deste sistema podem facilitar os transtornos de ansiedade (BRAAT; KOOY, 2015).

De fato, já foi demonstrado que os sintomas dos transtornos de ansiedade resultam de um prejuízo no funcionamento da inibição mediada pelo sistema GABAérgico (MOHLER, 2006). Experimentos em animais utilizando a deleção de genes responsáveis pela expressão de diferentes subunidades do receptor GABA_A sugerem que os receptores que contém a subunidade $\alpha 2$ são especialmente relevantes para a manifestação da ansiedade. Ainda, os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos são mediados pelas subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do receptor GABA_A (LOW et al., 2000). Portanto, moléculas que tenham como alvo a subunidade $\alpha 2$ são promissoras para o tratamento de transtornos de ansiedade, uma vez que já foi demonstrado que agonistas específicos GABA_A/ $\alpha 2$ tem menor probabilidade de induzir tolerância, efeito visto com frequência no uso crônico de benzodiazepínicos clássicos (ENGIN; LIU; RUDOLPH, 2012).

Como já comentado na seção 2.5, a amígdala é uma estrutura altamente participativa nos processos de expressão dos comportamentos ansiosos e de medo (TRIPATHI et al., 2019). Mais especificamente, o núcleo central da amígdala, o qual constitui a principal via eferente desta estrutura, envia projeções neuronais GABAérgicas para o hipotálamo e tronco encefálico, modulando as manifestações somáticas da ansiedade (NUSS, 2015). A adição de GABA ou agonistas de receptores GABA_A diretamente na amígdala atenua comportamentos relacionados à ansiedade em animais experimentais, enquanto a adição de antagonistas destes receptores tende a induzir efeitos ansiogênicos (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009). Ainda, o bloqueio da expressão da enzima ácido-glutâmico descarboxilase (GAD) na amígdala diminui a resposta ansiolítica aos benzodiazepínicos (HELDT; MOU; RESSLER, 2012). Portanto, tanto a ação endógena do neurotransmissor GABA quanto de agonistas de receptores GABA_A sobre esta estrutura levam a uma inibição de respostas ansiosas (SANDERS; SHEKHAR, 1995). Estudos mostram que, não só na amígdala, mas uma redução da expressão de receptores GABA_A em todo o encéfalo é detectada em pacientes com transtornos do pânico e de ansiedade generalizada (MALIZIA et al., 1998). Estes resultados encontrados em pacientes foram reproduzidos em modelos animais (CRESTANI et al., 1999), confirmando que o déficit de receptores GABA_A pode ser considerado um fator predisponente para transtornos de ansiedade em humanos (MOHLER, 2006).

2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS

2.7.1 Modelo de crises epilépticas induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)

O modelo de crises epilépticas induzidas pelo PTZ foi introduzido na pesquisa científica em 1945 por Everett e Richards (EVERETT; RICHARDS, 1945) e ainda é amplamente utilizado no estudo da fisiopatologia das crises convulsivas e na pesquisa de fármacos que diminuam a suscetibilidade a essas crises (KANDRATAVICIUS et al., 2014; LÖSCHER, 2011; LÖSCHER et al., 2013). O mecanismo de ação do PTZ baseia-se na diminuição da função GABAérgica. O PTZ é um antagonista do receptor pós-sináptico GABA_A, ligando-se ao sítio da picrotoxina, porém em um domínio distinto (HANSEN; SPERLING; SANCHEZ, 2003). O bloqueio do receptor pelo PTZ promove uma redução dos efeitos endógenos do GABA, seguido de um estado de hiperexcitabilidade do SNC. Esses eventos resultam em crises epilépticas de gravidade variada, conforme a dose de PTZ administrada (CREMER et al., 2009; HANSEN; SPERLING; SANCHEZ, 2003; MACDONALD; BARKER, 1978; REHAVI; SKOLNICK; PAUL, 1982; SQUIRES et al., 1984). As áreas do encéfalo mais intensamente ativadas antes da generalização da crise induzida pelo PTZ são o tálamo, mais especificamente o núcleo talâmico anterior e o córtex retrosplenial (cerca de 15s antes da crise) e o giro dentado (imediatamente antes da crise) (BREVARD et al., 2006). As doses de PTZ comumente encontradas na literatura em modelos animais de crises epilépticas variam entre 30 a 110 mg/kg (ENGEL et al., 2008). A administração de PTZ pode induzir reação de congelamento, espasmos mioclônicos, crises convulsivas clônicas e convulsões tônico-clônicas generalizadas (KANDRATAVICIUS et al., 2014; LÜTTJOHANN; FABENE; VAN LUIJTELAAR, 2009). Em razão do mecanismo de ação do PTZ, o modelo de crises induzidas por este composto é especialmente eficiente em identificar substâncias com atividade anticonvulsivante mediada pela função GABAérgica. (MANDHANE; AAVULA; RAJAMANNAR, 2007). Ainda, este modelo também identifica eficientemente substâncias que atuam em canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo T (WHITE et al., 1995).

Vários fármacos hoje utilizados na clínica possuem correlação com o ensaio de modelo agudo de crises epilépticas induzidas pelo PTZ, a exemplo da etossuximida, valproato, fenobarbital, benzodiazepínicos e gabapentina (CARLINI; MENDES, 2011), entre outros (Tabela 10). Algumas das principais vantagens do modelo do PTZ são: o curto período de latência para crise generalizada tônico-clônica; a mínima degeneração neuronal e alto valor preditivo de eficácia clínica dos fármacos anticonvulsivantes identificados por este modelo; a

simplicidade técnica deste modelo e sua utilidade no ‘*screening*’ de um grande número de substâncias (CREMER et al., 2009).

Tabela 10- Efetividade anticonvulsivante de fármacos antiepiléticos no modelo do PTZ. Onde NE: não efetivo, +: efetivo e ±: pouco efetivo

Fármaco/ Mecanismo de ação	Efetividade em camundongos
<i>Atividade em canais de Na⁺ e Ca⁺²</i>	
Fenitoína	NE
Carbamazepina	NE
Oxcarbazepina	NE
Lamotrigina	±
Zonisamida	±
Lacosamida	NE
<i>Atividade em canais de Ca⁺²</i>	
Etosuximida	±
Pregabalina	NE
<i>Modulação GABAérgica</i>	
Benzodiazepínicos	+
Vigabatrina	+
Tiagabina	+
<i>Mecanismo de ação misto</i>	
Valproato	+
Felbamato	+
Topiramato	NE
Fenobarbital	+
Gabapentina	±
<i>Outros mecanismos</i>	
Levetiracetam	NE
Retigabina	+

Fonte: Adaptado de LÖSCHER, (2011); ROGAWSKI; LÖSCHER, (2004).

O critério de caracterização dos efeitos induzidos pelo PTZ frequentemente utilizado é a escala de Racine. Esta escala categoriza o comportamento animal durante uma crise epilética relacionando com a atividade eletroencefalográfica (RACINE, 1972). Atualmente, esta escala é utilizada com algumas modificações introduzidas por LÜTTJOHANN; FABENE; VAN LUIJTELAAR (2009), a qual está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11- Escores de intensidade de crises epilépticas segundo a escala de Racine modificada

Escore	Manifestação comportamental
1	Parada repentina ou imobilidade
2	Espasmos faciais e/ou da boca
3	Espasmos de cabeça/ pescoço
4	Convulsão clônica generalizada em posição sentada
5	Convulsão clônica ou tônico-clônica generalizada em posição deitada sobre o ventre
6	Convulsão clônica ou tônico-clônica generalizada em posição deitada de lado ou com salto

2.7.2 Modelos de avaliação de comportamento tipo-ansioso

A resposta de ansiedade é uma resposta subjetiva inerente à espécie humana com um componente neuroquímico e um componente emocional. Desta forma, para se referir à resposta de animais experimentais frente a um estímulo que desencadeia a ansiedade utiliza-se termos como resposta “tipo-ansiosa” e efeito “tipo-ansiolítico” (CARLINI; MENDES, 2011). Humanos ansiosos apresentam medo/aversão à altura e espaços abertos e estes comportamentos são homólogos em roedores, os quais apresentam aversão à grandes espaços abertos numa forma de defesa contra possíveis predadores. Desta forma, a maioria dos modelos experimentais para avaliação do comportamento tipo-ansioso de roedores explora a tendência do animal em permanecer em espaços fechados e/ou mais escuros ou próximo às paredes de um determinado aparato (tigmotaxia). Aqui, iremos tratar de dois testes: o teste do Campo Aberto (*Open field*) e o teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*).

2.7.2.1 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto é um dos modelos mais antigos de avaliação da emocionalidade em animais, proposto por Hall em 1934 (HALL, 1934). Este teste é há muitos anos considerado confiável, de forma que sua popularidade é alta dentro da pesquisa pré-clínica. Diferentes versões do teste podem ser encontradas na literatura, onde se observa diferenças na forma do

campo (circular, quadrado), na cor (geralmente paredes e chão pretos (SESTAKOVA et al., 2013)), na luminosidade utilizada (intensidade acima de 400 lux é utilizada para aumentar a aversão do animal pelo ambiente (RAMOS et al., 2003) e presença ou não de objetos dentro da arena. O teste tem como princípio submeter o animal a um ambiente novo, desconhecido e do qual não é possível escapar devido à presença das paredes do aparato. O comportamento de ansiedade é induzido por dois fatores: o isolamento, pois o animal é separado de seu grupo social e a agorafobia, ou seja, o medo de grandes espaços abertos. Portanto, este teste é útil para avaliar substâncias que diminuem a inibição locomotora/exploratória induzida pelo estresse do campo aberto em roedores (PAWLAK; HO; SCHWARTING, 2008; PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976). O animal é colocado no campo aberto (geralmente no centro) e é permitido a ele explorar a arena por 5 min, tempo majoritariamente utilizado na literatura (SESTAKOVA et al., 2013). Durante o período do teste, o animal é avaliado por observação direta pelo experimentador ou com o auxílio de *softwares* de rastreamento por vídeo. Estes recursos computacionais permitem medir com maior precisão todos os parâmetros ao mesmo tempo dentro de toda a arena ou em zonas específicas. Os principais parâmetros avaliados neste teste incluem: locomoção (distância percorrida e velocidade), o que é útil para avaliar efeitos sedativos (diminuição) ou estimulantes (aumento); tempo que o animal permanece no centro e na periferia da arena; tempo de imobilidade e escore de *freezing*. Ainda, podem ser observados efeitos adversos induzidos por substâncias como sedação e ataxia através de uma análise da atividade locomotora juntamente com parâmetros etológicos, o que aumenta a sensibilidade do teste (DALVI; RODGERS, 1999; GRUNDMANN et al., 2007; RODGERS et al., 1997). Esta abordagem inclui a avaliação da duração e frequência: do comportamento de auto-limpeza (*grooming*) e da exploração da arena. A atividade de autolimpeza é um comportamento inato do animal, observado com frequência em roedores e está envolvido na manutenção da higiene, termorregulação e comunicação social (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Este comportamento pode ser interpretado como reflexo de um estado tranquilo ou não-ansioso quando segue um padrão característico onde o animal procede a limpeza da cabeça progredindo em direção à cauda (KALUEFF et al., 2016). A exploração do ambiente pode ser dividida em comportamento de fuçar (*sniffing*, exploração horizontal) e de levantar sobre as duas patas traseiras (*rearing*, exploração vertical). O comportamento de *rearing* pode ser subdividido em exploração vertical protegida (*protected rearing*: o animal se apoia na parede do aparato) e desprotegida (*unprotected rearing*: o animal se levanta sobre as duas patas traseiras sem se apoiar em nada) (BAILEY; CRAWLEY, 2009; SESTAKOVA et al., 2013). A interpretação do teste deve ser feita cuidadosamente, levando em conta todos os parâmetros avaliados. Por exemplo, um

aumento no tempo em que o animal permanece no centro da arena é indicativo de efeito tipo-ansiolítico quando não há alteração nos parâmetros locomotores, enquanto que a diminuição da exploração e da locomoção podem ser indicativos de efeito sedativo. Este teste é relativamente sensível para detectar o efeito ansiolítico de compostos agonistas do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A e agonistas do receptor 5-HT_{1A} (PRUT; BELZUNG, 2003).

2.7.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste do Labirinto em Cruz Elevado é uma ferramenta bem estabelecida na literatura para a avaliação de comportamentos tipo-ansiosos de roedores e triagem de substâncias com atividade ansiolítica. O teste do labirinto em cruz elevado é frequentemente utilizado em conjunto com o teste do campo aberto. Este teste é baseado no medo inato dos roedores frente a espaços abertos, altos e iluminados e não envolve treinamento prévio nem o uso de estímulos nocivos ao animal (CARLINI; MENDES, 2011; SESTAKOVA et al., 2013). Aplicado pela primeira vez por Handley e Mithani em 1984 a partir de um modelo proposto por Montgomery (1955) e validado mais tarde por Pellow (1985), o labirinto em cruz elevado permite detectar elementos de esquiva passiva e ativa ao mesmo tempo (HANDLEY; MITHANI, 1984; MONTGOMERY, 1955; PELLOW et al., 1985). O equipamento consiste em um labirinto em forma de cruz, elevado aproximadamente a 40-50 cm do chão (para camundongos e ratos, respectivamente). O labirinto para camundongos consiste em dois braços abertos e dois braços fechados por paredes (15 cm de altura) de madeira ou de vidro transparente, como proposto por LISTER (1987), medindo 30 x 5 cm e com uma área central de 5 x 5 cm. O animal pode escolher em permanecer nos braços fechados do equipamento (área protegida) ou nos braços abertos (área desprotegida). Roedores tendem a evitar espaços abertos, especialmente se bem iluminados e mais altos que o chão (BAILEY; CRAWLEY, 2009). Este comportamento de esquiva se correlaciona positivamente com o aumento de indicadores biológicos de estresse, como a corticosterona, em roedores (RODGERS et al., 1999). Assim como o teste do campo aberto, o teste do labirinto em cruz elevado pode ser registrado pela observação do experimentador ou eletronicamente. Os parâmetros mais frequentemente medidos são: número de entradas e tempo que o animal permanece em cada braço e no centro; o número de mergulhos de cabeça (*head-dipping*; abaixamento da cabeça abaixo do nível do chão do equipamento), a exploração da borda dos braços abertos; comportamentos de avaliação de risco, como o número de retorno aos braços fechados (saída do braço fechado com as patas dianteiras e retorno imediato ao braço fechado) e o *stretch-attend posture* (o animal estica a cabeça e ombros pra

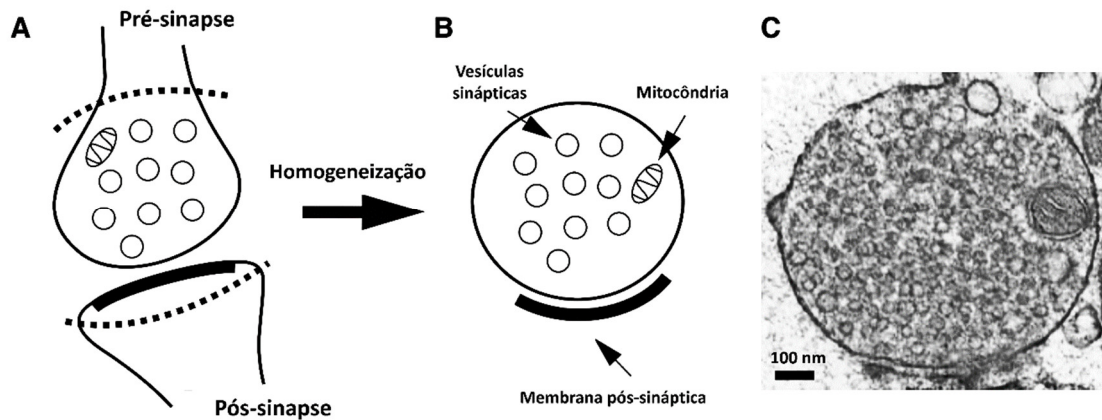
frente e subsequentemente retrai para a posição original) (PARDON et al., 2002). O comportamento de roedores no labirinto pode ser influenciado por manuseio prévio do animal e por exposição repetida ao teste (SESTAKOVA et al., 2013; WALF; FRYE, 2007). Quanto a este aspecto, alguns autores têm proposto um intervalo de três semanas entre os testes com a realização do segundo teste em uma nova sala (ADAMEC; SHALLOW; BURTON, 2005).

Um dos fatores em que a validação deste teste se baseia é a sensibilidade para detectar efeito de fármacos benzodiazepínicos e com frequência o diazepam é utilizado como um controle de efetividade do teste (STEIN; HOLLANDER; ROTHBAUM, 2010; STEIN; STECKLER, 2010). De fato, a administração de fármacos desta classe resulta em um aumento no tempo em que o animal explora os braços abertos do labirinto (DALVI; RODGERS, 1999; LEO; PAMPLONA, 2014). Entretanto, este teste apresenta resultados variáveis para fármacos agonistas do receptor 5-HT_{1A}, os quais têm alta eficácia ansiolítica na clínica (SESTAKOVA et al., 2013; SORREGOTTI et al., 2013; STEIN; HOLLANDER; ROTHBAUM, 2010).

2.7.3 Sinaptossomas

Sinaptossomas constituem-se de uma fração enriquecida de terminais pré-sinápticos (incluindo mitocôndrias e vesículas sinápticas), os quais estão frequentemente ligados a uma fração de membrana pós-sináptica (PHILLIPS et al., 2001). Este modelo *in vitro* mimetiza a função sináptica e é utilizado para estudar eventos envolvendo a elucidação de vias de sinalização que regulam a neurotransmissão, fluxo iônico e interação de proteínas sinápticas com fármacos (DUNKLEY; JARVIE; ROBINSON, 2008; ERECIŃSKA; NELSON; SILVER, 1996; EVANS, 2015). Já é bem descrita na literatura a caracterização dos sinaptossomas em termos de estrutura e funcionalidade (PHILLIPS et al., 2001). Os sinaptossomas contém mitocôndrias, o que possibilita a produção de ATP; proteínas funcionais como canais iônicos, receptores e enzimas; íons e toda a maquinaria molecular necessária para a liberação, captação e estocagem e reciclagem de neurotransmissores (BREUKEL; BESSELSSEN; GHIJSEN, 1997; KAMAT; KALANI; TYAGI, 2014). Entretanto, os sinaptossomas não possuem as estruturas necessárias para síntese proteica fora do complexo mitocondrial (DUNKLEY; JARVIE; ROBINSON, 2008). O primeiro isolamento de sinaptossomas foi descrito por Whittaker em 1959 (WHITTAKER, 1959, 1993) e posteriormente estas estruturas foram caracterizadas por microscopia eletrônica (Figura 9) (BREUKEL; BESSELSSEN; GHIJSEN, 1997).

Figura 8- Esquematização estrutural da sinapse (A) e de um sinaptossoma (B). (C) Microscopia eletrônica de um sinaptossoma isolado.



Fonte: Adaptado de BREUKEL; BESSELEN; GHIJSEN (1997) e EVANS, (2015).

Dentro da estrutura sinaptossomal os gradientes iônicos são conservados (Tabela 12), bem como a atividade da Na^+/K^+ ATPase, cuja função principal é manter o potencial de membrana em homeostase. Assim como no tecido nervoso intacto, sob a aplicação de um estímulo despolarizante (KCl, veratridina ou 4-aminopiridina), ocorre a mudança do potencial de membrana para valores mais positivos, com conseqüente entrada de íons Ca^{+2} no sinaptossoma pelos canais de cálcio voltagem-dependentes, o que induz a exocitose de vesículas sinápticas e a conseqüente liberação de neurotransmissores para o meio (BREUKEL; BESSELEN; GHIJSEN, 1997; VERHAGE et al., 1991).

Tabela 12- Concentração sinaptossomal de diferentes íons.

Íon	Concentração extrassinaptossomal	Concentração intrassinaptossomal
[K]	3,5-5,5 mM	140 mM
[Na]	136-145 mM	10 mM
[Ca ²]	1 mM	100-350 nM
[Mg ²]	1,5 mM	0,8 mM
[H] (pH)	7,05-7,20	7,05-7,20
[Cl ⁻]	110 mM	4 mM

Fonte: ERECIŃSKA; NELSON; SILVER (1996), KUNTZ et al. (2004) e LODISH; BERK; ZIPURSKY (2000).

Os sinaptossomas são preparados através de homogeneização e fracionamento do tecido nervoso e vários métodos já foram descritos para sua obtenção (DUNKLEY; JARVIE; ROBINSON, 2008; EVANS, 2015; NAGY; DELGADO-ESCUETA, 1984). A primeira etapa consiste na homogeneização do tecido fresco (isolado do encéfalo ou de uma região específica) em uma solução isotônica e de osmolaridade apropriada (300-310 mOs). Este procedimento proporciona a separação dos botões/ terminais sinápticos de seus axônios e células gliais (DUNKLEY; JARVIE; ROBINSON, 2008). Na sequência, este homogeneizado é submetido a uma centrifugação e o sobrenadante resultante é novamente centrifugado, dando origem a um precipitado chamado de fração sinaptossomal bruta (EVANS, 2015). Na literatura, vários métodos são descritos para a purificação desta fração bruta, destacando-se a separação em gradiente de sacarose ou dos polímeros Ficoll e Percoll (BREUKEL; BESSELSSEN; GHIJSEN, 1997; KAMAT; KALANI; TYAGI, 2014; NAGY; DELGADO-ESCUETA, 1984; TOWLE; SZE, 1982). Entretanto, o gradiente de Percoll é mais frequentemente empregado devido ao fato de este polímero ser inerte frente ao tecido e da alta pureza dos sinaptossomas obtidos (BREUKEL; BESSELSSEN; GHIJSEN, 1997; EVANS, 2015). Quando em temperatura ambiente, os sinaptossomas começam a degradar ATP rapidamente; entretanto, se mantidos a 4°C em meio apropriado (isotônico e isosmolar), suas funções são preservadas por várias horas. A viabilidade dos sinaptossomas pode ser monitorada pela avaliação da liberação de lactato através do ensaio enzimático da lactato desidrogenase (MORGAN, 1976; NAGY; DELGADO-ESCUETA, 1984).

2.7.4 *Rhamdia quelen* como modelo experimental em farmacologia

A espécie *Rhamdia quelen*, conhecida popularmente como “jundiá”, é encontrada naturalmente na região Sul do Brasil (FRACALOSSO et al., 2004). Seu alto potencial para aquicultura deve-se a sua reprodução simples com alta taxa de crescimento, mesmo nas baixas temperaturas da região. A boa aceitação do sabor de sua carne pelo consumidor faz com que seu mercado preferencial seja a indústria alimentícia (FRACALOSSO; ZANIBONI FILHO; MEURER, 2002). Nos últimos anos, esta espécie vem sendo empregada na pesquisa por anestésicos mais robustos em piscicultura (BARCELLOS, 2001; BARCELLOS; KREUTZ; QUEVEDO, 2006; BARCELLOS et al., 2006; BENOVIĆ et al., 2015; DANIEL et al., 2014; GRESSLER et al., 2012; GRESSLER et al., 2014; BANDEIRA JR et al., 2018; SILVA et al., 2013b; SILVA et al., 2012; TONI et al., 2013). Em decorrência de tais estudos, tem-se feito uso do jundiá como modelo experimental para investigação do potencial sedativo de novas

substâncias (BENOVIT et al., 2015; GARLET et al 2016; HELDWEIN et al., 2012; SILVA et al., 2012). O jundiá, quando na presença de substâncias sedativas e/ou anestésicas, tem um comportamento característico observado em diversos estudos até o momento. São observados estágios de depressão do SNC divididos basicamente em sedação, perda parcial de equilíbrio (animal nada sem postura), perda total de equilíbrio (imobilidade natatória, mas com reação a estímulo de contato) e anestesia propriamente dita (imobilidade sem reação a estímulo externo) (GARLET et al., 2016; GOMES et al., 2011; HELDWEIN et al., 2014; SILVA, L. L. et al., 2013b). Portanto, a utilização do jundiá como modelo experimental em farmacologia se torna uma alternativa para ‘*screenings*’ de novas substâncias com atividade depressora do SNC.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 HIPÓTESES

O presente estudo se baseia nas hipóteses de que: (+)-deidrofuquinona (DHF), (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL), (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-epóxido de deidrofuquinona (DFX), isolados do óleo essencial de *Nectandra grandiflora*, diminuam a excitabilidade do Sistema Nervoso Central via interação com mecanismos GABAérgicos.

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito depressor do Sistema Nervoso Central e os mecanismos de ação de sesquiterpenoides isolados de *Nectandra grandiflora* Nees, utilizando diferentes modelos experimentais.

3.2.1 Objetivos específicos

-Isolamento dos sesquiterpenoides (+)-deidrofuquinona (DHF), (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL), (+)-eremofil-11-en-10-ol (ERM) e (+)-epóxido de deidrofuquinona (DFX) a partir do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* e análise química dos mesmos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM);

-Avaliação do efeito de DHF sobre crises epilépticas induzidas pelo pentilenotetrazol em camundongos;

-Avaliação do efeito ansiolítico do OE de *N. grandiflora* e dos compostos isolados DHF, DFX, ERM e SEM em camundongos;

-Avaliação do efeito dos compostos isolados DHF, DFX, ERM e SEL sobre o potencial de membrana e a mobilização de Ca^{+2} em sinaptossomas de camundongos.

-Investigação do envolvimento do receptor GABA_A nas ações do OE de *N. grandiflora* e dos compostos isolados DHF, DFX, ERM e SEM sobre o SNC em camundongos e em jundiás.

-Investigação da expressão de genes que codificam subunidades deste receptor utilizando peixes da espécie *Rhamdia quelen* como modelo experimental, bem como, sua modulação pelo OE e compostos isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO OE

O material vegetal (folhas de *Nectandra grandiflora* Nees) foi coletado em população nativa, no município de Jaguari, Rio Grande do Sul, sob as coordenadas geográficas - 29°26'25,09" de latitude e -54°40'27,73" de longitude. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Solon Jonas Longhi, do Departamento de Engenharia Florestal, UFSM. Uma exsicata foi depositada como material testemunha no Herbário do Departamento de Engenharia Florestal, UFSM, sob número de registro SMDB 13.162. O acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil: # 010191/2014-3). O material vegetal foi seco à temperatura ambiente por 24h, triturado e submetido à extração do OE pelo método de hidrodestilação por 3 h, utilizando o aparelho de Clevenger modificado, de acordo com a Farmacopéia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010). Após extraído, o OE foi armazenado em frascos de vidro âmbar vedado e conservado à -4°C até o momento do seu fracionamento e análises cromatográficas.

4.2 ANÁLISE QUÍMICA

O OE de *N. grandiflora* e seus constituintes isolados foram quimicamente caracterizados e quantificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Anexo A). As análises foram realizadas em um sistema hifenado AGILENT 7890A, equipado com um detector seletivo de massas AGILENT série 5975C com ionização por impacto eletrônico a 70 eV. Os parâmetros de análise foram: modo de injeção split inlet 1:50; gás carreador: He (1ml/min); coluna capilar de sílica fundida DB5-MS (5 % fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm); programação do forno: 40°C (Ti) por 4 min, 40-320°C a 4°C/min; temperatura do injetor, detector e interface: 250°C. Os componentes foram identificados com base nos índices de retenção de Kovats (IK), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de n-alcanos (C8-C40), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura e com a espectroteca do equipamento (ADAMS, 2009; NIST, 2008). A quantificação dos constituintes foi realizada através da integração das áreas sob a curva dos picos e expressa em porcentagem relativa do

totalmente confirmada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-FID) utilizando: uma coluna capilar de sílica fundida DB5 (5 % fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm); modo de injeção splitless; gás carreador: He (1ml/min); programação do forno: 40°C (Ti) por 4 min, 40-320°C a 4°C/min; temperatura do injetor e detector: 250° C e 300° C, respectivamente.

4.3 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DHF, SEL, ERM E DFX

O OE foi submetido ao fracionamento através de coluna cromatográfica (CC), utilizando gel de sílica 60 Macherey-Nagel, 70-230 mesh, como fase estacionária na proporção óleo: adsorvente de 1:100 e mistura de solventes como fase móvel. Neste procedimento, os compostos são separados por afinidade com a fase estacionária e eluente, onde compostos apolares possuem mais afinidade pelo eluente, permanecendo menos tempo na coluna e compostos polares persistem mais tempo em contato com o gel de sílica e são eluídos por último. Os sistemas eluentes foram adaptados para cada coluna, conforme a performance de separação em cromatografia de camada delgada (CCD) da substância de interesse e são descritos a seguir. As separações em CCD foram reveladas por método farmacopeico com vanilina sulfúrica (BRASIL, 2010).

O OE (9g; DHF: 24,7%; SEL: 4,09%; ERM: 6,19%; DFX: 10,07%) foi adicionado a uma CC (650 mm de comprimento x 75 mm de diâmetro; eluente: hexano/acetona, 95:5; fluxo livre; 100 ml/ fração) dando origem a frações contendo respectivamente DHF (4,3g; 55,03%), SEL isolado (450 mg; 97%) e uma fração de 2,7g contendo ERM (12%) e DFX (27%). A fração contendo DHF (55%) foi purificada em mais duas etapas: separação em CC (650 mm de comprimento x 45 mm de diâmetro; eluente: hexano: éter (90:10); fluxo: 0,8 ml/min; 25 ml/ fração) dando origem a uma fração de 1,306 g enriquecida com DHF (82,6%). Esta fração semi-purificada foi submetida a CC (640 mm de comprimento x 23 mm de diâmetro; eluente: hexano/acetona (97:3); fluxo: 0.5 ml/min; 10 ml/ fração) impregnada com AgNO₃ 10% na proporção 1:4 (MANDER; WILLIAMS, 2016). Esta separação resultou em uma fração contendo DHF (900 mg) com grau de pureza de 99,99%. A amostra contendo ERM (12%) e DFX (27%) foi aplicada em uma CC (650 mm de comprimento x 45 mm de diâmetro; eluente: hexano/éter, 90:10; fluxo: 0,5 ml/min; 25 ml/ fração), resultando nas frações ERM (600 mg; 91%) e DFX (1,59 g; 31%). A fração ERM foi novamente separada em CC (630 mm de comprimento x 24 mm de diâmetro; fase estacionária tratada com AgNO₃ 10% (1:4); eluente: hexano/ acetato de

etila (98:2); fluxo: 0,4 ml/min; 5 ml/ fração), resultando em uma fração contendo ERM (480 mg) com uma pureza de 99,5%. A fração DFX (31%) foi fracionada em CC (630 mm de comprimento x 24 mm de diâmetro; fase estacionária tratada com AgNO₃ 10% (1:4); eluente: hexano/ acetona, (97:3); fluxo: 0.6 ml/min; 10 ml/ fração), resultando em uma fração contendo DFX (520 mg) com uma pureza de 96,4%.

Conforme o perfil de CCD, as frações de coluna foram agrupadas, concentradas a 40°C sob pressão reduzida em rotaevaporador, submetidas a separações subsequentes se necessário e posteriormente analisadas por CG/EM. Após o fracionamento, os compostos foram mantidos a -4°C até o momento dos respectivos ensaios. A pureza óptica dos constituintes foi confirmada através de análise por CG-EM utilizando uma coluna capilar de sílica fundida HP-CHIRAL (30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm) e ionização por impacto eletrônico a 70 eV. Parâmetros de análise: splitless; gás carreador: He (1mL/min); temperatura do injetor e do detector: 250°C, programa de análise: 40 °C (Ti) por 4 min, 40-240 °C, 4 °C/min. As análises em coluna quiral detectaram a presença dos isômeros puros dos compostos (+)-DHF, (+)-DFX, (-)-SEL e (+)-ERM. Adicionalmente, as substâncias DHF, SEL, ERM e DFX tiveram seus espectros de massas comparados com respectivas amostras autênticas isoladas no nosso laboratório e previamente caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (dados não publicados). Eventualmente, os procedimentos de fracionamento e purificação dos constituintes foram repetidos a fim de se obter quantidade necessária dos mesmos para os testes biológicos.

4.4 FÁRMACOS E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

O bloqueador do receptor GABA_A, pentilenotetrazol (PTZ; Sigma, EUA; diluído em PBS), e o antagonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, flumazenil (Flumazil®, Cristália, Brasil, solução injetável: 0,1 mg/ml) foram administrados intraperitonealmente (i.p.; 10 ml/kg) nos ensaios *in vivo* em camundongos. O fármaco diazepam (DZP; Germed Pharma®, Brasil) foi utilizado como fármaco anticonvulsivante ou ansiolítico de referência. Tanto o fármaco DZP, como o OE e os compostos isolados foram diluídos (0,5 mg/ 10 ml) em PBS (tampão fosfato-salina; pH 7,4) contendo Tween 80 (0,02%) e administrado por via intragástrica (gavagem) ou via intraperitoneal (DHF, no ensaio de atividade anticonvulsivante) nos testes *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, DZP e os compostos isolados foram homogeneizados

em fluido cérebro espinal artificial (aCSF - NaCl :124 mM; KCl: 3,5 mM; NaH₂PO₄: 1,25 mM; MgSO₄: 2 mM; CaCl₂: 2 mM; NaHCO₃:26 mM; D-glicose: 10 mM; pH: 7,35-7,45; osmolaridade: 300-306 mOsm.). Para os testes em peixes, o DZP foi diluído em água contendo 0,02% de Tween 80 e FMZ foi aplicado na água sem nenhuma diluição prévia. Os constituintes SEL, ERM e DFX foram diluídos em etanol (1:5) antes de serem adicionados à água dos aquários.

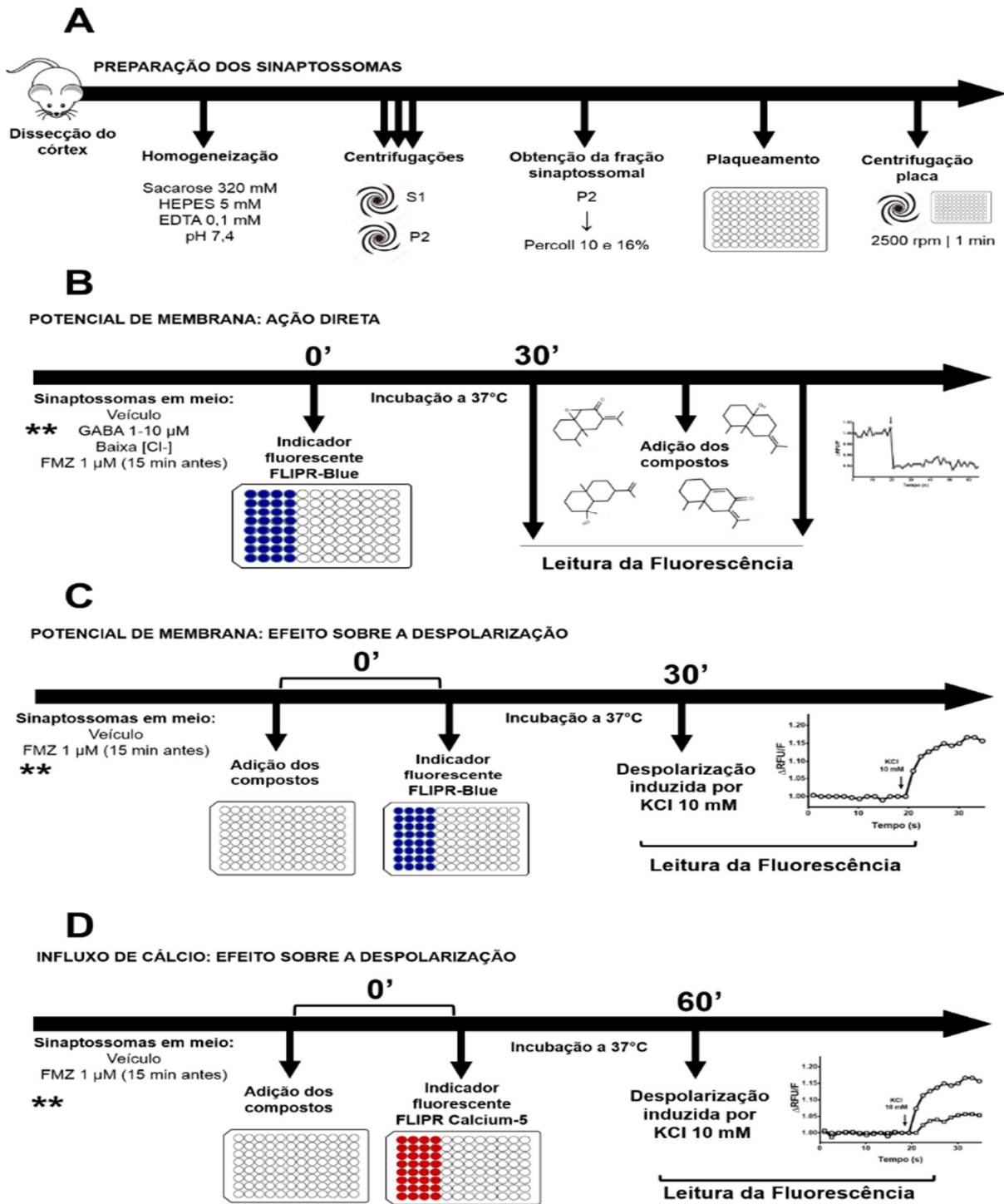
4.5 ANIMAIS

Os camundongos utilizados neste estudo (Swiss, fêmeas e machos; 25-30 g) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas das 07 às 19 h) em caixas de polipropileno em temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ e com livre acesso à água e alimento (ração comercial), exceto durante os testes. Os experimentos com camundongos foram sempre realizados durante a fase de luz acesa. Os experimentos com peixes foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Peixes, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, em colaboração com o Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto. Os juvenis da espécie *Rhamdia quelen* ($4,5 \pm 0,16 \text{ g}$; $7,7 \pm 0,12 \text{ cm}$ ou $2,9 \pm 0,32 \text{ g}$; $5,8 \pm 0,13 \text{ cm}$), obtidos de uma piscicultura local, foram acondicionados em tanques de 250 L com aeração apropriada, em sistema de troca diária da água do aquário e monitoramento dos níveis de oxigênio ($8,84 \pm 0,26 \text{ mg/L}$), pH ($7,65 \pm 0,03$) e temperatura da água ($20 \pm 0,47^\circ \text{C}$) até o momento dos testes.

4.6 PREPARAÇÃO DOS SINAPTOSSOMAS

Os sinaptossomas foram preparados de acordo com método adaptado de NAGY; DELGADO-ESCUETA (1984). As etapas de preparação dos sinaptossomas, bem como dos protocolos aplicados neste trabalho estão ilustradas na Figura 9. Para a obtenção do tecido, camundongos foram eutanasiados por decapitação e imediatamente foi removido o córtex, o qual foi homogeneizado em meio contendo sacarose 320 mM, HEPES 5 mM e EDTA 0,1 mM em pH 7,4.

Figura 9. Protocolos de ensaios com sinaptossomas. (A) Preparação dos sinaptossomas. (B) Ensaio de avaliação do efeito de compostos sobre o potencial de membrana. (C) Ensaio de avaliação do efeito de compostos sobre a despolarização da membrana. (D) Ensaio de avaliação do efeito de compostos sobre o influxo de cálcio induzido por despolarização. Onde S1: primeiro sobrenadante obtido; P2: segundo precipitado obtido; FMZ: flumazenil.



** O meio no qual os sinaptossomas são preparados varia conforme o experimento

O homogenato foi centrifugado por 10 min a 1130 x g (1000 rpm, centrífuga 5427R, EUA) a 4 °C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 16260 x g (12000 rpm) por 20 min. O precipitado resultante (*'pellet'*) foi gentilmente ressuspensão em aCSF, caracterizando a fração sinaptossomal bruta, a qual foi aplicada (100 µL) sobre 800 µL de um gradiente de Percoll (10% e 16% Percoll em meio contendo sacarose 0,25 M, HEPES 5 mM e EDTA 0,1 mM; pH 7,2) e centrifugado a 15000 x g (11500 rpm) por 20 min a 4 °C. A fração contendo os sinaptossomas purificados, localizada entre as bandas de Percoll 10% e 16%, foi coletada, lavada com 1 ml de aCSF e centrifugada por 10 min (15000 x g) por duas vezes e então ressuspensa em 100 µL de aCSF. O conteúdo proteico foi determinado usando o método BRADFORD (1976). Os sinaptossomas foram mantidos em gelo e usados entre 3–4 h após sua obtenção. Os sinaptossomas foram adicionados (10 µg/ poço) a uma placa de 96 poços tratada com poli-D-lisina (0,1 mg/ ml, Sigma Aldrich, EUA) por 2 h para facilitar a aderência dos mesmos. A placa foi centrifugada por 1 min a 500 x g (2500 rpm) em uma centrífuga de bancada (MPS 1000 *Mini Plate Spinner*). A viabilidade dos sinaptossomas foi monitorada em paralelo a cada experimento através do ensaio enzimático da lactato desidrogenase (LDH), realizado com kit comercial (LDH kit, Biotécnica, Brasil). A liberação máxima de lactato foi estimada após choque hiposmótico dos sinaptossomas induzido pela adição de água ultra-pura, de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi medida em 340 nm em equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader® e a viabilidade foi expressa como porcentagem relativa da liberação máxima de lactato.

4.7 POTENCIAL DE MEMBRANA

As variações no potencial de membrana sinaptossomal foram detectadas utilizando o indicador fluorescente FLIPR-Blue (Molecular Devices, California, EUA). Este indicador de voltagem detecta mudanças bidirecionais do potencial de membrana, pois é sensível a íons carregados positivamente. Durante a despolarização, o indicador se liga aos cátions, que estão em maior concentração no interior do sinaptossoma. Da mesma forma, durante eventos hiperpolarizantes, o indicador permanece associado aos cátions, que estão em maior concentração no meio externo, diminuindo assim o sinal da fluorescência. As mudanças no

potencial de membrana sinaptossomal foram avaliadas em condições de repouso e após despolarização induzida por adição de KCl. Todos os experimentos de avaliação de potencial de membrana foram realizados em duplicata e a viabilidade dos sinaptossomas se manteve em $83,4 \pm 2,8\%$.

Para a avaliação do efeito da aplicação direta dos compostos isolados sobre o potencial de membrana, sinaptossomas aderidos na placa receberam o indicador fluorescente, foram incubados por 30 min a 37°C e receberam aCSF (veículo), GABA $4 \mu\text{M}$, $1\text{-}10 \mu\text{M}$ DZP, 10^{-3} a $10^2 \mu\text{M}$ DHF, $0.1\text{-}100 \mu\text{M}$ DFX, ERM ou SEL, de acordo com o tipo de estudo realizado (Figura 9B). Ainda o efeito da aplicação direta dos compostos sobre o potencial de membrana foi avaliado em meio contendo GABA $1\text{-}10 \mu\text{M}$. Os dados de fluorescência foram adquiridos antes e depois da adição das substâncias em um comprimento de onda de emissão de 565 nm (excitação a 530 nm e *cut-off* a 550 nm) em intervalos de $1,53\text{s}$ no equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader®, segundo as instruções do fabricante. Em um outro experimento, visando analisar o efeito de DHF sobre a despolarização induzida pela adição de KCl, os sinaptossomas foram pré-tratados com: aCSF, 10^{-3} a $10^2 \mu\text{M}$ DHF ou $0,4 \mu\text{M}$ GABA (Figura 9C). Os dados de fluorescências foram obtidos antes e depois da adição do veículo (aCSF) ou 10 mM KCl, O potencial de membrana foi expresso como razão entre a variação de unidades relativas de fluorescência e os valores da linha de base ($\Delta\text{RFU}/F$). O efeito da adição de DHF, diretamente aplicada sobre os sinaptossomas, sobre o potencial de membrana também foi analisado.

O antagonista do sítio benzodiazepínico, flumazenil (FMZ), foi utilizado para avaliar se os receptores GABA_A estariam envolvidos na modulação do potencial de membrana induzida pelos compostos isolados. Desta forma, os sinaptossomas foram pré-tratados com $1 \mu\text{M}$ FMZ e incubados por 30 min com o indicador fluorescente. Os dados de fluorescência foram obtidos antes e depois da adição de aCSF ou DZP, DHF, DFX, ERM ou SEL sobre os sinaptossomas, conforme o experimento. Em seguida, foi avaliado se as variações no potencial de membrana induzidas pelos compostos isolados eram dependentes da presença de íons cloreto, uma vez que este íon é essencial para a atividade do receptor GABA_A. As soluções do veículo, GABA ou DZP, e compostos isolados foram preparadas em meio contendo baixa concentração de cloreto, usando aCSF modificado como se segue: acetato de sódio: 120 mM ; KCl: $3,5 \text{ mM}$; NaH_2PO_4 : $1,25 \text{ mM}$; MgSO_4 : 2 mM ; CaCl_2 : 2 mM ; NaHCO_3 : 26 mM ; D-glicose: 10 mM ; pH: $7,4$; osmolaridade: $300\text{-}306 \text{ mOsm}$) Os dados de fluorescência foram adquiridos antes e depois da

adição do veículo (regular e com baixa concentração de cloreto), 4 μM GABA ou 1-10 μM DZP, 0,1 μM DHF, 1 μM DFX, 100 μM ERM ou 1 μM SEL sobre os sinaptossomas.

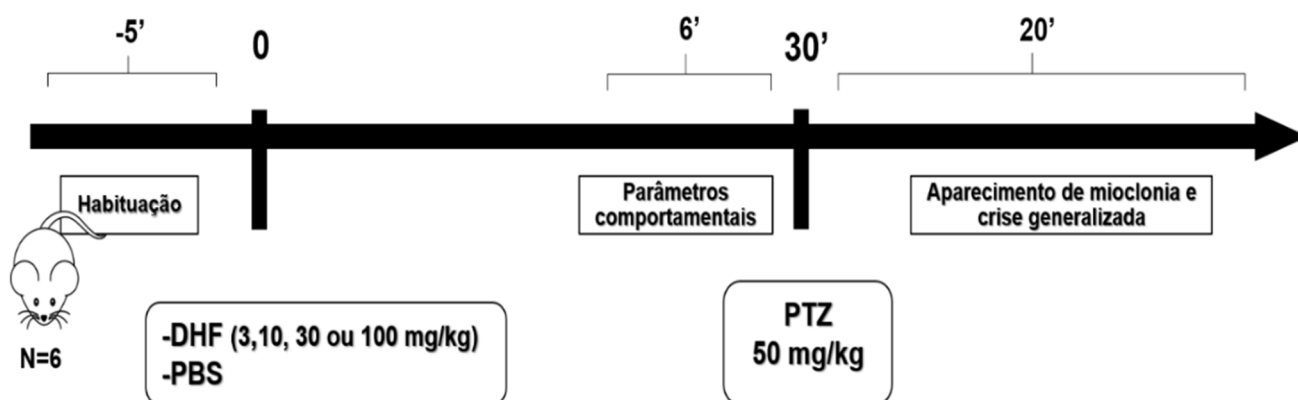
4.8 MOBILIZAÇÃO DE $[\text{Ca}^{+2}]_i$ EM SINAPTOSSOMAS

Para avaliar o efeito dos compostos isolados sobre as variações na concentração de cálcio intra-sinaptossomal, sinaptossomas foram pré-tratados com aCSF (controle), 0,4 μM GABA ou 1-10 μM DZP, 10^{-3} - 10^2 μM DHF, 0,1-100 μM DFX, ERM ou SEL (Figura 9D). Logo após foi adicionado o indicador fluorescente FLIPR Calcium-5 (*'Calcium assay kit'*, Molecular Devices, California, EUA) e os sinaptossomas foram incubados por 60 min a 37°C, segundo as instruções do fabricante. A mobilização de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ foi medida antes e depois da adição de aCSF (veículo) ou 10 mM KCl (agente despolarizante), conforme o estudo. Os dados de fluorescência foram adquiridos em comprimento de onda de emissão de 525 nm (comprimento de onda de excitação de 485 nm e *cut-off*: 515 nm) em intervalos de 1,3s em equipamento FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader®. A mobilização dos íons Ca^{+2} foi expressa como fração do influxo máximo de Ca^{+2} obtido com Triton X-100 a 1%, pela equação: $[(F-F_{\text{min}})/(F_{\text{max}}-F)]$, onde F_{min} é a média dos valores da linha de base antes da adição de aCSF ou KCl. A concentração de DHF capaz de reduzir 50% do influxo de cálcio induzido pela aplicação do veículo ou do agente despolarizante foi estimada por regressão não linear de slope variável (GABRIELSSON; WEINER, 2002). Ainda, foi utilizado 1 μM FMZ no meio de incubação para avaliar se o efeito dos compostos sobre o influxo de cálcio em sinaptossomas seria mediado pelo receptor GABA_A. Todos os experimentos de avaliação do influxo de cálcio foram realizados em duplicata e a viabilidade dos sinaptossomas se manteve em $82,4 \pm 1,3\%$.

4.9 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE DHF

O efeito do pré-tratamento com a substância DHF sobre crises epiléticas induzidas pelo PTZ foi avaliado em camundongos (Figura 10). A caixa teste consistiu de uma caixa de vidro (27 x 18 x 22 cm), onde os animais foram acondicionados individualmente por cinco minutos antes do pré-tratamento para habituação e livre exploração.

Figura 10- Protocolo de avaliação de atividade anticonvulsivante



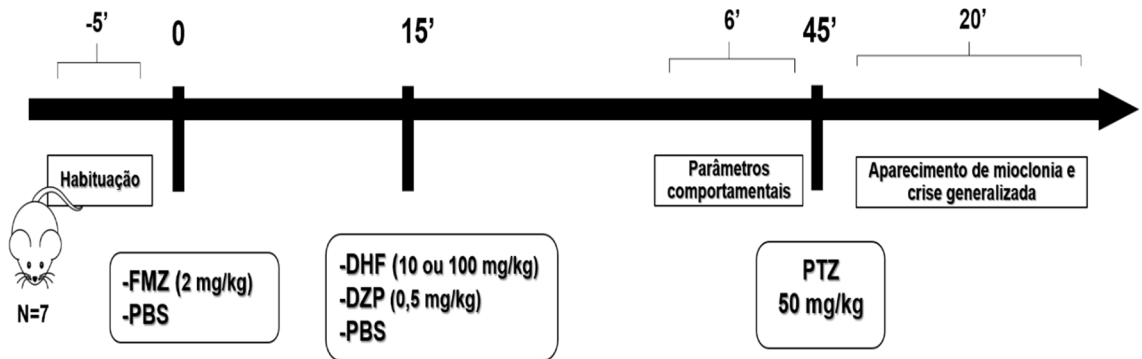
Fonte: Autor

Todo o experimento foi monitorado por vídeo. Os animais foram divididos em cinco grupos (N=6) e administrados com controle (veículo: PBS contendo 0,02% de Tween 80; i.p.) e DHF nas doses de 3; 10; 30 ou 100 mg/kg, i.p. Após 30 min, todos os animais receberam uma dose de 50 mg/Kg, i.p. de PTZ. Os animais foram então observados por 20 min e foram registrados: os tempos de latência para a primeira mioclonia e para crise generalizada tônico-clônica; o número, a duração e a gravidade das crises (caracterizadas pela escala de Racine modificada, ver Tabela 11) (LÜTTJOHANN; FABENE; VAN LUIJTELAAR, 2009).

4.10 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABA_A NO EFEITO ANTICONVULSIVANTE DE DHF

A fim de investigar se o composto DHF estaria exercendo um efeito anticonvulsivante mediado pelos receptores GABA_A, foi utilizado o flumazenil (FMZ) para bloquear o sítio benzodiazepínico deste receptor (Figura 11). Os animais (N=7) foram pré-administrados com FMZ (2 mg/ Kg; i.p.) 15 min antes da administração de: veículo, DHF nas doses de 10 e 100 mg/ Kg, i.p. ou DZP (v.o., 0,5 mg/ Kg, controle positivo). Da mesma forma que descrito no item anterior, após 30 min, todos os animais receberam uma dose de 50 mg/Kg, i.p. de PTZ. Os animais foram então observados por 20 min e foram registrados: os tempos de latência para a primeira mioclonia e para crise generalizada tônico-clônica; o número, a duração e a gravidade das crises.

Figura 11- Protocolo do ensaio de mecanismo de ação da atividade anticonvulsivante de DHF



Fonte: Autor

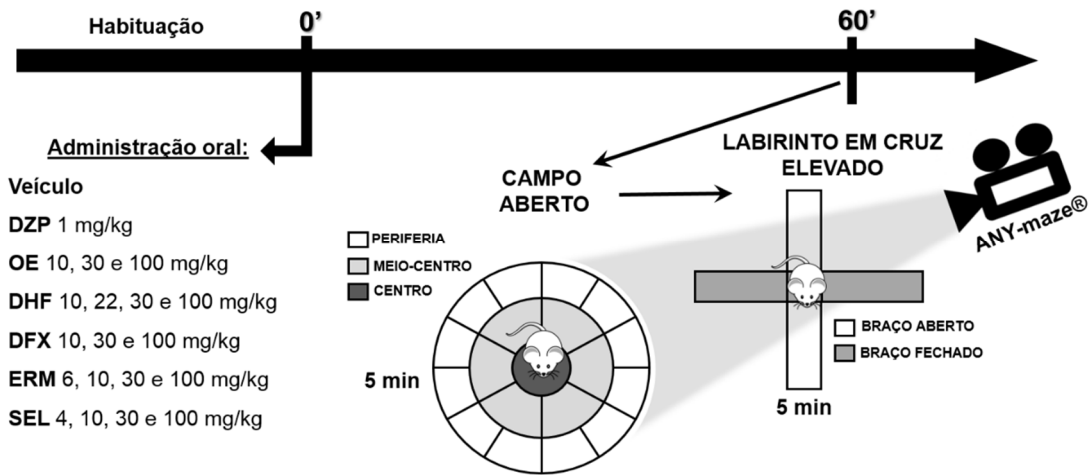
4.11 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A atividade exploratória e parâmetros comportamentais de camundongos submetidos ao veículo, DHF, DZP e FMZ foram avaliadas na caixa teste durante os ensaios de atividade anticonvulsivante e mecanismo de ação (Figuras 10 e 11). A caixa teste foi dividida em quadrantes por demarcações no fundo. Os animais foram avaliados durante 6 minutos imediatamente antes da administração do PTZ. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrantes totalmente ultrapassados; atividade exploratória, contabilizada pelo número de vezes que o animal se levanta mantendo-se sob as 2 patas traseiras (*'rearing'*); tempo despendido em atividade de autolimpeza (*'grooming'*) e número de bolos fecais.

4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TIPO-ANSIOLÍTICA

Os animais foram transportados para as salas de testes e habituados por um período mínimo de 20 min antes do início dos protocolos experimentais. Após este período, os camundongos (n=8/ grupo) foram administrados por via intragástrica (v.o.) com 1 mg/kg DZP (CHAVES et al., 2017; LIU et al., 2007; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2018) ou 10, 30 ou 100 mg/kg OE, DHF, DFX, ERM ou SEL 60 min antes de serem submetidos sequencialmente aos testes comportamentais do campo aberto e do labirinto em cruz elevado. Adicionalmente, foi testada uma dose de cada composto proporcional ao teor destes compostos na dose de 100 mg/kg OE: 22 mg/kg DHF, 10 mg/kg DFX, 6 mg/kg ERM e 4 mg/kg SEL (Figura 12).

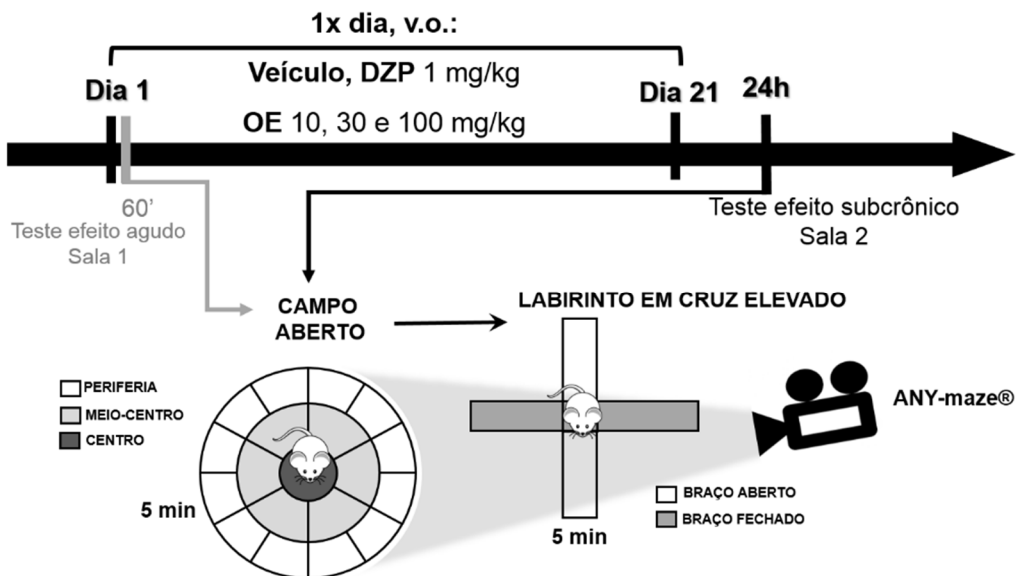
Figura 12. Protocolo de avaliação de atividade tipo-ansiolítica



Fonte: Autor

Os animais que receberam agudamente veículo, 1 mg/kg DZP ou 10, 30, 100 mg/kg OE, foram submetidos a um protocolo subcrônico de administração destes tratamentos. Os animais receberam uma dose por dia dos respectivos tratamentos durante 21 dias (n=8/ grupo) (Figura 13). Os testes comportamentais foram realizados 24h após a última administração em uma sala de testes diferente do dia 1 a fim de evitar habituação do animal ao ambiente e o efeito de tolerância ao ensaio (“*one-trial tolerance*”), conforme proposto por WALF; FRYE (2007).

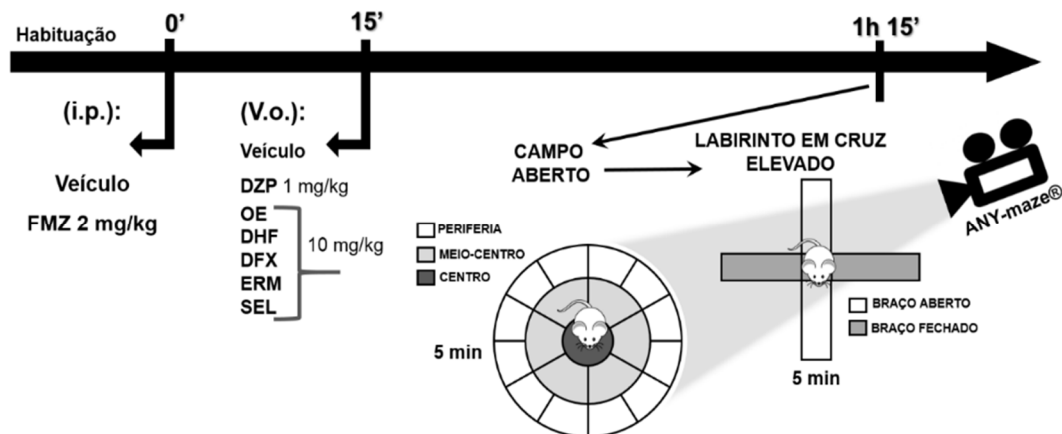
Figura 13. Protocolo de administração subcrônica para avaliação de atividade tipo-ansiolítica



Fonte: Autor

Para a avaliação do mecanismo de ação ansiolítica do OE e dos compostos isolados, a dose de cada tratamento escolhida foi a menor dose capaz de induzir efeito tipo-ansiolítico em todos os parâmetros avaliados. Foi avaliado neste teste a participação do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A no efeito agudo dos tratamentos. Para tanto, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com veículo ou 2 mg/kg FMZ, 15 min antes (DALVI; RODGERS, 1999) da administração por via intragástrica de 1 mg/kg DZP ou 10 mg/kg de OE, DHF, DFX, ERM ou SEL (Figura 14). Após 60 min os animais foram levados a avaliação comportamental nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado. Todos os testes comportamentais realizados neste estudo foram monitorados por vídeo e analisados utilizando o programa ANY-maze® (Stoelting Co, Wood Dale, IL). Ainda, a iluminação das salas testes foi mantida a 500-lux em todos os ensaios.

Figura 14. Protocolo de avaliação do mecanismo de ação da atividade tipo-ansiolítica



Fonte: Autor

4.12.1 Teste do campo aberto

O campo aberto consiste de uma estrutura metálica circular (30 cm altura x 64 cm diâmetro) e sua arena foi dividida em três áreas: centro (380 cm²), meio-centro (1243 cm²) e periferia (1626 cm²). Como mencionado anteriormente, após 60 min da administração dos tratamentos, os camundongos foram individualmente colocados no centro da arena do campo aberto, o qual foi lhes permitido explorar durante 5 min. Durante o teste o animal foi deixado sozinho na sala a fim de evitar qualquer interferência por parte do experimentador. Os parâmetros de atividade locomotora e etológica avaliados foram: entradas e tempo permanecido

no centro, meio-centro e periferia, tempo de imobilidade (considerado após 2s sem qualquer movimento), escore médio de “freezing”, atividade de auto-limpeza (frequência e duração), exploração vertical (“rearings”, frequência e duração), exploração horizontal (número de fuçadas), distância total percorrida e velocidade média. Ao fim do teste de cada animal, o campo aberto foi limpo com etanol 40% e deixado secar completamente antes de testar outro animal.

4.12.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste de dois braços abertos e dois fechados (30 cm x 5 cm) feito em madeira com paredes de vidro transparente (15 cm altura) nos braços fechados, de piso na cor preta, uma área central de 5 cm x 5 cm e posicionado cerca de 40 cm acima do chão (LISTER, 1987). Imediatamente após o teste do campo aberto, os camundongos foram alocados no centro do labirinto em cruz elevado e de frente para um braço aberto e observados por 5 min (MONTGOMERY, 1955). Durante este teste, um experimentador se fez presente na sala a fim de observar possíveis quedas do aparato que os animais pudessem sofrer. O experimentador permaneceu sempre em um mesmo canto da sala e fez o mínimo possível de ruído ou movimento. Os parâmetros registrados foram: entradas (contadas quando uma área de $\geq 75\%$ do animal entra em um braço) e tempo permanecido nos braços abertos e fechados, latência para a primeira entrada no braço aberto, tempo permanecido na borda dos braços abertos, latência para a primeira entrada na borda dos braços abertos, tempo de imobilidade (considerado após 2s sem qualquer movimento), escore médio de “freezing”, distância total percorrida e velocidade média. Além disso, para aumentar a sensibilidade do teste foram analisados os parâmetros etológicos (RODGERS et al., 1997; RODGERS et al., 1999): mergulhos de cabeça, comportamentos de avaliação de risco como o número de retorno aos braços fechados e o comportamento de “stretch-attend posture”. Ao fim do teste de cada animal, o aparato foi limpo com etanol 40% e deixado secar completamente antes de testar outro animal.

4.13 QUANTIFICAÇÃO DO OE E COMPOSTOS NO CÓRTEX

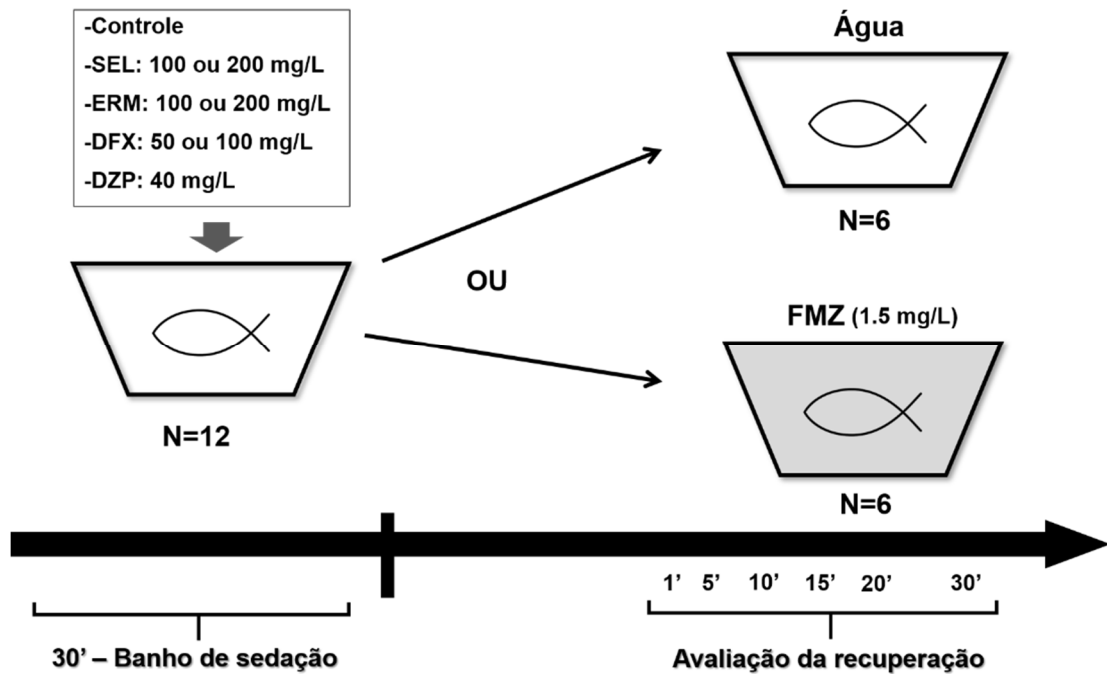
Um grupo satélite (n= 4) foi eutanaziado 60 min após o tratamento com OE ou compostos isolados e o córtex foi removido em gelo e estocado a -20 °C até as análises cromatográficas. O tecido foi homogeneizado em metanol 90% (em água ultrapura) e centrifugado durante 15 min a 16.000 x g (Centrífuga 5427R, Eppendorff®, EUA). O

sobrenadante foi extraído com hexano (99,99% de pureza) na proporção 1:1 e novamente centrifugado a $1300 \times g$ por 5 min para facilitar a separação das fases. A fase hexânica foi filtrada em membrana PTFE e 1 ml desta solução foi transferida para um “vial” onde o padrão externo (1 mg/ml de eugenol, 99,99% de pureza) foi adicionado. Esta solução foi injetada em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A com um detector de ionização por chama. O método cromatográfico consistiu da injeção de 4 μL da amostra por um injetor automático em modo “*splitless*” em uma coluna capilar não-polar de sílica fundida (5% fenil, 95% metilsiloxano, 30 m comprimento \times 0,25 mm diâmetro interno \times 0,25 μm de espessura do filme). O gás carreador (fase móvel) foi o gás hélio em um fluxo de 1.0 ml min^{-1} e as temperaturas do injetor, detector e interface foram programadas a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto a temperatura auxiliar foi de $280 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura do forno foi mantida em $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min e então elevada a 210°C a uma velocidade de 5°C min^{-1} e o tempo total da análise foi de 38 min. Os compostos-padrão (DHF, TR: 31,63 min; DFX, TR: 28,83 min; ERM, T:R 32,56 min e SEL, TR: 28,80 min) foram obtidos e purificados em nosso laboratório e injetados no sistema em concentrações de 9,454 ng/ml a 0,472 mg/ml e as curvas de calibração foram calculadas. A concentração do OE (calculada em equivalentes de DHF) e dos compostos DHF e ERM no tecido foi obtida pela equação $C_A/IS_A = 0,382 \times ([C]/[IS]) - 4,89 \times 10^{-4}$ ($r^2 = 0,998$, $p < 0,0001$; limite de detecção: 4,22 ppm, limite de quantificação: 12,8 ppm) e a concentração dos compostos DFX e SEL foi calculada pela equação $C_A/IS_A = 0,2059 \times ([C]/[IS]) - 7,7 \times 10^{-6}$ ($r^2 = 0,994$, $p < 0,0001$; limite de detecção: 0,12 ppm, limite de quantificação: 0,38 ppm), onde C_A é a área do pico do composto; IS_A é a área do pico do padrão interno; [C] e [IS] são as concentrações do composto e do padrão interno, respectivamente.

4.14 MECANISMO DE AÇÃO DE SEDAÇÃO INDUZIDA POR SEL, ERM E DFX EM PEIXES

Os compostos SEL, ERM e DFX induzem sedação em jundiás (dados não publicados) e a avaliação da participação dos receptores GABA_A na ação sedativa destas substâncias foi avaliada utilizando o antagonista GABA_A/sítio benzodiazepínico, flumazenil (FMZ) (Figura 15). Juvenis de jundiás (N=12; $4,5 \pm 0,16 \text{ g}$; $7,7 \pm 0,12 \text{ cm}$) foram individualmente submetidos a banhos de 30 min com os compostos SEL e ERM nas concentrações de 100 e 200 mg/L, com o composto DFX nas concentrações de 50 e 100 mg/L, com diazepam (DZP, 40 mg/L) ou em banho somente com água e veículo (controle).

Figura 15- Protocolo de avaliação da recuperação da sedação induzida por SEL, ERM e DFX



Fonte: Autor

Estas concentrações foram escolhidas a partir de uma curva de concentração-resposta (dados não publicados) e o critério escolhido foi a capacidade de produzir sedação leve ou profunda sem indução de anestesia no animal. A concentração de DZP foi escolhida de acordo com trabalhos anteriores que mostram que o DZP nesta faixa de concentração induz sedação leve a profunda (GARLET et al., 2016; HELDWEIN et al., 2012; SILVA, L. L. et al., 2013b). Os animais sedados com os respectivos compostos por 30 min foram divididos em dois grupos: um grupo (N=6) foi levado a um banho de recuperação em aquário contendo somente água; e o outro grupo (N=6) foi conduzido a aquário contendo FMZ 1,5 mg/L. O tempo de transferência do banho de sedação para o banho de recuperação não ultrapassou 2s. O tempo total de observação de ambos os banhos de recuperação foi 30 min. Nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 min da fase de recuperação, os animais foram observados quanto ao seu comportamento, em função do qual foram atribuídos escores de recuperação conforme o método adaptado de HELDWEIN et al. (2012) e demonstrado na Tabela 13. Os escores foram submetidos à análise da área sob a curva ao longo do tempo de observação e esta medida foi utilizada para a análise estatística.

Tabela 13- Escores de recuperação de sedação ou anestesia

Escore	Descrição
0	Total perda de equilíbrio, sem habilidade de natação, sem resposta a estímulo caudal
0,5	Total perda de equilíbrio, sem habilidade de natação, com resposta a estímulo caudal
1	Habilidade natatória com perda parcial de equilíbrio (animal nada de lado)
2	Nado normal sem reação a estímulo externo (toque do bastão de vidro no fundo do aquário)
3	Nado normal com reação a estímulo externo

Adaptado de HELDWEIN et al. (2012)

Os escores de recuperação em água e em FMZ foram comparados entre si utilizando a área sob a curva da média dos escores em função do tempo. Após os 30 min. do banho de recuperação da sedação induzida pelos tratamentos, os animais foram agrupados de acordo com seu grupo experimental, transferidos para tanques de 40L com aeração e observados por 48h.

4.15 ENSAIO DE LONGA EXPOSIÇÃO AOS COMPOSTOS SEL, ERM E DFX

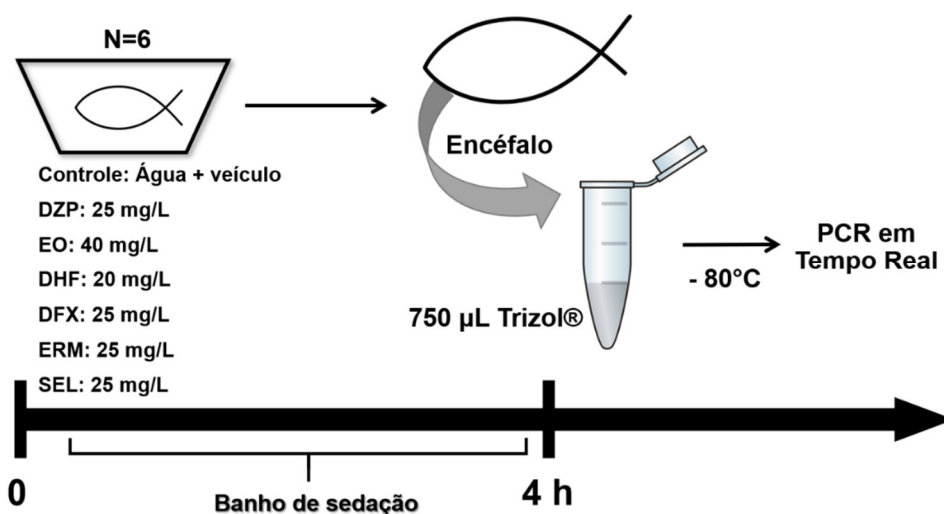
O ensaio de longa exposição a agentes sedativos (>30 min) teve objetivo avaliar se o contato com o OE e com os compostos SEL, ERM e DFX seria capaz de induzir: (1) a progressão do efeito sedativo ao longo do tempo ou (2) o aparecimento de efeitos adversos/tóxicos. Substâncias potencialmente nocivas ao jundiá podem induzir perda de muco, contrações musculares, defecação e regurgitação excessiva (BENOVIT et al., 2015; SILVA et al., 2013). Juvenis de jundiás (n=8; $4,5 \pm 0,16$ g; $7,7 \pm 0,12$ cm) foram expostos ao OE e aos compostos e observados por 24h. A escolha das concentrações foi baseada nos seguintes critérios: concentrações dos compostos SEL, ERM e DFX (12,5 e 25 mg/L) que promovem sedação leve (estágio S2: animal mantém capacidade natatória normal, mas não responde a estímulo externo, o qual é padronizado como sendo um toque de um bastão de vidro no fundo do aquário). Nos tempos de 30 min e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h, o grau de sedação do animal foi classificado segundo protocolo descrito por GARLET et al. (2016), utilizando como medida

de nível de sedação os escores já mencionados na Tabela 13. Os escores foram submetidos a análise da área sob a curva ao longo do tempo de observação e esta medida foi utilizada para a análise estatística. Ainda, foi avaliado um grupo de animais em aquário contendo somente água e outro grupo em água e veículo (etanol na maior concentração usada para diluir os compostos). Após as 24h os animais foram reunidos de acordo com seu grupo experimental e observados por 48h a fim de se avaliar o aparecimento de sinais adicionais de toxicidade, doenças ou mortalidade.

4.16 MODULAÇÃO DE GENES DO RECEPTOR GABA_A

Com a finalidade de avaliar se a expressão de subunidades do receptor GABA_A relacionadas com efeitos sobre convulsões, sedação e ansiedade (ver Tabela 9), poderia ser detectada em modelo experimental de peixes, foi elaborado um protocolo utilizando a espécie *Rhamdia quelen*. Desta forma foi avaliado se as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, δ e $\gamma 2$, codificadas pelos genes *gabral1*, *gabral2*, *gabral3*, *gabbr1*, *gabbrd* e *gabrag2*, respectivamente, estão conservadas nesta espécie e se elas se alteram na presença do agente sedativo diazepam (DZP), do OE de *N. grandiflora* e dos compostos isolados DHF, DFX, ERM e SEL. O protocolo experimental está ilustrado na Figura 16 e consistiu na indução sedativa de juvenis de jundiás ($2,9 \pm 0,32$ g; $5,8 \pm 0,13$ cm) por 4h em banho de imersão contendo somente água e veículo, 25 mg/L DZP, 40 mg/L OE, 20 mg/L DHF ou 25 mg/L de DFX, ERM ou SEL.

Figura 16. Protocolo comportamental para a avaliação da expressão de genes do receptor GABA_A



Após o banho sedativo, os animais foram eutanasiados por secção medular e o córtex total foi removido, acondicionado em um eppendorf® contendo Trizol®, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C até as análises de expressão gênica. As concentrações utilizadas de cada substância foram escolhidas a partir das concentrações utilizadas no ensaio de longa exposição, no caso do DZP e dos compostos DFX, ERM e SEL. A concentração de DHF foi escolhida também a partir de um ensaio de longa exposição a este composto, previamente reportado na literatura (GARLET et al., 2016). A duração do banho sedativo foi determinada também a partir dos resultados obtidos no ensaio de longa exposição, como sendo um tempo onde todos os compostos produzem sedação de escore entre 0,5 e 1 (metodologia descrita anteriormente).

4.16.1 PCR em tempo real

A expressão das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, δ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A foi realizada pela técnica de PCR em tempo real. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, EUA) e a pureza do RNA foi determinada pela razão de absorvância nos comprimentos de onda de 260/280 nm. Os fragmentos de RNA foram tratados com 0,1 U de DNase (Amplification Grade, Invitrogen) por 15 min a 27 °C, seguido pela inativação da DNase com 1 μ L de EDTA a 65 °C por 10 min. O DNA de cadeia dupla complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA com *primers* hexâmeros randômicos utilizando o kit iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da reação em cadeia da polimerase (qPCR) foi realizada em um termociclador (CFX384 thermocycler, BioRad), utilizando o corante BRYT Green® e Taq DNA polimerase (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega Corporation), com 5 ng de cDNA em 10 μ L. O programa de termo ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 min seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s cada e uma fase de anelamento/extensão a 60 °C por 30s para amplificar cada transcrito. A análise da dissociação da dupla fita de DNA foi realizada utilizando a ‘*curva de melting*’ a fim de verificar a identidade do produto de reação. Foi analisada a expressão do mRNA (RNA mensageiro) dos genes *gabral* (GenBank acc. no. MK175055), *gabraq2* (GenBank acc. no. MK175056), *gabraq3* (GenBank acc. no. MK175057), *gabrb1* (GenBank acc. no. MK175058), *gabrd* (GenBank acc. no. MK175059), *gabrg2* (GenBank acc. no. MK175060), cujas sequências nucleotídicas e *primers* podem ser encontradas na Tabela 14. Para a determinação

das sequências dos genes, amostras de córtex foram enviadas ao Bioarray (Espanha), onde o sequenciamento de massas foi feito pelo método de *next-generation sequencing* (NGS), utilizando o kit comercial Illumina TruSeq® Stranded mRNA HT para captura e amplificação do mRNA. Após, o sequenciamento foi realizado em um sequenciador Illumina NextSeq500 em modo 2x75. Para obter as sequências, um novo alinhamento foi realizado com os *softwares* Trinity e Blast2GO, combinando as sequências de três amostras (CONESA et al., 2005). Ainda, foi realizado o alinhamento das leituras frente a sequências de outras espécies. Os *primers* foram desenhados utilizando o *software* Primer Express 3.3 (Applied Biosystems) e validados por curvas-padrão. Foram consideradas otimizadas as reações com coeficientes de determinação (r^2) > 0,98 e eficiência entre 85 e 110%. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos como expressão de mRNA em relação ao nível de proteínas constitutivas do fator de alongamento 1 α (*efl1a*, acc. no. MH107165) e β -actin (*actb*, acc. no. KC195970). Os dados foram normalizados utilizando o método de $\Delta\Delta Cq$, previamente descrito por PFAFFL (2001).

Tabela 14. Sequências oligonucleotídeas dos primers utilizados para Q-PCR

Gene	Primer (“Forward” e reversa)	Sequência (5' → 3')	Tamanho (bp)
<i>gabral</i>	qrqGABRA1-F	GAGTCGTCCAATCCAGCAC	3495
	qrqGABRA1-R	AGCCAGAAGGAAACCTGTGA	
<i>gabra2</i>	qrqGABRA2-F	CGAACTACGCTCCCAACATC	3701
	qrqGABRA2-R	CATGCGGTCGATCTTACTCA	
<i>gabra3</i>	qrqGABRA3-F	CGAGTCAGCAAAGTGGACAA	4297
	qrqGABRA3-R	TATGAGGGTTGGACCTCCTG	
<i>gabr1</i>	qrqGABRB1-F	GAGGTCCTCACCTGCAGAAG	3135
	qrqGABRB1-R	GTTTCATGAGCATCCACCT	
<i>gabr2</i>	qrqGABRD-F	TTGCACTTCCAGTTGAGACG	2618
	qrqGABRD-R	GTGATACTCTCGCAGGCACA	
<i>gabrg2</i>	qrqGABRG2-F	CAGAAAGTCGCTTCCCAAAG	2638
	qrqGABRG2-R	TGCGGTTGCTCACAAAGTAG	

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média) ou mediana \pm intervalo interquartis em caso de dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Dados paramétricos foram submetidos à análise por ANOVA, de uma ou duas vias, conforme o delineamento experimental. Análises *post-hoc* foram conduzidas utilizando o teste de Dunnett ou Tukey. Nos casos de distribuição não-paramétrica dos dados foram utilizados testes de Kruskal-Wallis (um fator em estudo) ou Scheirer-Ray-Hare, extensão de Kruskal-Wallis (dois fatores em estudo). Análises *post-hoc* foram conduzidas utilizando o teste de Dunnett, Tukey ou Bonferroni (com correção para número de comparações). Análises de regressão e cálculo de valores de IC₅₀ foram realizados quando apropriado usando a equação $F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) / (1 + 10^{(\text{LogIC}_{50} - C) \times h})$, onde F indica o valor normalizado de fluorescência; F_{max} and F_{min} correspondem às respostas máximas e mínimas de fluorescência, respectivamente; C é a concentração do composto; IC₅₀ é a concentração necessária para produzir 50% da resposta e h é o slope de Hill. Para estimar a correlação entre os parâmetros comportamentais observados nos testes de atividade tipo-ansiolítica foi aplicada uma análise multivariada utilizando o método da Análise de Componentes Principais (PCA). A matriz de componentes foi submetida ao teste de adequabilidade de amostra de Kaiser-Meyer-Olkin, ao teste de esfericidade de Bartlett e à rotação Varimax com normalização de Kaiser. Foram considerados significantes os componentes principais (PCs) com autovalores maiores que 1 e fatores de carregamento maiores que 0,5. Um fator de carregamento igual a 1 descreve uma correlação perfeita, enquanto fatores menores que 0.4 sugerem uma correlação fraca (RODGERS; JOHNSON, 1995). Neste método, o primeiro componente principal (PC1) extraído é responsável pela maior porcentagem de variância dos dados. Os componentes subsequentes (PC2, PC3, ... PCn) explicam as respectivas variâncias decrescentes (HENSON; ROBERTS, 2006). Os dados do ensaio de sobrevivência no teste de longa exposição em jundiás foram analisados pelo método de Mantel-Haenszel, utilizando o teste de *log-rank* de Mantel-Cox (MACHIN; CHEUNG; PARMAR, 2006). O limiar de significância para todas as análises foi considerado como $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares PASW statistic -SPSS versão 18[©] e GraphPad Prism[©] versão 6.05.

4.1 / COMITÊ DE ÉTICA

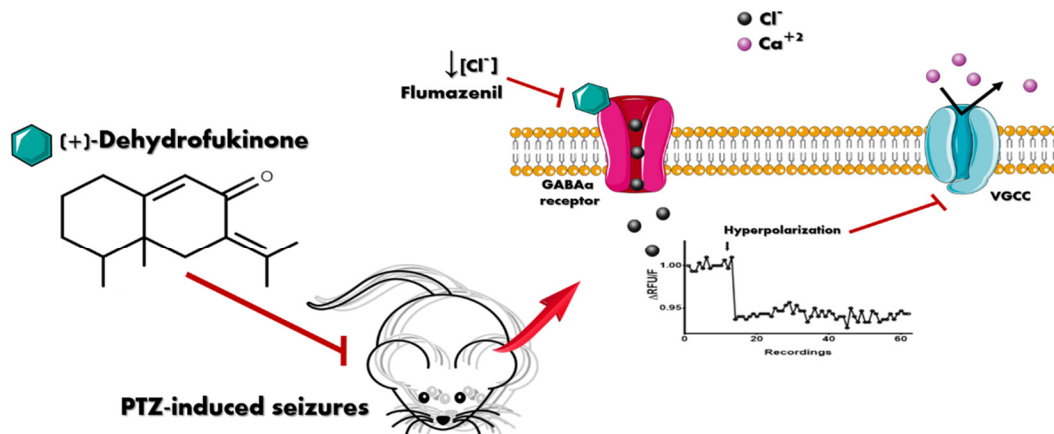
Durante este estudo, todas as precauções foram tomadas a fim de garantir o bem-estar animal, bem como a redução do número de animais utilizados nos ensaios. A metodologia envolvendo testes realizados em camundongos foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria e registrada sob número 3627041115 (Anexo B). A metodologia referente aos testes com jundiás está cadastrada no mesmo comitê sob processo número 074/2014 (Anexo C).

5 ARTIGO 1

Artigo publicado no periódico Toxicology and Applied Pharmacology (ISSN: 0041-008X)

(+)- Dehydrofukinone modulates membrane potential and delays seizure onset by GABA_A receptor-mediated mechanism in mice

GRAPHICAL ABSTRACT



Highlights:

- (+)-Dehydrofukinone blunted KCl-evoked depolarization and calcium influx.
- (+)-Dehydrofukinone effects on neuronal excitability are blocked by flumazenil.
- (+)-Dehydrofukinone delays pentylenetetrazole-induced seizures in mice.
- GABA_A receptors play a role in the anticonvulsant effect of (+)-dehydrofukinone.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

(+)-Dehydrofukinone modulates membrane potential and delays seizure onset by GABA_A receptor-mediated mechanism in mice



Quelen Iane Garlet, Luana da Costa Pires, Laura Hautrive Milanese, Joseane Righes Marafiga, Bernardo Baldisserotto, Carlos Fernando Mello, Berta Maria Heinzmann *

Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2017
Revised 3 July 2017
Accepted 17 July 2017
Available online 18 July 2017

Keywords:

Nectandra grandiflora
Calcium
Natural products
Anticonvulsant
Essential oil

ABSTRACT

(+)-Dehydrofukinone (DHF), isolated from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae) essential oil, induces sedation and anesthesia by modulation of GABA_A receptors. However, no study has addressed whether DHF modulates other cellular events involved in the control of cellular excitability, such as seizure behavior. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of DHF on cellular excitability and seizure behavior in mice. For this purpose, we used isolated nerve terminals (synaptosomes) to examine the effect of DHF on the plasma membrane potential, the involvement of GABA_A receptors and the downstream activation of Ca²⁺ mobilization. Finally, we performed an *in vivo* assay in order to verify whether DHF could impact on seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) in mice. The results showed that DHF induced a GABA-dependent sustained hyperpolarization, sensitive to flumazenil and absent in low-[Cl⁻] medium. Additionally, (1–100 μM) DHF decreased KCl-evoked calcium mobilization over time in a concentration-dependent manner and this effect was prevented by flumazenil. DHF increased the latency to myoclonic jerks (10 mg/kg), delayed the onset of generalized tonic-clonic seizures (10, 30 and 100 mg/kg), and these effects were also blocked by the pretreatment with flumazenil. Our data indicate that DHF has anticonvulsant properties and the molecular target underlying this effect is likely to be the facilitation of GABAergic neuronal inhibition. The present study highlights the therapeutic potential of the natural compound DHF as a suppressor of neuronal excitability.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

(+)-Dehydrofukinone (DHF), also known as dihydrokaranone, is an eremophilane-type sesquiterpenoid ketone isolated from *Nectandra grandiflora* Ness (Lauraceae) essential oil. Also, DHF was previously detected in *Senecio* and *Ligularia* species, *Arcticum lappa* and *Casualia hastata* (Lizarraga et al., 2013), however, the DHF enantiomeric form was not specified in those studies. Early behavioral studies have indicated that DHF has sedative and anesthetic properties mediated by GABAergic mechanisms in fish (Heinzmann et al., 2014; Garlet et al., 2016). However, no study has addressed whether DHF modulates other cellular events involved in the control of cellular excitability, such as seizure behavior.

Seizures (lapse of attention, muscle jerks or severe and prolonged convulsions) are triggered from an imbalance of neuronal excitation

and inhibition, resulting in excessive and synchronized neuronal electrical discharges (Jung, 1958; Greenfield, 2013; Staley, 2015). Recurrent seizures or epileptic episodes characterizes epilepsy, which is a neurological chronic disorder of varying etiology that affects > 50 million people worldwide (WHO, 2015). Current treatments fail to control seizures in 20–30% of the patients (Löscher et al., 2013) and new approaches that may overcome this issue are a goal of current epilepsy research. Seizures occurrence could be prevented by decreasing epileptic bursting, synchronization and seizure spread. Drugs with antiseizure properties generally inhibit synaptic excitation, enhance synaptic inhibition or modulate voltage-gated ion channels (Rogawski and Löscher, 2004; Prince et al., 2009; Löscher et al., 2013; Kaminski et al., 2014).

Failure of inhibitory neurotransmission has been implicated in epileptogenesis (González et al., 2015) and γ-aminobutyric acid (GABA) type A receptors (GABA_A) are believed to play an important role in this process (Zhang et al., 2007; Schipper et al., 2015). Upon binding of the neurotransmitter GABA, the GABA_A receptor allows chloride and bicarbonate ions to diffuse through the plasma membrane, which results in hyperpolarization. Neuronal cells under hyperpolarized state have higher excitation thresholds and are unlikely to open voltage-gated channels, such as voltage-gated calcium channels (VGCC) (Rogawski and Löscher, 2004; Greenfield, 2013; Miceli et al., 2015;

Abbreviations: DHF, dehydrofukinone; DZP, diazepam; FMZ, flumazenil; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; PBS, phosphate buffered saline.

* Corresponding author at: Department of Industrial Pharmacy, Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000 – Building 44, CEP 97.105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: berta@smail.ufsm.br (B.M. Heinzmann).

Tritsch et al., 2016). The Ca^{2+} influx triggered by depolarization promotes neurotransmitter release by vesicle recruitment in the active zone (Neher and Sakaba, 2008; Kavalali, 2014). Continued elevation of intracellular calcium levels and therefore excitatory neurotransmitter release are observed in neuronal cells during seizures (Kulak et al., 2004; Steinlein, 2014). Voltage-dependent Ca^{2+} influx is suppressed by postsynaptic GABA_A receptor activation, which led the cell to hyperpolarization and therefore to a potential below the VGCC opening threshold (Neumaier et al., 2015). Thus, GABAergic tone enhancement is a target to intracellular calcium and cell excitability modulation and therefore, seizure control (Steinlein, 2014; Neumaier et al., 2015; Ochoa and Kilgo, 2016). Indeed, several antiseizure drugs target the GABAergic system, such as benzodiazepines, barbiturates, tiagabine and vigabatrin (Rogawski and Löscher, 2004; Kaminski et al., 2014). The anticonvulsant properties of topiramate and valproate are a combination of GABAergic boosting and VGCC blockade (Löscher, 1999; Kaminski et al., 2014; Gao and Li, 2016). Additionally, several natural compounds that modulate GABA_A receptors, such as acacetin, curcumin, eudesmin, methylapigenin and hesperidin, have shown anticonvulsant activity in pre-clinical studies (Chen et al., 2016; Ding et al., 2014; Hosseinzadeh and Parvardeh, 2004; Lin et al., 2012; Liu et al., 2015; Lin et al., 2014; Marder et al., 2003). Considering that DHF putatively interacts with GABA_A receptors (Garlet et al., 2016), we hypothesized that this natural compound could impact on seizures. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of DHF on synaptosomal excitability and calcium influx and seizure behavior in mice. For this purpose, we used isolated nerve terminals (synaptosomes) purified from mice cortex as a model to examine the effect of DHF on the synaptosomal plasma membrane potential, the involvement of GABA_A receptors and the downstream activation of synaptosomal calcium mobilization. Synaptosomes mimic the synaptic function and are applied in the study of neuronal signaling pathways (Ercińska et al., 1996; Dunkley et al., 2008; Evans, 2015). This standardized *in vitro* model of neuronal terminal endings is widely used to investigate the actions of drugs, including natural compounds, on membrane potential and ion channels. (Lu et al., 2010; Kammerer et al., 2011; Kuo et al., 2012; Lin et al., 2011a; Lin et al., 2011b; Lin et al., 2012; Kamat et al., 2014; Lin et al., 2014; Chang et al., 2015ab; Lin et al., 2015). Finally, we performed an *in vivo* assay in order to verify whether DHF could influence acute seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ). This particular model was chosen because PTZ tests in rodents predict clinical activity of antiseizure drugs with GABAergic mechanisms (Löscher, 2011).

2. Materials and methods

2.1.1. Plant material. *Nectandra grandiflora* leaves were collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil at 29°26' 25.09" S and 54°40' 27.73" W. Access to the national genetic patrimony was given by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil: #010191/2014-3). Botanical identification was performed by Dr. Solon Jonas Longhi and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Biology Department of Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (SMDB 13.162).

2.1.2. Essential oil (EO) extraction and DHF isolation. EO was extracted for 3 h by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus, in triplicate (European Pharmacopeia, 2010) and yield was calculated as described by Garlet et al. (2016). The extracted essential oil was stored at -4°C in glass bottles in a light-free environment until the chemical fractionation process. DHF was purified by column chromatography using silica gel as stationary phase and organic solvent mixture as mobile phase, following previous method described by Garlet et al. (2016). The isolated DHF was kept in a light-free compartment at -4°C until chemical analysis and biological tests were performed. DHF purity and chemical identity were assessed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS). Detailed information of these methods

can be found in supplementary material S1. DHF total ion current (TIC-chromatogram) obtained from mass spectrometry and DHF chemical structure are displayed in Fig. 1.

2.1.3. Drugs. Diazepam (DZP - Germed Pharma®, Brazil), a GABA_A receptor/benzodiazepine site agonist, was suspended into artificial cerebrospinal fluid (aCSF - 124 mM NaCl; 3.5 mM KCl; 1.25 mM NaH_2PO_4 ; 2 mM MgSO_4 ; 2 mM CaCl_2 ; 26 mM NaHCO_3 ; 10 mM D-glucose; pH: 7.35–7.45; osmolarity: 300–306 mOsm.) for *in vitro* assays. For *in vivo* assays, DZP was suspended into PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7.4) (0.5 mg in 10 ml) containing 0.02% Tween 80 and administered by gavage (p.o.) due to the presence of excipients in the formulation. The benzodiazepine binding site antagonist flumazenil (FMZ) (Flumazil®, injectable solution, Cristália, Brazil, 0.1 mg/ml), the GABA_A receptor blocker pentylenetetrazol (PTZ) (Sigma, USA; dissolved in PBS; 5 mg/ml) and DHF ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$: [2(3H)-naphthalenone, 4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a,5-dimethyl-3-1-methylethylidene-, 4a-cis]; CAS: 19598-45-9; density 0.9454 g/ml; Molecular weight: 218.16; $[\alpha]_D^{20} = +172.231^{\circ}$, c 0.2456, CHCl_3 ; 99.99% purity; dissolved in PBS containing 0.02% Tween 80) were administered intraperitoneally. DHF was actively homogenized in vortex homogenizer equipment into aCSF for *in vitro* assays.

2.1.4. Animals. Adult female Swiss mice (25–30 g), provided by the Animal House of the Federal University of Santa Maria, were used in the behavioral experiments. Mice were kept at a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00, $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$; 55% relative humidity) and the experiments were always performed during the light phase of the cycle. Mice were maintained in polypropylene cages with access to food and water *ad libitum*, except during tests. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Santa Maria, Brazil (Process number: 3627041115).

2.1.5. Synaptosomal preparation. Animals were euthanized by decapitation, and immediately thereafter, the cerebral cortex was dissected and homogenized in a medium containing 320 mM sucrose, 5 mM HEPES and 0.1 mM EDTA at pH 7.4. The homogenate was centrifuged for 10 min at $1130 \times g$ (Centrifuge 5427R, Eppendorff®, USA) at 4°C , and the supernatant was centrifuged again at $16260 \times g$ for 20 min. The pellet was gently resuspended in aCSF. The resulting crude synaptosomal fraction (100 μl) was applied to the top of an 800 μl discontinuous gradient of 10% and 16% Percoll (in 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES, 0.1 mM EDTA medium; pH 7.2) and centrifuged at $15000 \times g$ for 20 min at 4°C . Synaptosomes placed between the 10% and 16% Percoll

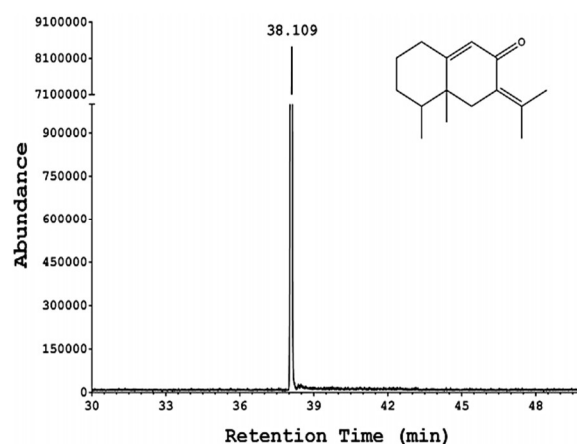


Fig. 1. (+)- Dehydrofukinone (DHF) chemical structure and TIC-chromatogram. Mass spectra information is available in Supplementary material S2.

bands (Nagy and Delgado-Escueta, 1984) were collected and washed twice with 1 ml of aCSF, centrifuged at $15000 \times g$ for 10 min and diluted in a final volume of 100 μ l of aCSF. Protein content was determined using the method of Bradford (1976). The purified synaptosomal preparation was kept on ice and used within 3–4 h. Before each assay, a 96 well plate was coated with poly-D-lysine (0.1 mg/ml, Sigma Aldrich, USA) for 2 h for synaptosomal attachment (10 μ g of protein/well). In all experiments, a single animal was used to obtain each synaptosomal preparation for the fluorescence assays, which were run in duplicates. The duplicates were averaged to produce the final result for each treatment. Synaptosomal viability was monitored by lactate dehydrogenase (LDH) assay (LDH assay kit, Biotécnica, Brazil) in a parallel assay (Morgan, 1976; Nagy and Delgado-Escueta, 1984). Maximal LDH release was calculated after hyposmotic shock induced by ultra-pure water addition, according to manufacturer instructions. The absorbance was measured at 340 nm in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader® and viability was expressed as relative percent of maximal LDH release.

2.1.6. Synaptosomal membrane potential. Synaptosomal membrane potential was assessed by fluorescent indicator FLIPR Membrane Potential-Blue (Molecular Devices, California, USA). This particular voltage probe detects bidirectional gradient changes and increases fluorescence during membrane depolarization as dye follows the positively charged ions inside the synaptosome. In the same way, hyperpolarization is detected as a reduction in fluorescent signal. Synaptosomal potential changes were evaluated under resting conditions and after KCl-evoked depolarization. KCl destabilizes membrane potential by shifting the K^+ equilibrium potential above the threshold for activation of voltage-dependent ion channels, and is a process independent of Na^+ flux (Barrie et al., 1991; Fletcher, 2016). All membrane potential experiments were performed using synaptosomes with $83.42 \pm 2.78\%$ viability.

The synaptosomes were plated into the wells and centrifuged at $500 \times g$ in a MPS 1000 Mini Plate Spinner. The membrane potential indicator was added and loaded for 30 min, according to the manufacturer's instructions. Fluorescence data were accumulated before and after the addition of aCSF (vehicle), 10^{-3} to 10^2 μ M DHF and 4 μ M GABA or 10 μ M DZP on synaptosomes. In order to evaluate DHF effects on depolarization, synaptosomes were treated with aCSF (control), 10^{-3} to 10^2 μ M DHF, 0.4 μ M GABA or 10 μ M DZP for 60 min and fluorescence data were accumulated before and after adding aCSF (vehicle) or 10 mM KCl. All fluorescence data were obtained at excitation wavelength of 530 nm (emission wavelength: 565 nm; automatic emission cut-off: 550 nm) at 1.53 s intervals in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader®. Membrane potential values were expressed as a ratio between variation of relative units of fluorescence and baseline values ($\Delta RFU/F$).

Flumazenil was used to evaluate whether GABA_A receptors play a role in DHF-induced changes of synaptosomal membrane potential under resting or depolarizing conditions. Synaptosomes were pretreated with 1 μ M FMZ and then loaded with the fluorescent indicator for 30 min. Fluorescent data were recorded before and after addition of aCSF or the drugs into the well. We also investigated whether the effect of DHF on membrane potential was dependent on the presence of chloride ions. Therefore, vehicle, GABA and DHF were prepared in low $[Cl^-]$ -solutions using low $[Cl^-]$ -aCSF (120 mM sodium acetate; 3.5 mM KCl; 1.25 mM NaH_2PO_4 ; 2 mM $MgSO_4$; 2 mM $CaCl_2$; 26 mM $NaHCO_3$; 10 mM D-glucose; pH: 7.4; osmolarity: 300–306 mOsm). Fluorescence was measured before and after the addition of the solutions on synaptosomes.

2.1.7. Synaptosomal free $[Ca^{+2}]$ assay. Synaptosomes were added into the well, centrifuged and treated with aCSF (control), 10^{-3} to 10^2 μ M DHF or 0.4 μ M GABA. Calcium fluorescent probe FLIPR Calcium-5 (Calcium assay kit, Molecular Devices, California, USA) was loaded for 1 h, according to the manufacturer's instructions. Synaptosomal calcium was measured

before and after the addition of aCSF (vehicle) or 10 mM KCl (to induce depolarization). All the experiments were performed in duplicate using synaptosomes with $82.44 \pm 1.32\%$ viability. Fluorescence data were accumulated at excitation wavelength of 485 nm (emission wavelength: 525 nm; automatic emission cut-off: 515 nm) at 1.3 s intervals in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader®. Calcium influx was expressed as fraction of maximal free- $[Ca^{+2}]$ fluorescence obtained with 1% Triton X-100 (F_{max}) by the equation $F_{Ca^{+2}} = [(F - F_{min}) / (F_{max} - F_{min})]$, where F_{min} is the mean of baseline points before aCSF or KCl addition (minimal response). The DHF concentration that reduced aCSF- or KCl-induced calcium influx by 50% (IC_{50}) was estimated by non-linear regression with variable slope (Gabrielsson and Weiner, 2002). The curves were calculated by the method of least square using the equation $F = F_{min} + (F_{max} - F_{min}) / (1 + 10^{(LogIC_{50} - C) \times h})$, where F corresponds to normalized fluorescence values; F_{max} and F_{min} indicates maximal and minimal fluorescence response, respectively; C is the drug concentration; IC_{50} denotes the concentration of DHF producing a half-maximal inhibitory effect and h is the Hill slope. Additionally, we pretreated the synaptosomes with 1 μ M FMZ before incubation with 10^{-3} – 10^2 μ M DHF or 10 μ M DZP in order to evaluate the GABA_A receptors participation in the DHF effect on KCl-evoked calcium influx.

2.1.8. Pentylentetrazole-induced seizures. Animals (n = 6) were placed in glass cages (27 × 18 × 22 cm), and allowed to explore the cage for 5 min. Immediately thereafter, they were injected with vehicle (PBS) or DHF (3, 10, 30 or 100 mg/kg, i.p.). After 30 min, PTZ (50 mg/kg) was injected intraperitoneally and mice were followed up (and video monitored; available in Supplementary material) for 20 min. Latency to myoclonic jerks and generalized tonic-clonic seizures were recorded and the severity of PTZ-induced seizures was scored by a modified Racine scale (Racine, 1972; Lüttjohann et al., 2009), as follows: (1) sudden behavioral arrest and/or motionless staring; (2) facial jerking with muzzle or muzzle and eye; (3) neck jerks; (4) clonic seizure in a sitting position; (5) convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the belly and/or pure tonic seizure; (6) convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the side and/or wild jumping.

2.1.9. Role of GABA_A receptors. In order to assess the participation of GABA_A receptors in the anticonvulsant effect of DHF, animals (n = 7) were injected with vehicle (PBS) or FMZ (2 mg/kg, i.p.) and after 15 min received DHF (0, 10 or 100 mg/kg, i.p.) or DZP (0.5 mg/kg, p.o.), which was used as positive control. After 30 min, PTZ (50 mg/kg, i.p.) was injected and the mice were observed and video monitored (videos available in Supplementary material) for 20 min for the appearance of seizures, as described above.

2.1.10. Behavioral and Exploratory activity. Exploratory and behavioral parameters were assessed in the test cages during PTZ assays. The cages had their floor divided in quadrants, where animals were observed for 6 min before PTZ administration. The following parameters were recorded: number of crossings (total quadrants overpassed); rearing (number of times mice stood on their hind legs); time spent grooming (self-cleaning behavior) and number of fecal boli.

2.2. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD or median \pm interquartile interval. Parametric data were analyzed by one- or two-way ANOVA, depending on the experimental design. *Post-hoc* analysis was carried out using the Dunnett or Tukey test. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis or Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test, depending on the number of factors analyzed. *Post-hoc* analysis was performed by the Mann-Whitney rank sum test with Bonferroni correction. Non-linear regression was performed when appropriate. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® version 6.01.

3. Results

3.1. Synaptosomal membrane potential

Fig. 2 shows the effect of DHF and GABA on synaptosomal membrane potential estimated by the fluorescence emitted from the FLIPR membrane potential probe. Vehicle addition to the incubation medium induced a slight decrease in fluorescence signal (Fig. 2A, B; $p < 0.001$ compared with baseline, two-tailed paired *t*-test with Bonferroni's correction, data not shown). A full concentration-effect curve for GABA on synaptosomal membrane potential was performed (Fig. S3). DHF decreased the fluorescence signal only at the concentration of 0.1 μM (indicating hyperpolarization), characterizing a biphasic effect of DHF on synaptosomal membrane potential (Fig. 2A, $p < 0.001$, one-way ANOVA, $F_{(7,16)}: 37.16$). DHF-induced hyperpolarization was quantitatively similar to that induced by 4 μM GABA. Both GABA and DHF induced a sustained hyperpolarized state, which lasted the 60-sec observation period (Fig. 2B). We next evaluated whether the addition of GABA to the medium potentiated the DHF action on membrane potential (Fig. 2C, D). DHF decreased fluorescence emission at a concentration range of 0.1 to 100 μM in the presence of 10 μM GABA ($p < 0.05$, one-way ANOVA $F_{(7,16)}: 7.84$), indicating a permissive role of GABA in the hyperpolarizing effect of DHF at concentrations above 0.1 μM .

Additionally, we assessed whether DHF-induced hyperpolarization of synaptosomes involved GABA_A receptors. For this purpose, synaptosomes were treated with FMZ in order to block GABA_A/benzodiazepine-site before DHF application. FMZ optimal concentration was selected after previous concentration-response curve (Fig. S4). Accordingly, FMZ prevented the hyperpolarizing-like effect of 0.1 μM DHF

(Fig. 3A, $p < 0.001$, two-way ANOVA, $F_{(1,8)}: 25.62$). To obtain additional experimental evidence that DHF hyperpolarizes synaptosomes through chloride-mediated mechanisms, we evaluated the effect of DHF on synaptosomal membrane potential using a low- $[\text{Cl}^-]$ medium (Fig. 3B). As expected, the hyperpolarizing-like effects of DHF and GABA were not observed if chloride concentration was significantly reduced in the incubation medium ($p < 0.001$, Two-way ANOVA, $F_{(1,12)}: 95.08$).

We also assessed whether the preincubation with DHF for 60 min altered KCl-induced synaptosomal plasma membrane depolarization, measured as fluorescence increase. KCl (10 mM) addition caused a large (>400%) fluorescence increase (Fig. 4A, $p < 0.001$ versus aCSF, Two-way ANOVA, $F_{(7,32)}: 7.885$). In this set of experiments the addition of vehicle (aCSF) also caused a slight hyperpolarization of the synaptosomal membrane ($p < 0.001$ compared with baseline, two-tailed paired *t*-test, data not shown). Incubation with 0.4 μM GABA or 0.1–100 μM DHF blunted the KCl-induced fluorescence increase ($p < 0.001$, Fig. 4A). Maximal DHF effect was obtained with the 10 μM concentration, which reduced 77% of KCl-induced fluorescence. Since under depolarizing conditions DHF affects membrane potential in concentrations above 0.1 μM , we performed the same experiment in the presence of 1 μM FMZ (Fig. 4B). Pretreatment with FMZ blocked both 0.1–100 μM DHF and 10 μM DZP effect on KCl-induced depolarization in synaptosomes. In order to show that these effects were sustained over time, the fluorescence values of synaptosomes treated with 10 μM DZP, 0.1 and 100 μM DHF in the presence or absence of FMZ are displayed in Fig. 4C. Taken together these results suggest that DHF modulates membrane potential *per se* in a narrow concentration range (0.1 μM) and its major effects are GABA and/or depolarization dependent. In both cases, DHF effects are blocked by FMZ.

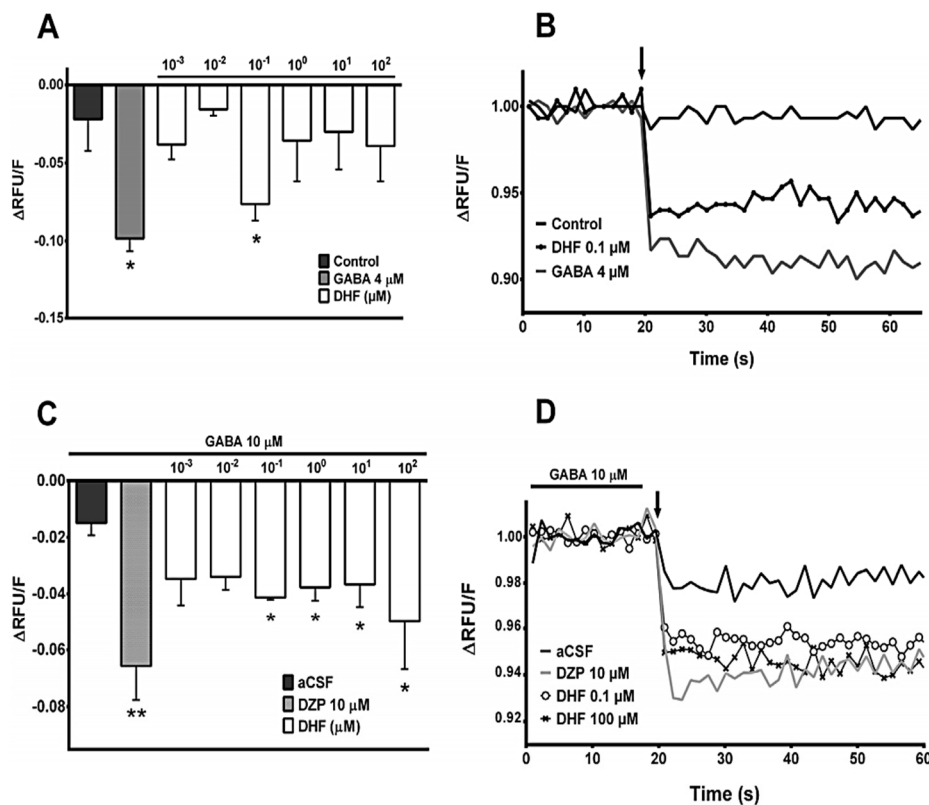


Fig. 2. DHF induces synaptosomal hyperpolarization. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$ in each experiment). (A) DHF decreases fluorescence signal at resting conditions ($*p < 0.001$ versus control group, Dunnett test) and this effect is sustained over time (B). (C) Membrane potential fluctuations after DHF addition on synaptosomes pretreated with GABA 10 μM ($*p < 0.05$ or $**p < 0.001$ versus control group, Dunnett's test). (D) Effect of DHF on synaptosomes pretreated with GABA 10 μM over time. The black arrow indicates the addition of vehicle or drugs on synaptosomes.

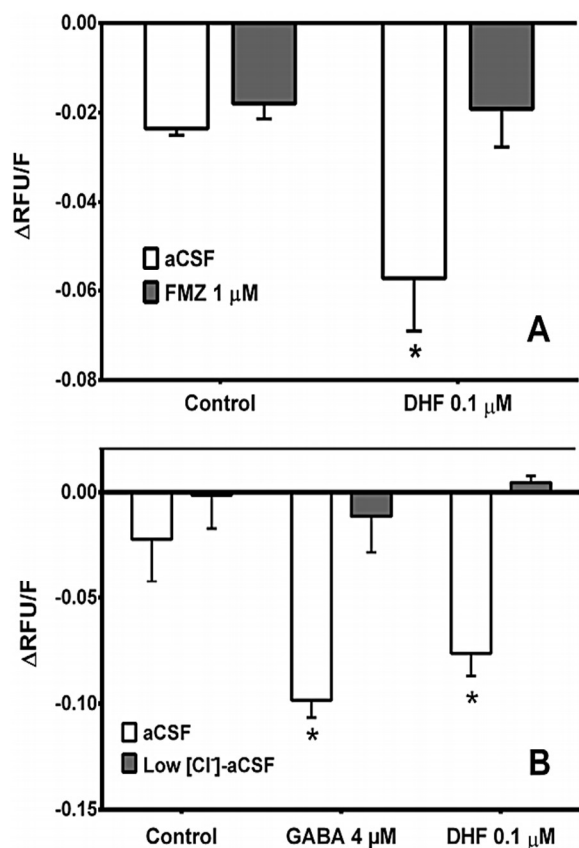


Fig. 3. Effect of DHF on synaptosomal membrane potential is GABA_A receptor- and chloride-dependent. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$ in each experiment). (A) FMZ blocks the effect of DHF on synaptosomal membrane potential. (B) Effect of 0.4 μ M GABA and 0.1 μ M DHF on membrane potential is abolished by low extracellular chloride concentrations. * $p < 0.001$ versus aCSF-control group, Tukey test.

3.2. Effect of DHF on KCl-evoked calcium mobilization

Since DHF decreased membrane potential and KCl-induced depolarization, we assessed whether KCl-induced calcium mobilization was also blunted by this compound in isolated synaptosomes (Fig. 5A). KCl-induced depolarization also involves calcium influx through voltage dependent calcium channels (VDCCs) (Barrie et al., 1991; Fletcher, 2016). Vehicle (aCSF) application, *per se*, caused a calcium influx of approximately $13.0 \pm 2.0\%$ of maximal influx and KCl induced a 2.5-fold increase in calcium influx when compared to aCSF.

Preincubation of synaptosomes with 0.4 μ M GABA significantly decreased aCSF- and KCl-evoked calcium mobilization in a sustained manner (Fig. 5C, D). Likewise, 1–100 μ M DHF diminished both aCSF- and KCl-evoked calcium mobilization ($n = 4$, $p < 0.001$, $F_{(7, 48)} = 10.54$, two-way ANOVA), which was quantitatively similar to the GABA effect over time. DHF, at the concentration of 1 μ M, caused a 4-fold decrease in the KCl-induced calcium mobilization and non-linear regression analysis revealed that DHF effect on calcium dynamics was concentration-dependent (Fig. 5B). The IC_{50} values for DHF on aCSF- and KCl-evoked calcium mobilization were 50.96 ± 1.96 nM and 451.90 ± 2.48 nM, respectively. Aiming to evaluate whether GABA_A receptors play a role in the DHF effect on KCl-induced calcium influx, we pretreated the synaptosomes with 1 μ M FMZ before incubation with DHF (Fig. 6). FMZ prevented the 1–100 μ M DHF decrease on KCl-induced calcium influx ($p < 0.001$; two-way ANOVA, Tukey test, $F_{(7, 48)} = 6.27$).

3.3. Effect of DHF on pentylenetetrazole-induced seizures

Since our data indicate that DHF might decrease synaptosomal excitability, we decided to investigate whether DHF display anticonvulsant activity *in vivo* using the PTZ model of seizure induction. The effect of DHF on the latency to PTZ-induced seizures is shown in Fig. 7. Myoclonic jerks initiated around 67 s after PTZ (50 mg/kg, *i.p.*) injection, while generalized tonic-clonic seizures installed after 97 s. Non-parametric one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test followed by Dunnett's *post hoc* test) revealed that 10 mg/kg DHF increased the latency to myoclonic jerks ($p < 0.05$, $H_{(4)} = 13.368$; effect size: $r = 0.8103$; Fig. 7A) and 10, 30 and 100 mg/kg DHF delayed the onset of generalized tonic-clonic seizures ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test followed by Dunnett's *post hoc* test, $H_{(4)} = 20.260$; effect size: $r = 0.8334$ (10 mg/kg), $r = 0.8319$ (30 mg/kg), $r = 0.8313$ (100 mg/kg); Fig. 7B). However, DHF did not alter seizure duration or severity (Fig. 7C, D) as well as the number of seizure events (data not shown, $p = 0.082$, Kruskal-Wallis test).

3.4. Role of GABA_A receptors

Flumazenil prevented the effects of DHF on synaptosomal excitability *in vitro*, therefore we decided to test whether this GABA_A/benzodiazepine antagonist also prevented the anticonvulsant effect of DHF *in vivo*. Flumazenil prevented both the DZP and DHF increase of the latency to myoclonic jerks (Fig. 8A; $p < 0.001$ Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test $H_{(2)} = 6.67$). Similarly, FMZ attenuated DZP and DHF effect on the generalized tonic-clonic seizures (Fig. 8B; $p < 0.001$ Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test $H_{(3)} = 11.62$), indicating that GABA_A receptors are involved in the anticonvulsant effect of DHF. Injection of FMZ decreased the latency to seizure in DZP- or 100 mg/kg DHF-treated mice. However, the latency scores of these groups did not reached control levels (Fig. 8A, B; $p < 0.001$ versus FMZ control group), suggesting that (1) the dose of FMZ was insufficient to prevent the effect of a high dose of DHF or (2) DHF may interact with other GABA_A site besides the BDZ-binding site. Taken these results together, we suggest that GABA_A receptors indeed are involved in the DHF anticonvulsant activity.

3.5. DHF effect on mice behavior

Drugs that decrease neuronal excitability, such as GABA_A receptors agonists, usually alter locomotor activity and cause sedation at high doses (Bourin et al., 2007; Kalueff et al., 2016; Karl et al., 2003). Therefore, we examined whether DHF altered the number of crossings, rearing responses and fecal boli, as well as the total time spent grooming before PTZ injection (Fig. 9). Diazepam and DHF (30 and 100 mg/kg) significantly decreased the number of crossings when compared with control group (Fig. 9A; $p < 0.001$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks, $H_{(DF:6)} = 36.82$). Diazepam and 100 mg/kg DHF diminished the number of rearings, while administration of 3 mg/kg DHF increased this behavior (Fig. 9B). Time spent grooming was not changed by DZP. While 10 mg/kg DHF increased self-cleaning, 100 mg/kg DHF decreased grooming behavior (Fig. 9C; $p < 0.001$, $H_{(DF:6)} = 38.85$). However, animals administered with both DHF doses (10 and 100 mg/kg) displayed grooming behavior following a cephalocaudal pattern (head-to-body). Both DZP and 100 mg/kg DHF decreased the number of fecal boli (Fig. 9D; $p < 0.001$, $H_{(DF:6)} = 24.02$). Additionally, other behavioral changes were observed in mice injected with 100 mg/kg DHF, including loss of body posture, vacillating ambulation and head waving (repetitive movement of the head from side to side).

4. Discussion

In this work, we showed that the lipophilic natural compound (+)-DHF has a protective effect against PTZ-induced seizures and prevents KCl-induced synaptosomal depolarization by GABA_A-mediated

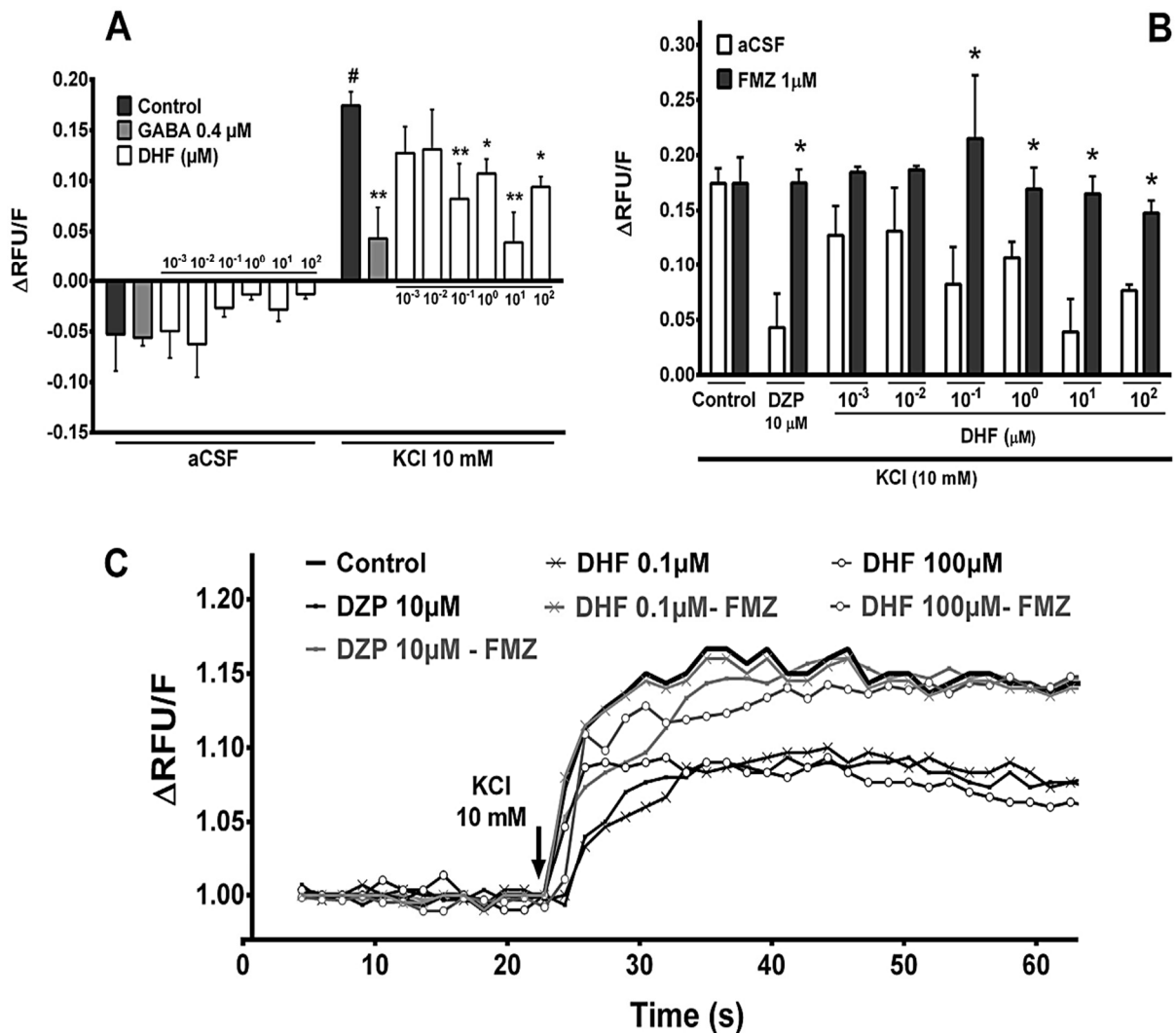


Fig. 4. DHF blunts the KCl-induced increase in membrane potential and this effect is blocked by flumazenil (FMZ). Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$). (A) Membrane potential alterations after vehicle (aCSF) or KCl addition (arrow) on synaptosomes pretreated with aCSF (control), GABA or DHF (* $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ versus the respective control group, # $p < 0.001$ versus aCSF-control group, Tukey test. Pretreatment with 1 μ M FMZ abolished DHF protective effect against KCl-induced depolarization (B)). (C) Fluorescence variations over time of synaptosomes treated with diazepam (DZP) or DHF (0.1 and 100 μ M) in the presence (gray lines) or absence (black lines) of FMZ before KCl addition (arrow).

mechanisms. A DHF racemic mixture can also be obtained by semi-synthesis (Chinchilla et al., 2005). However, the pure dextrorotatory enantiomeric form was only identified in the essential oil from *N. grandiflora* (Heinzmann et al., 2014) and shows a high stability when kept in refrigerated ambient (4 °C) and it is resistant to light- or acid-induced degradation (Fig. S5). This is in agreement with the literature, which describes that DHF topological properties support the high stability of this compound due to the six-membered ring linked to the isopropylidene group and to a ketonic function (Lizarraga et al., 2013). Until now, only a few studies have investigated the biological activity of this compound. In fact, preliminary behavioral assays conducted using fish as experimental animal have shown that DHF produces sedation and anesthesia, and the GABA_A receptors play a role in these effects (Heinzmann et al., 2014; Garlet et al., 2016). Accordingly, we hypothesized that DHF-induced decrease in neuronal excitability could imply in protection from seizures. Here, we demonstrated that DHF has anticonvulsant properties and the mechanism underlying this effect involves GABA_A receptors and modulation of cytosolic calcium.

The main mechanisms of antiseizure drugs include enhancement of GABAergic inhibitory neurotransmission and decrease of glutamatergic excitatory neurotransmission, as well as interaction with ion channels and intracellular signaling pathways (Löscher et al., 2013). Neuronal

inhibition impairment has been addressed as one of the factors underlying seizures onset and the development of epilepsy (Farrant and Nusser, 2005; Silbert et al., 2015; Staley, 2015; Zhou et al., 2015). GABA_A receptors-mediated long-lasting hyperpolarization works as a continuous brake compensating neuronal excitation (Moss and Smart, 2001; Goldberg and Coulter, 2013). In fact, GABA_A receptor antagonists, such as bicuculline, picrotoxin and PTZ induce epileptiform activity and seizures (Goodman et al., 1953; Hamani and Mello, 1997; Lüttjohann et al., 2009; Kandratavicius et al., 2014). Also, anti-seizure drugs currently available include the GABA_A agonists: barbiturates, benzodiazepines, tiagabine and vigabatrin, that increase GABA concentration at the synapse and topiramate, that enhances GABA currents (Chen et al., 2008; Greenfield, 2013).

4.1. DHF modulates synaptosomal membrane potential

DHF has been addressed as a GABA_A receptor modulator in a behavioral study using a fish model of neuronal depression, since FMZ administration accelerates the recovery from sedation and anesthesia induced by this compound (Garlet et al., 2016). Molecules that are capable to enhancing GABAergic currents by chloride influx induce a sustained cell hyperpolarization, which in turn inhibits voltage-dependent Ca^{2+}

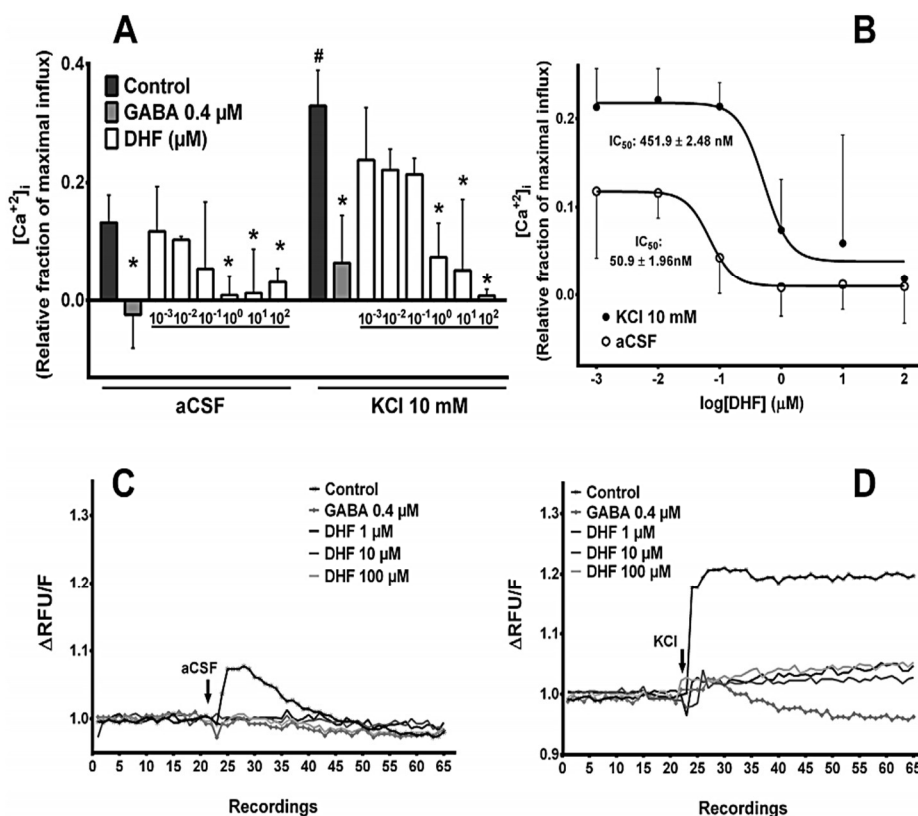


Fig. 5. Effect of DHF on aCSF- and KCl-evoked calcium mobilization. Data are presented as mean \pm SD ($n = 4$ in each experiment). (A) Calcium influx changes after vehicle (aCSF) or KCl application on synaptosomes pretreated with aCSF (control), GABA or DHF ($*p < 0.001$ versus the respective control group, $\#p < 0.001$ versus aCSF-control group, Tukey test). (B) Non-linear regression and IC_{50} values of DHF on calcium influx induced by application of aCSF ($r^2 = 0.52$; Hill slope: -2.25) or 10 mM KCl ($r^2 = 0.69$; Hill slope: -1.54). Calcium mobilization profile over time after aCSF (C) or KCl (D) addition.

influx and glutamate release from nerve terminals (Long et al., 2009). Here, we show that 0.1 μ M DHF directly applied on synaptosomes induces hyperpolarization, which lasted the whole recording time (Fig. 2A). Since concentrations higher than 0.1 μ M did not change *per se* the membrane potential, we supplemented the synaptosomal medium with 10 μ M GABA. In this condition, both 10 μ M DZP and 0.1–100 μ M DHF addition induced a decrease in fluorescence values. This current result supports a permissive role of GABA in the hyperpolarizing effect of DHF and are very similar to those obtained by White et al. (1997) with

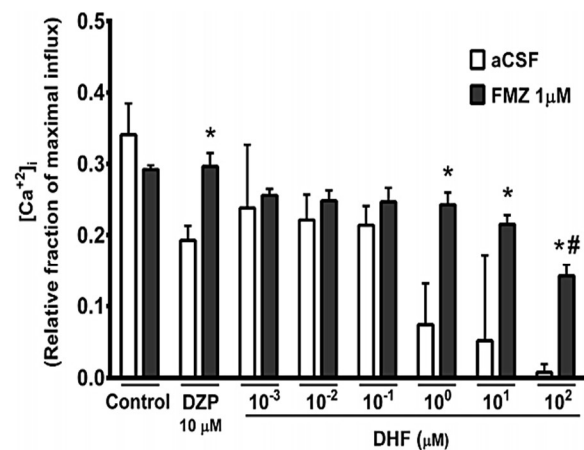


Fig. 6. Effect of DHF on KCl-evoked calcium mobilization in synaptosomes preincubated with vehicle (aCSF) or 1 μ M flumazenil (FMZ). Data are presented as mean \pm SD ($n = 4$; $*p < 0.001$ versus the respective aCSF group, $\#p < 0.001$ versus FMZ-control group, two-way ANOVA, Tukey test).

topiramate. Those authors demonstrated that topiramate has no effect *per se* on membrane potential. However, if 10 μ M GABA is added to the incubation medium, topiramate enhances GABA-mediated chloride flux in murine brain neurons. Therefore, one might reasonably propose that the hyperpolarizing effect of DHF at concentrations above 0.1 μ M depends on GABA (Fig. 2C) and involves GABA_A receptors, since it was prevented by flumazenil (Figs. 3 and 4).

We also investigated whether DHF prevented or attenuated KCl-induced depolarization in synaptosomes. We chose KCl as the depolarizing agent because high extracellular levels of K^+ are known to increase membrane excitability by disturbing the membrane potential (Checchetto et al., 2016). High extracellular potassium can mimic cellular alterations observed in pathological conditions, such as hypoxia, ischemia, hypoglycemia, depression and seizures (Romei et al., 2014; Köhling and Wolfart, 2016). Also, the KCl-induced hyperexcitability in synaptosomes is a widely-used method to investigate potential anti-seizure molecules (Lin et al., 2011b; Kuo et al., 2012; Chang et al., 2015a; Sitges et al., 2016). Incubation with 0.1–100 μ M DHF for 60 min blunted the KCl-induced depolarization. Since incubation with DHF did not change the membrane potential after vehicle application, its effects were also dependent on a depolarization event. Depolarization triggered by KCl addition activates downstream calcium influx and subsequently promotes neurotransmitter release, such as GABA, from synaptic vesicles (Kavalali, 2014). Our data show that 1–100 μ M DHF effect on membrane potential only occurs in medium supplemented with 10 μ M GABA. Thus, we hypothesized that may be the GABA released from synaptosomes after KCl-induced depolarization could boost DHF effect on membrane potential.

It is worth to highlight that the effect of DHF *per se* on membrane potential follow a non-linear pattern. In fact, we performed a regression analysis and we detected that DHF effect on membrane potential is

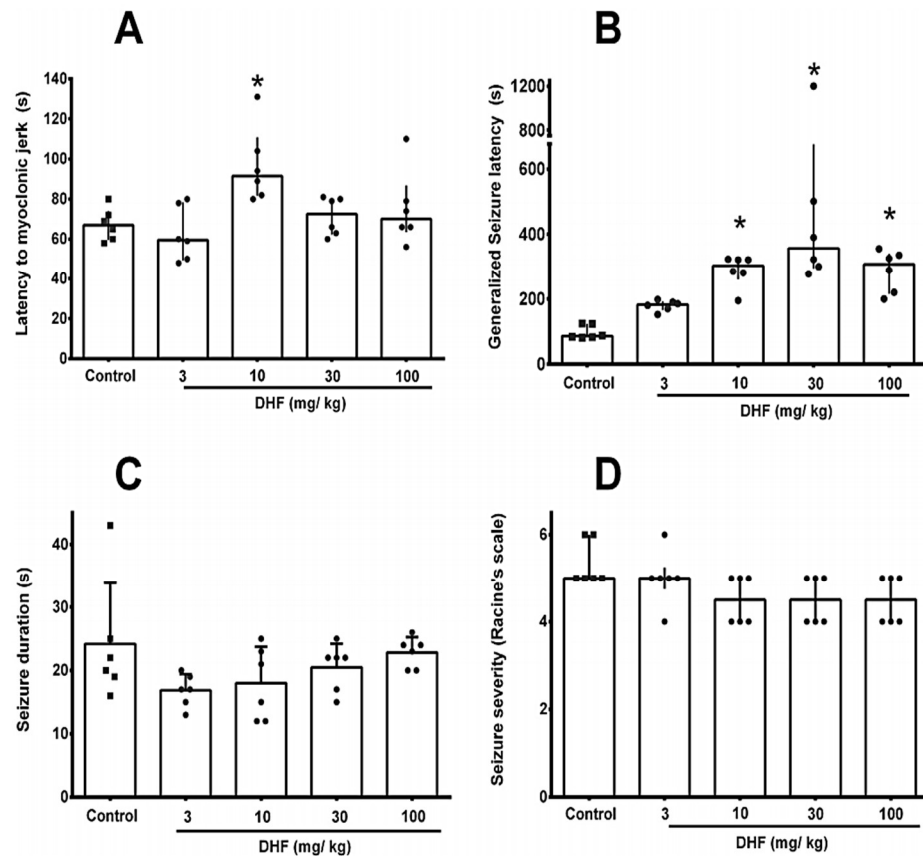


Fig. 7. Effect of acute DHF administration on the threshold for the onset of myoclonic jerks (A) and generalized tonic-clonic seizures (B) induced by 50 mg/kg PTZ, i.p. in mice. Data are presented as median \pm interquartile interval (A, B and D) or mean \pm SD (C), (n = 6). Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks, *p < 0.05 (A) and *p < 0.001 (B) versus control group, Dunnett test. (C) Seizure duration and (D) seizure severity based on Racine scale.

better described by a polynomial equation (Fig. S6). Literature reports that high LogP molecules, such as DHF, interact with the plasma membrane and accumulate in lipophilic cell/tissues. For this reason, lipophilic compounds tend to induce non-linear responses on biological systems, regardless their mechanism of action (Turina et al., 2006).

Neuronal hyperpolarization can result from several conditions, including enhancement of GABAergic-mediated chloride currents (Verkman and Galletta, 2009). Flumazenil, a classic GABA_A/benzodiazepine site antagonist, is a tool to identify benzodiazepine site modulators. FMZ possesses high affinity for the classical benzodiazepine site, but low efficacy on increase chloride conductance for the GABA_A receptor. For this reason, FMZ acts on GABA_A receptors as a null modulator that competes for the binding site with other benzodiazepine ligands, at low concentrations, and as a partial agonist at high concentrations (Weiss et al., 2002). A wide range of FMZ concentrations have been used to assess the mechanism of action of selected compounds. For example, diazepam-mediated GABA_A activation is inhibited by 0.25–25 μ M FMZ on mice slice organotypic culture (Drexler et al., 2010) and GABAergic currents elicited by natural compounds *in vitro* have been reported as sensitive to 1–10 μ M FMZ (Anzini et al., 2011; Abdelhalim et al., 2014). Accordingly, we performed a concentration-effect curve in order to establish an optimal FMZ concentration without *per se* activity on membrane potential. Here, the synaptosomal membrane hyperpolarization caused by DHF was prevented by 1 μ M FMZ. Furthermore, DHF was unable to induce hyperpolarization when applied on synaptosomes in a medium with low-chloride concentration. GABA_A-mediated inhibitory events are dependent on the chloride gradient between the extracellular and intracellular medium and under low or free chloride conditions GABAergic phasic inhibitory currents are impaired (Broch et al., 2002; Farrant and Nusser, 2005; Greenfield, 2013). In the present work, DHF

induced hyperpolarization in a FMZ-sensitive manner and this effect was dependent on the presence of chloride in the medium, suggesting that DHF effect was mediated by GABA_A receptors.

4.2. DHF effect on calcium influx

Calcium influx can be measured in neuronal cells or synaptosomes using fluorescent Ca²⁺-probes (Christie et al., 2011; Kuo et al., 2012; Baumgart et al., 2015). Here, we monitored the fluorescence increase resulting from calcium influx after KCl-induced depolarization. DHF incubated for 60 min blunted the KCl-induced depolarization effect, so we used the same incubation time to evaluate the DHF effect on synaptosomal calcium influx. We obtained evidence that DHF inhibits depolarization-evoked calcium influx in synaptosomes at a 1–100 μ M concentration range (Fig. 5). The DHF effect on membrane potential was observed at 0.1–100 μ M, however the modulation of depolarization-induced calcium influx only appeared above 1 μ M. One possible explanation for this inconsistency is that calcium influx can be triggered by the opening of several types of VGCC upon depolarization. Low-voltage VGCCs open at membrane potentials near to the resting level (around –60 to –70 mV) and inactivate rapidly. On the other hand, high-voltage VGCCs are activated at more depolarized potentials (above –40 mV) and exhibit variable but typically less rapid inactivation kinetics (Carbone and Lux, 1984; Carbone et al., 1997; Neumaier et al., 2015). Thus, we conjectured that only above 1 μ M the effect of DHF on synaptosomal membrane potential was enough to reach a membrane potential compatible with the VGCCs inactivation threshold. Additionally, 1 μ M FMZ prevented the 1–100 μ M DHF effect on calcium influx triggered by depolarization. Therefore, we hypothesize that DHF-mediated inhibition of synaptosomal KCl-induced calcium influx occurs

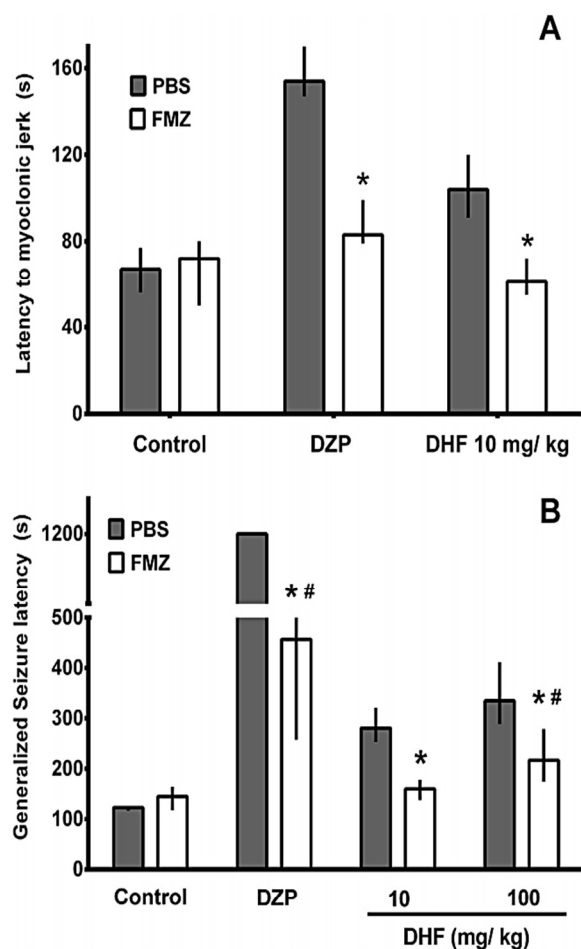


Fig. 8. Anticonvulsant effect of DHF is attenuated by FMZ. Latency for the onset of myoclonic jerks (A) and generalized tonic-clonic seizure (B) in mice injected with vehicle (PBS) or 2 mg/kg FMZ 15 min before 0.5 mg/kg DZP or DHF administration. Data are presented as median \pm interquartile interval ($n = 7$). * $p < 0.001$ versus PBS group within the same treatment, # $p < 0.001$ versus FMZ control group. Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* Mann-Whitney rank sum test with Bonferroni correction.

due to modulation of synaptosomal action potential during a depolarizing event and downstream Ca^{2+} influx through the inactivation of VGCCs. Nevertheless, we do not rule out that DHF interacts directly with calcium channels, since 1 μM FMZ did not fully prevent the effect of DHF on calcium influx. Moreover, other natural compounds with GABA_A modulatory properties also decrease calcium influx in synaptosomes through a GABAergic-independent pathway (Lin et al., 2012). Additionally, compounds with highly similar chemical structure to DHF have been addressed as VGCC blockers/modulators (Asakura et al., 1999; Asakura et al., 2000). For this reason, further studies are necessary to define whether DHF directly inhibits VGCCs.

Regardless the mechanism of action, several drugs are reported as calcium influx inhibitors and feasible to be applied for excessive neuronal excitability control. The GABA_A agonists thiopental and methohexital at 30 μM promoted a KCl-induced calcium influx inhibition of 50% (Miao et al., 1998). In the same way, sertraline (serotonin reuptake inhibitor) and vinpocetin (voltage-sensitive Na^{+} channels inhibitor) at 25 μM decrease calcium influx in about 50% (Sitges et al., 2016), levetiracetam (anticonvulsant) at 300 μM , 89% (Ozcan and Ayar, 2012); bupropion (norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor) at 50 μM , 18% (Lin et al., 2011b); the VGCC blockers: hispidulin (30 μM):

19% (Lin et al., 2012), tamoxifen (3 μM): 12% (Kuo et al., 2012), curcumin (6 μM): 14% (Lin et al., 2011a), hesperidin (50 μM): 12% (Chang et al., 2015a), myricetin (30 μM): 18% (Chang et al., 2015b) and quercetin (30 μM): 19% (Lu et al., 2013). Literature reports that an inhibition of 10–20% of calcium influx upon depolarization is enough to decrease glutamate release and corroborate to diminish neuronal hyperexcitability (Rogawski and Löscher, 2004; Lin et al., 2012; Kaminski et al., 2014; Steinlein, 2014; Chang et al., 2015a). Meanwhile, DHF inhibited 50% of KCl-induced calcium influx in synaptosomes at around 450 nM (Fig. 5) and, therefore, shows a therapeutic potential to control excessive neuronal activity.

4.3. DHF effect on behavioral model of seizure

The FMZ-sensitive effect of DHF on membrane potential and the DHF modulation of calcium influx in synaptosomes inspired us to further examine whether this compound also suppresses neuronal hyperexcitability *in vivo*. Therefore, we evaluated the effects of DHF pretreatment on the acute epileptic activity *in vivo* using pentylenetetrazole (PTZ). PTZ is a noncompetitive antagonist of GABA_A receptors, and its administration induces multiple spikes causing epileptiform activity in the hippocampus. In spite of some false-negative results reported, seizures chemically induced by PTZ is an established and widely used animal model for the evaluation of anticonvulsant drugs targeting GABA_A receptors (Huang et al., 2001; Lüttjohann et al., 2009; de Almeida et al., 2012; Löscher et al., 2013).

The acute administration of DHF delayed the onset of myoclonic jerks (10 mg/kg) and generalized tonic clonic seizures (10–100 mg/kg) in mice injected with PTZ. DHF effect on myoclonic jerks presented the same non-linear pattern observed on synaptosomal membrane potential under resting conditions (Fig. 2A). On the other hand, DHF-induced increase of latency to generalized seizures reached a plateau, where the same anticonvulsant effect was achieved in a large dose range (10–100 mg/kg). The DHF dose of 10 mg/kg exhibited protective effect from PTZ-induced convulsions without altering locomotor behavior (Fig. 9A, 9B). This phenomenon probably occurred because DHF at low doses may not interact with the GABA receptor subunits responsible for the sedative effects observed with classic benzodiazepine drugs (Wang et al., 2008). Conversely, DHF middle-high doses decrease animal ambulation, total number of fecal boli and exploratory behavior similarly to DZP, without altering its anticonvulsant efficacy, suggesting that the DHF-mediated sedation appears at higher doses than the anticonvulsant effect in mice.

In addition, we observed that 2 mg/kg FMZ blunted the DHF effect on PTZ-induced seizures indicating that the GABA_A/benzodiazepine site plays a role in DHF anticonvulsant activity. In this regard, it is worth pointing out that FMZ did not affect animal seizures *per se* (Fig. 8). This finding is also in agreement with the reports of null activity of (0.08–5.0 mg/kg) FMZ on PTZ-induced seizures (Hansen et al., 2004). Although DHF did not completely abolish seizures or affect seizure duration and severity, the increase in the latency to generalized seizures appeared at relatively low doses. Other natural compounds showed anticonvulsant properties in the PTZ animal model of seizures at higher doses, such as curcuminol (sesquiterpenoid VGCC blocker): 100 mg/kg, *i.p.* (Ding et al., 2014); isopulegol (monoterpenoid GABA_A positive modulator): 100 mg/kg (Silva et al., 2007); terpinen-4-ol (sedative monoterpenoid): 100 mg/kg (de Sousa et al., 2009; Silva et al., 2013); trimethoxycinnamic acid (simple phenolic compound and GABA_A positive modulator): 10–20 mg/kg (Chen et al., 2016); sparteine (alkaloid muscarinic modulator): 13 mg/kg (Villalpando-Vargas and Medina-Ceja, 2015); luteolin (antioxidant and anti-inflammatory flavonoid): 50 mg/kg (Zhen et al., 2016) and β -caryophyllene (sesquiterpene sedative compound): 100 mg/kg (Oliveira et al., 2016).

At last, we also assessed the effect of DHF on self-cleaning (grooming) and exploratory behavior. Grooming in animals is addressed as an innate behavior that is involved in hygiene maintenance

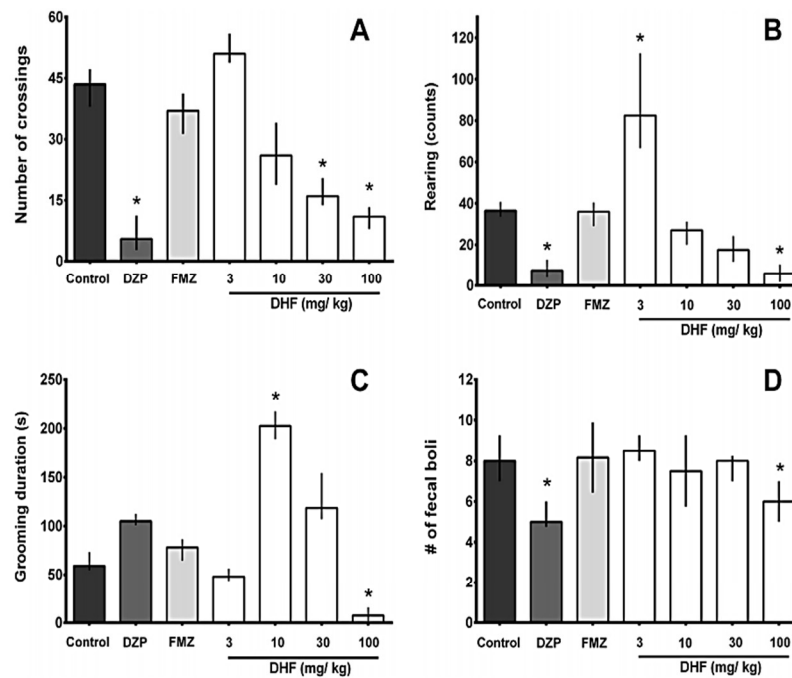


Fig. 9. DHF changes behavioral parameters in mice. Animals were observed during a 6 min interval, 24 min after DHF injection. Flumazenil (FMZ) and diazepam (DZP) doses were 2 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively. (A) Ambulatory activity expressed by the total number of quadrants overpassed. Total rearing (B) and grooming (C) behavior and the number of fecal boli after the end of the experiment (D). Data are presented as median \pm interquartile interval ($n = 6$), * $p < 0.001$ versus control group, Dunnett test.

and other physiologically important processes, including thermoregulation and social communication (Kalueff et al., 2016). GABAergic neurotransmission also contributes to the regulation of self-grooming. GABAa agonists generally modulate rodent self-grooming (Kalueff and Tuohimaa, 2005; Kalueff et al., 2016), however in the present work the positive control 0.5 mg/kg DZP did not change self-cleaning behavior. DZP-induced grooming increase has been observed only at doses higher than 2 mg/kg in mice (Carro-Juárez et al., 2012). In fact, 0.5 mg/kg DZP was described as exerting no effect on self-cleaning duration in mice (Kalueff and Tuohimaa, 2005). DHF increases grooming at 10 mg/kg and decreases this behavior at 100 mg/kg, demonstrating once more time a biphasic pattern. Increasing in self-grooming could result from low or high stress. In stressing situations, self-cleaning behavior is characterized by grooming bursts of short duration. The low-stress grooming is a spontaneous body care ritual, which occurs without interruption following the sequence paw licking to tail/genital wash (Kalueff and Tuohimaa, 2005). The pattern of grooming observed in animals injected with 10 mg/Kg DHF was continuous and followed the cephalocaudal direction, suggesting an anxiolytic effect. Moreover, the decrease in this behavior in animals injected with the highest dose of DHF likely occurred due to animal sedation. The lowest DHF dose tested (3 mg/kg) did not alter animal ambulation, self-cleaning behavior or the number of fecal boli, however it increased the number of rearing responses. Rearing behavior is a measure of exploratory activity and it has been shown to correspond to hippocampal electrical activity (van Lier et al., 2003). Nevertheless, GABAergic drugs show a variable profile of action on exploratory behavior. For instance, rearing behavior is increased in animals injected with the GABAa partial agonist bretazenil at low doses, the inverse agonist *n*-methyl- β -carboline-3- carboxamide and the full agonist oxazepam, while lorazepam and DZP reduce this behavior (Prut and Belzung, 2003). Since these drugs activate GABAa currents on distinct domains, the non-linear DHF effect on rearing behavior could be a result of interaction with multiple GABAa sites as the DHF dose increase. Therefore, more studies are necessary in order to clarify how the DHF interacts with the GABAa receptor subunits and its implications on the sedative and anticonvulsant effect of this compound.

5. Conclusion

Despite the previous evidence that DHF decreases Central Nervous System excitability, to the best of our knowledge, no study has investigated the effect of this natural product on seizures. In the present work, the DHF effect was detected *in vitro* and *in vivo* models of inhibition of neuronal hyperexcitability. DHF modulates synaptosomal membrane potential and depolarization-evoked calcium influx in a FMZ-sensitive way. Also, DHF has a protective effect against PTZ-induced convulsions and our results indicated that the molecular target underlying the anti-seizure efficacy of this compound is likely to be the facilitation of GABAergic neuronal inhibition. The present study highlights the therapeutic potential of DHF as a suppressor of neuronal excitability, which can be significant in the prevention and management of various neurological disorders, such as epilepsy.

Authorship contributions

Participated in research design: QIG, BMH, BB and CFM.

Conducted experiments: QIG, LCP, JRM, LHM.

Performed data analysis: QIG and CFM.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: QIG, BMH, BB and CFM.

Financial support

This research was supported by National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) scholarship. BMH, CFM and BB are recipients of productivity fellowships of CNPq (grant numbers 454447/2014-0, 307812/2014-6 and 301156/2012-3, respectively).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2017.07.010>.

References

- Abdelhalim, A., Chebib, M., Aburjai, T., Graham, A.R.J., Hanrahan, J.R., 2014. GABA_A receptor modulation by compounds isolated from *Salvia triloba* L. *Adv. Biol. Chem.* 4, 148–159.
- de Almeida, R.N., de Fátima Agra, M., Maior, F.N.S., de Sousa, D.P., 2012. Anticonvulsant activity of essential oils and their constituents. *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*, pp. 141–158.
- Anzini, M., Valenti, S., Braile, C., Cappelli, A., Vomero, S., Alcaro, S., Ortuso, F., Marinelli, L., Limongelli, V., Novellino, E., Betti, L., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Daniele, S., Martini, C., Ghelardini, C., Di Cesare Mannelli, L., Giorgi, G., Mascia, M.P., Biggio, G., 2011. New insight into the central benzodiazepine receptor-ligand interactions: design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 3-substituted 6-phenyl-4 H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepines and related compounds. *J. Med. Chem.* 54, 5694–5711.
- Asakura, K., Kanemasa, T., Minagawa, K., Kagawa, K., Ninomiya, M., 1999. The nonpeptide alpha-euodol from *Juniperus virginiana* Linn. (Cupressaceae) inhibits omega-gagatoxin IVA-sensitive Ca²⁺ currents and synaptosomal Ca²⁺ uptake. *Brain Res.* 823, 169–176.
- Asakura, K., Kanemasa, T., Minagawa, K., Kagawa, K., Yagami, T., Nakajima, M., Ninomiya, M., 2000. Alpha-eudesmol, a P/Q-type Ca²⁺ channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion. *Brain Res.* 873, 94–101.
- Barrie, A.P., Nicholls, D.G., Sanchez-Prieto, J., Sihra, T.S., 1991. An ion channel locus for the protein kinase C potentiation of transmitter glutamate release from guinea pig cerebrotal synaptosomes. *J. Neurochem.* 57, 1398–1404.
- Baumgart, J.P., Zhou, Z.-Y., Hara, M., Cook, D.C., Hoppa, M.B., Ryan Jr., T.A., H. C.H., 2015. Isoflurane inhibits synaptic vesicle exocytosis through reduced Ca²⁺ influx, not Ca²⁺-exocytosis coupling. *PNAS* 112, 11959–11964.
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Dhonnchadha, B.N., Hascöt, M., 2007. Animal models of anxiety in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 567–574.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Broch, L., Morales, R.D., Sandoval, A.V., Hedrick, M.S., 2002. Regulation of the respiratory central pattern generator by chloride-dependent inhibition during development in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J. Exp. Biol.* 205, 1161–1169.
- Carbone, E., Lux, H.D., 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca²⁺ channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501–502.
- Carbone, E., Lux, H.D., Carabelli, V., Aicardi, G., Zucker, H., 1997. Ca²⁺ and Na⁺ permeability of high-threshold Ca²⁺ channels and their voltage-dependent block by Mg²⁺ ions in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 504 (Pt 1), 1–15.
- Carro-Juárez, M., Rodríguez-Landa, J.F., Rodríguez-Peña, M.E.L., Rovirosa-Hernández, M.E.J., García-Orduña, F., 2012. The aqueous crude extract of *Montanoa frutescens* produces anxiolytic-like effects similarly to diazepam in Wistar rats: involvement of GABA_A receptor. *J. Ethnopharmacol.* 143, 592–598.
- Chang, C.Y., Lin, T.Y., Lu, C.W., Huang, S.K., Wang, Y.C., Chou, S.S., Wang, S.J., 2015a. Hesperidin inhibits glutamate release and exerts neuroprotection against excitotoxicity induced by kainic acid in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 50, 157–169.
- Chang, Y., Chang, C.Y., Wang, S.J., Huang, S.K., 2015b. Myricetin inhibits the release of glutamate in rat cerebrotal nerve terminals. *J. Med. Food* 18, 516–523.
- Checchetto, V., Teardo, E., Carraretto, L., Leanza, L., Szabo, I., 2016. Physiology of intracellular potassium channels: a unifying role as mediators of counterion fluxes? *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 1258–1266.
- Chen, C., Lang, S., Xu, G., Liu, X., Zuo, P., 2008. Effects of topiramate on seizure susceptibility in kainate-kindled rats: involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors. *Seizure* 17, 358–363.
- Chen, C.Y., Wei, X.D., Chen, C.R., 2016. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid, one of the constituents of *Polygalae Radix* exerts anti-seizure effects by modulating GABAergic systems in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 131, 1–5.
- Chinchilla, R., Nájera, C., Yus, M., 2005. Functionalized organolithium compounds in total synthesis. *Tetrahedron* 61, 3139–3176.
- Christie, J.M., Chiu, D.N., Jahr, C.E., 2011. Ca²⁺-dependent enhancement of release by subthreshold somatic depolarization. *Nat. Neurosci.* 14, 62–68.
- Ding, J., Wang, J.J., Huang, C., Wang, L., Deng, S., Xu, T.L., Ge, W.H., Li, W.G., Li, F., 2014. Curcumin from *Rhizoma Curcumae* suppresses epileptic seizure by facilitation of GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 81, 244–255.
- Drexler, B., Zinser, S., Hentschke, H., Antkowiak, B., 2010. Diazepam decreases action potential firing of neocortical neurons via two distinct mechanisms. *Anesth. Analg.* 111, 1394–1399.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Robinson, P.J., 2008. A rapid percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat. Protoc.* 3, 1718–1728.
- Erecińska, M., Nelson, D., Silver, I.A., 1996. Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes). *Biochim. Biophys. Acta* 1277, 13–34.
- European Pharmacopoeia, 2010. European Directorate for the quality of medicines. *Pharmacopoeia E*, 7th ed. (Strasbourg).
- Evans, G.J.O., 2015. Subcellular fractionation of the brain: preparation of synaptosomes and synaptic vesicles. *Cold Spring Harb Protoc* 2015, 462–466.
- Farrant, M., Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229.
- Fletcher, A., 2016. Action potential: generation and propagation. *Anaesth. Intensive Care Med.* 17, 204–208.
- Gabrielson, J., Weiner, D., 2002. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications*. Garnder's, UK.
- Gao, L., Li, S., 2016. Emerging drugs for partial-onset epilepsy: a review of brivaracetam. *Ther. Clin. Risk Manag.* 12, 719–734.
- Garlet, Q.I., Pires, L.C., Silva, D.T., Spall, S., Gressler, L.T., Bürger, M.E., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49, e4872.
- Goldberg, E.M., Coulter, D.A., 2013. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 337–349.
- González, M.I., Grabenstatter, H.L., Cea-Del Rio, C.A., Cruz Del Angel, Y., Carlsen, J., Laoprasert, R.P., White, A.M., Huntsman, M.M., Brooks-Kayal, A., 2015. Seizure-related regulation of GABA_A receptors in spontaneously epileptic rats. *Neurobiol. Dis.* 77, 246–256.
- Goodman, L.S., Grewal, M.S., Brown, W.C., Swinyard, E.A., 1953. Comparison of maximal seizures evoked by pentylentetrazol (metrazol) and electroshock in mice, and their modification by anticonvulsants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 108, 168–176.
- Greenfield Jr., L.J., 2013. Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABA_A receptors. *Seizure* 22, 589–600.
- Hamani, C., Mello, L.E., 1997. Status epilepticus induced by pilocarpine and picrotoxin. *Epilepsy Res.* 28, 73–82.
- Hansen, S.L., Sperling, B.B., Sanchez, C., 2004. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylentetrazole-kindled mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 105–113.
- Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Longhi, S.J., Silva, L.L., Bianchini, N.H., Garlet, Q.I., 2014. Método de Sedação e/ou Anestesia em Animais Aquáticos e o uso da Deidrofluquinona. Sedation and/or Anesthetic Method on Aquatic Animals and Dehydrofukinone Utilization (BR1020140136304).
- Hosseinzadeh, H., Parvardeh, S., 2004. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytotherapy* 11, 56–64.
- Huang, R.Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.I., Covey, D.F., Drewe, J.A., Dillon, G.H., 2001. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 986–995.
- Jung, R., 1958. Excitation, inhibition and coordination of cortical neurones. *Exp. Cell Res.* 14, 262–271.
- Kaluff, A.V., Tuohimaa, P., 2005. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 508, 147–153.
- Kaluff, A.V., Stewart, A.M., Song, C., Berridge, K.C., Graybiel, A.M., Fentress, J.C., 2016. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 45–59.
- Kamat, P.K., Kalani, A., Tyagi, N., 2014. Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain. *MethodsX* 1, 102–107.
- Kaminski, R.M., Rogawski, M.A., Klitgaard, H., 2014. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments. *Neurotherapeutics* 11, 385–400.
- Kammerer, M., Brawek, B., Freiman, T.M., Jackisch, R., Feuerstein, T.J., 2011. Effects of antiepileptic drugs on glutamate release from rat and human neocortical synaptosomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 383, 531–542.
- Kandratavicius, L., Balista, P.A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R.N., Umeoka, E.H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L.S., Leite, J.P., 2014. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 10, 1693–1705.
- Karl, T., Pabst, R., von Hörsten, S., 2003. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55, 69–83.
- Kavalali, E.T., 2014. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 5–16.
- Köhling, R., Wolfart, J., 2016. Potassium channels in epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a022871.
- Kulak, W., Sobaniec, W., Wojtal, K., Czuczwar, S.J., 2004. Calcium modulation in epilepsy. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 29–41.
- Kuo, J.R., Wang, C.C., Huang, S.K., Wang, S.J., 2012. Tamoxifen depresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ entry and protein kinase Calpha in rat cerebral cortex nerve terminals. *Neurochem. Int.* 60, 105–114.
- van Lier, H., Drinkenburg, W.H., Coenen, A.M., 2003. Strain differences in hippocampal EEG are related to strain differences in behaviour in rats. *Physiol. Behav.* 78, 91–97.
- Lin, T.Y., Lu, C.W., Wang, C.C., Wang, Y.C., Wang, S.J., 2011a. Curcumin inhibits glutamate release in nerve terminals from rat prefrontal cortex: possible relevance to its antidepressant mechanism. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1785–1793.
- Lin, T.Y., Yang, T.T., Lu, C.W., Wang, S.J., 2011b. Inhibition of glutamate release by bupropion in rat cerebral cortex nerve terminals. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 598–606.
- Lin, T.Y., Lu, C.W., Wang, C.C., Lu, J.F., Wang, S.J., 2012. Hispidulin inhibits the release of glutamate in rat cerebrotal nerve terminals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 233–243.
- Lin, T.Y., Huang, W.J., Wu, C.C., Lu, C.W., Wang, S.J., 2014. Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats. *PLoS One* 9, e88644.
- Lin, T.Y., Lu, C.W., Wu, C.C., Huang, S.K., Wang, S.J., 2015. Palmitoylethanolamide inhibits glutamate release in rat cerebrotal nerve terminals. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5555–5571.
- Liu, H., Song, Z., Liao, D.G., Zhang, T.Y., Liu, F., Zhuang, K., Luo, K., Yang, L., He, J., Lei, J.P., 2015. Anticonvulsant and sedative effects of Eudesin isolated from *Acorus tatarinowii* on mice and rats. *Phytother. Res.* 29, 996–1003.
- Lizarraga, E., Romano, E., Raschi, A.B., Leyton, P., Paipa, C., Catalán, C.A.N., Brandán, S.A., 2013. A structural and vibrational study of dehydrofukinone combining FTIR, FTRaman, UV-visible and NMR spectroscopies with DFT calculations. *J. Mol. Struct.* 1048, 331–338.

- Long, P., Mercer, A., Begum, R., Stephens, G.J., Sihra, T.S., Jovanovic, J.N., 2009. Nerve terminal GABA_A receptors activate Ca²⁺/calmodulin-dependent signaling to inhibit voltage-gated Ca²⁺ influx and glutamate release. *J. Biol. Chem.* 284, 8726–8737.
- Löscher, W., 1999. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog. Neurobiol.* 58, 31–59.
- Löscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20, 359–368.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., Schmidt, D., 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 757–776.
- Lu, C.W., Lin, T.Y., Wang, S.J., 2010. Memantine depresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ entry and protein kinase C in rat cerebral cortex nerve terminals: an NMDA receptor-independent mechanism. *Neurochem. Int.* 57, 168–176.
- Lu, C.W., Lin, T.Y., Wang, S.J., 2013. Quercetin inhibits depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals from rat cerebral cortex. *Neurotoxicology* 39, 1–9.
- Lüttjohann, A., Fabene, P.F., van Luijckelaar, G., 2009. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 98, 579–586.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J.H., Paladini, A.C., 2003. 6-Methylalipigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 537–545.
- Miao, N., Nagao, K., Lynch, C., 1998. Thiopental and methohexital depress Ca²⁺ entry into and glutamate release from cultured neurons. *Anesthesiology* 88, 1643–1653.
- Miceli, F., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., De Maria, M., Manocchio, L., Medoro, A., Tagliatalata, M., 2015. Molecular pathophysiology and pharmacology of the voltage-sensing module of neuronal ion channels. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–21.
- Morgan, I.G., 1976. Synaptosomes and cell separation. *Neuroscience* 1, 159–165.
- Moss, S.J., Smart, T.G., 2001. Constructing inhibitory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 240–250.
- Nagy, A., Delgado-Escueta, A.V., 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* 43, 1114–1123.
- Neher, E., Sakaba, T., 2008. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59, 861–872.
- Neumaier, F., Dibué-Adjei, M., Hescheler, J., Schneider, T., 2015. Voltage-gated calcium channels: determinants of channel function and modulation by inorganic cations. *Prog. Neurobiol.* 129, 1–36.
- Ochoa, J.G., Kilgo, W.A., 2016. The role of benzodiazepines in the treatment of epilepsy. *Curr. Treat. Options Neurol.* 18, 1–11.
- Oliveira, C.C., Oliveira, C.V., Grigoletto, J., Ribeiro, L.R., Funck, V.R., Grauncke, A.C., Souza, T.L., Souto, N.S., Furian, A.F., Menezes, I.R., Oliveira, M.S., 2016. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Behav.* 56, 26–31.
- Ozcan, M., Ayar, A., 2012. Modulation of action potential and calcium signaling by levetiracetam in rat sensory neurons. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 32, 156–162.
- Prince, D.A., Parada, I., Scalise, K., Graber, K., Jin, X., Shen, F., 2009. Epilepsy following cortical injury: cellular and molecular mechanisms as targets for potential prophylaxis. *Epilepsia* 50 (Suppl. 2), 30–40.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281–294.
- Rogawski, M.A., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 553–564.
- Romei, C., Sabolla, C., Raiteri, L., 2014. GABA release provoked by disturbed Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ homeostasis in cerebellar nerve endings: roles of Ca²⁺ channels, Na⁺/Ca²⁺ exchangers and GAT1 transporter reversal. *Neurochem. Int.* 72, 1–9.
- Schipper, S., Aalbers, M.W., Rijkers, K., Swijssen, A., Rigo, J.M., Hoogland, G., Vles, J.S., 2015. Tonic GABA receptors as potential target for the treatment of temporal lobe epilepsy. *Mol. Neurobiol.* 53, 5252–5265.
- Silbert, B.L., Heaton, A.E., Cash, R.F., James, I., Dunne, J.W., Lawn, N.D., Silbert, P.L., Mastaglia, F.L., Thickbroom, G.W., 2015. Evidence for an excitatory GABA_A response in human motor cortex in idiopathic generalised epilepsy. *Seizure* 26, 36–42.
- Silva, M.I.G., de Aquino Neto, M.R., Teixeira Neto, P.F., Moura, B.A., do Amaral, J.F., de Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M.M., de Sousa, F.C.F., 2007. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 141–176.
- Silva, L.L., Garlet, Q.L., Benovit, S.C., Dolci, G., Mallmann, C.A., Bürger, M.E., Baldisserotto, B., Longhi, S.J., Heinzmann, B.M., 2013. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 771–779.
- Sitges, M., Chiu, L.M., Reed, R.C., 2016. Effects of levetiracetam, carbamazepine, phenytoin, valproate, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate, vinpocetine and sertraline on presynaptic hippocampal Na⁺ and Ca²⁺ channels permeability. *Neurochem. Res.* 41, 758–769.
- de Sousa, D.P., Nóbrega, F.F., de Moraes, L.C., de Almeida, R.N., 2009. Evaluation of the anticonvulsant activity of terpinen-4-ol. *Z. Naturforsch. C* 64, 1–5.
- Staley, K., 2015. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat. Neurosci.* 18, 367–372.
- Steinlein, O.K., 2014. Calcium signaling and epilepsy. *Cell Tissue Res.* 357, 385–393.
- Tritsch, N.X., Granger, A.J., Sabatini, B.L., 2016. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 139–145.
- Turina, A.d.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A., 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, 101–113.
- Verkman, A.S., Galletta, L.J.V., 2009. Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 153–171.
- Villalpando-Vargas, F., Medina-Ceja, L., 2015. Effect of sparteine on status epilepticus induced in rats by pentylenetetrazole, pilocarpine and kainic acid. *Brain Res.* 1624, 59–70.
- Wang, F., Xu, Z., Ren, L., Tsang, S.Y., Xue, H., 2008. GABA A receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin. *Neuropharmacology* 55, 1231–1237.
- Weiss, M., Tikhonov, D., Buldakova, S., 2002. Effect of flumazenil on GABA_A receptors in isolated rat hippocampal neurons. *Neurochem. Res.* 27, 1605–1612.
- White, H.S., Brown, S.D., Woodhead, J.H., Skeen, G.A., Wolf, H.H., 1997. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res.* 28, 167–179.
- WHO, 2015. WHO Information Kit on Epilepsy. What You Can Do. p. 42.
- Zhang, N., Wei, W., Mody, I., Houser, C.R., 2007. Altered localization of GABA(A) receptor subunits on dentate granule cell dendrites influences tonic and phasic inhibition in a mouse model of epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 7520–7531.
- Zhen, J.L., Chang, Y.N., Qu, Z.Z., Fu, T., Liu, J.Q., Wang, W.P., 2016. Luteolin rescues pentylenetetrazole-induced cognitive impairment in epileptic rats by reducing oxidative stress and activating PKA/CREB/BDNF signaling. *Epilepsy Behav.* 57, 177–184.
- Zhou, C., Ding, L., Deel, M.E., Ferrick, E.A., Emeson, R.B., Gallagher, M.J., 2015. Altered intrathalamic GABA_A neurotransmission in a mouse model of a human genetic absence epilepsy syndrome. *Neurobiol. Dis.* 73, 407–417.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1. Phytochemical analysis

GC-MS was run in an Agilent 7890A gas chromatographer coupled to a 5975C mass selective detector using a non-polar DB5-MS fused silica capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness) and electron ionization mode at 70 eV. Helium was used as carrier gas in a flow rate of 1.0 ml min⁻¹, with injector, detector and interface temperature set at 250 °C and auxiliary temperature set at 280 °C. Oven temperature was kept at 40 °C for 4 min and raised to 320 °C at a rate of 4 °C min⁻¹. Sample solutions of 2 μL (2:1000 in hexane, v/v) were injected in split inlet mode (1:50 ratio). Kovats retention index was calculated using a homologous series of C7-C40 n-alkanes injected under the same conditions of the samples. DHF was identified by mass spectra and Kovats retention index comparison with data from the National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library (NIST, 2008), and with (ADAMS, R. P., 2009). DHF purity was estimated by under peak area integration obtained from TIC-chromatogram.

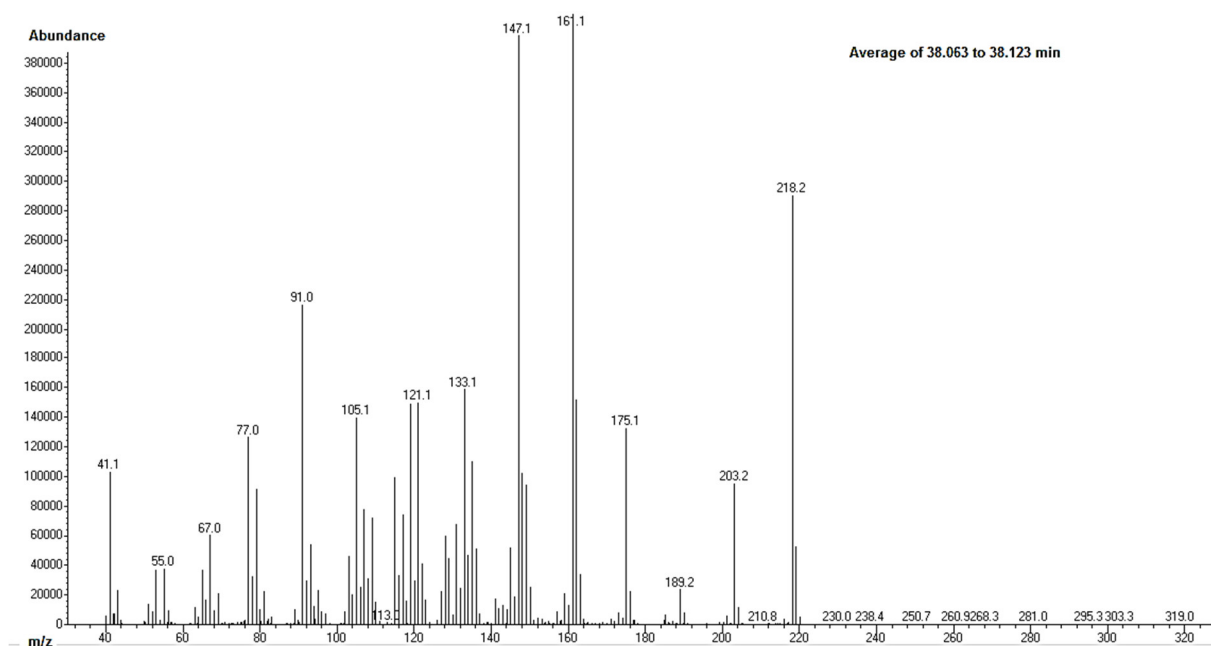


Figure S2. Mass fragmentation profile (average of 38.063 to 38.123 min) of dehydrofukinone (1.4a,5-Dimethyl-3-(1-methylethylidene)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-2(3H)-naphthalenone): 10 largest peaks in decrescent order of abundance (m/z): 161.1, 147.1, 218.2, 91.0, 133.1, 162.1, 121.1, 119.1, 105.1, 175.1. Base peak: 161.1 m/z; Molecular peak: 218.2 m/z (NIST, 2008).

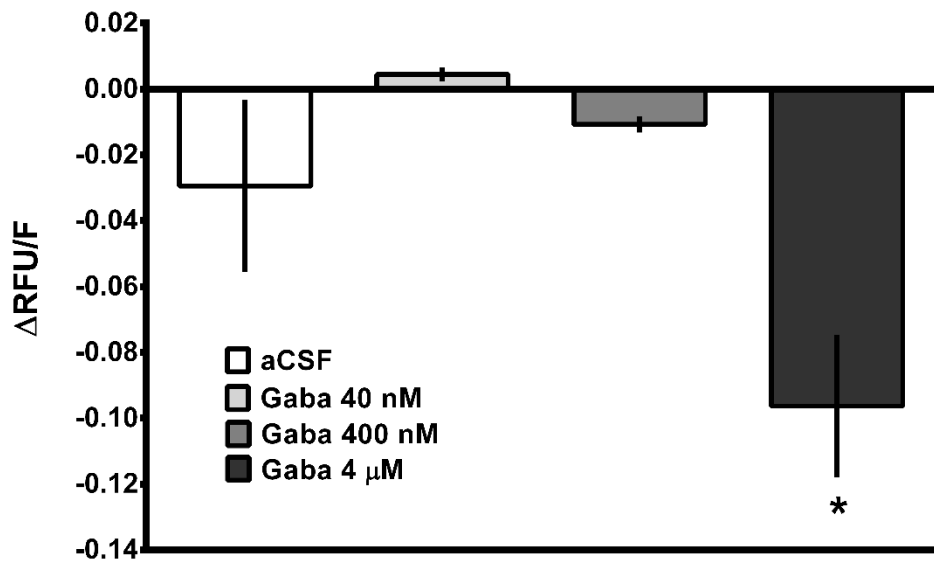


Figure S3. Membrane potential changes in synaptosomes after GABA addition.

* $p < 0.001$, one-way ANOVA, *post-hoc* of Dunnett, $F_{(3, 8)} = 20.41$.

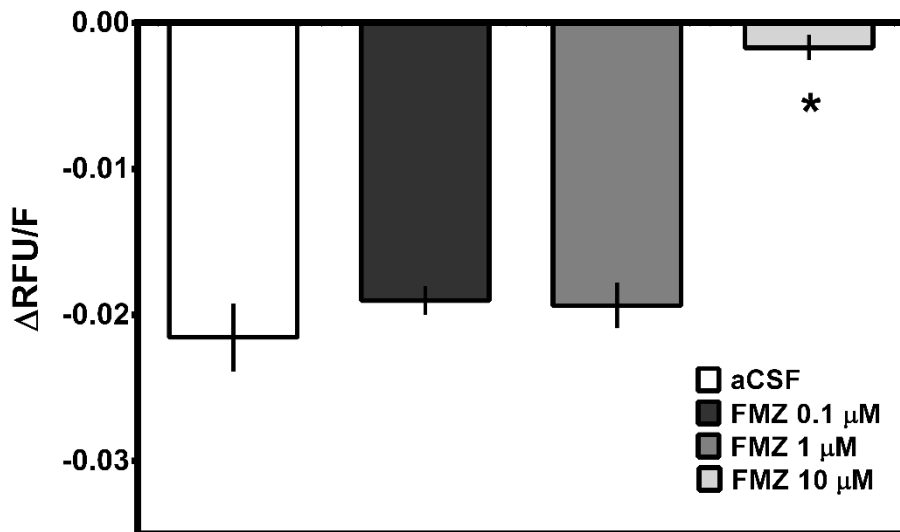


Figure S4. Membrane potential changes in synaptosomes incubated with flumazenil

(FMZ) 30 min before aCSF application. * $p < 0.0001$, one-way ANOVA, *post-hoc* of Dunnett,

$F_{(3, 8)} = 117.5$.

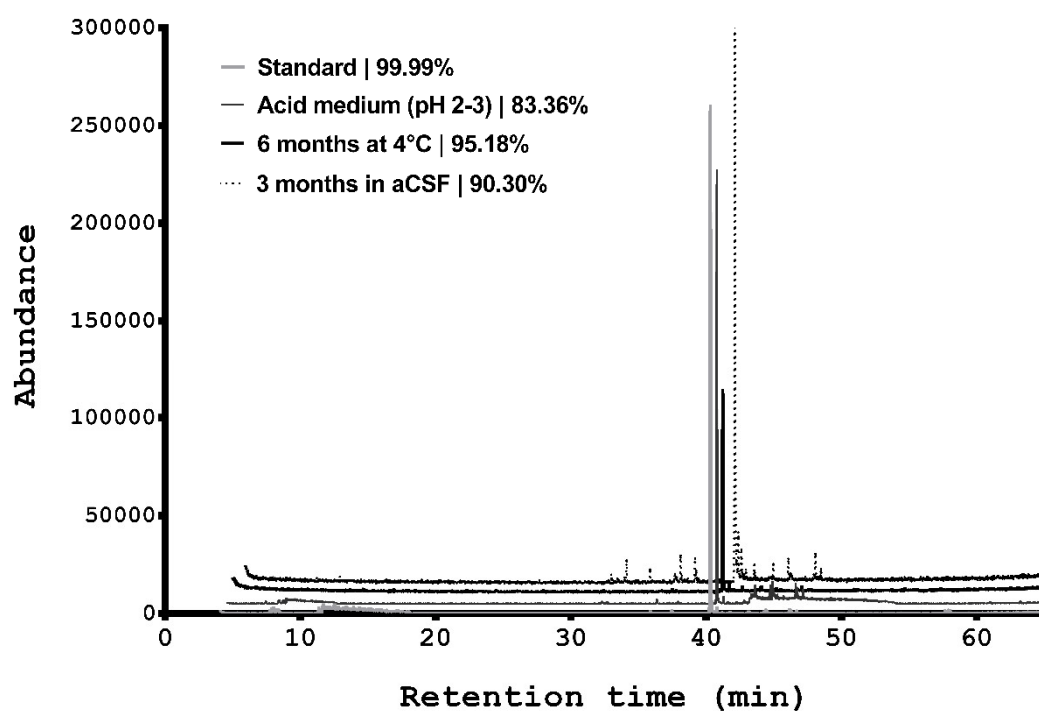


Figure S5. Stability profile of (+)-DHF. The chromatograms are obtained from DHF standard molecule (kept at -20°C) or DHF in acid medium (1h), 6 months at refrigerated temperature (4°C) and 3 months in artificial cerebrospinal fluid (aCSF).

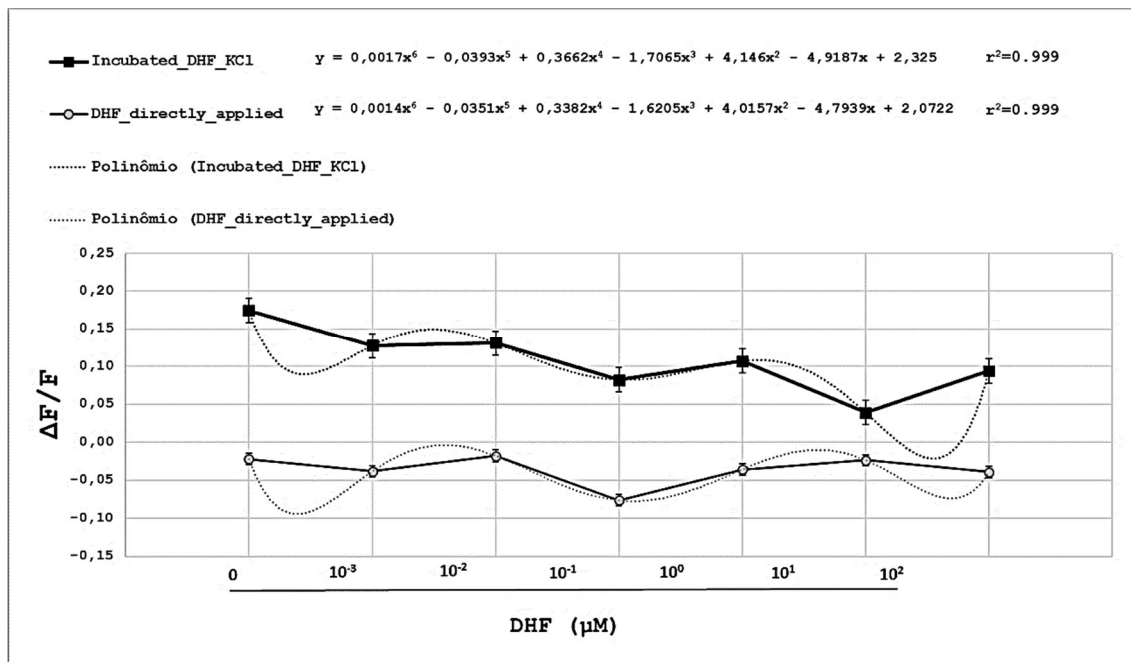


Figure S6. Regression analysis shows DHF effect fitting in a polynomial equation. Data are presented as mean \pm SEM. Black thick line (square symbol) indicates DHF performance on synaptosomal membrane potential when preincubated for 60 min followed by KCl addition. Black thin line (grey circle) indicates DHF performance on membrane potential when directly applied on synaptosomes. Discontinuous lines indicate the respective trend lines.

6 MANUSCRITO 1

Manuscrito submetido no periódico Psychopharmacology (ISSN: 0033-3158).

GABA_A receptor subunits expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) brain and its modulation by *Nectandra grandiflora* essential oil and its isolated compounds

Quelen I. Garlet¹; Carine F. Souza¹; Patrícia Rodrigues¹; Sharine N. Descovi²; Gonzalo Martinez-Rodríguez³; Bernardo Baldisserotto¹; Berta M. Heinzmann^{1*}

¹Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Zootechny Course, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Institute of Marine Sciences of Andalucía (ICMAN-CSIC), Puerto Real, Cádiz, Spain

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) scholarship. BMH and BB are recipients of productivity fellowships of CNPq (grant numbers 454447/2014-0 and 301156/2012-3, respectively).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Rationale. Studies using silver catfish (*Rhamdia quelen*) as experimental models are often applied to screen essential oils (EO) with GABAergic-mediated effects. However, the expression of the GABA_A receptors in this species have not been reported.

Objectives. This work aimed to assess the expression of GABA_A receptors subunits in the silver catfish brain. We evaluate the long-term effect of the *Nectandra grandiflora* EO and its isolated compounds (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM), and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL). The action mechanism of the compounds was assessed.

Methods. Sustained fish sedation (24 h) were evaluated in immersion bath with diazepam (DZP), EO or compounds. Fish sedated with compounds were led to a recovery bath containing flumazenil (FMZ). The expression of the GABA_A receptor subunits-encoding genes *gabra1*, *gabra2*, *gabra3*, *gabrb1*, *gabrd* and *gabrg2* in the silver catfish brain were assessed by real time PCR.

Results. EO and compounds induced sustained sedation in fish. ERM- and DFX-sedated fish recovered faster when exposed to FMZ. Real-time PCR detected the mRNA expression of all targeted genes in *R. quelen* brain. DZP increased the expression of the *gabra2*, *gabra3*, *gabrb1*, *gabrd* and *gabrg2*. The expression of *gabra1* was decreased in fish sedated with DFX; EO increased *gabra2* expression; SEL increased *gabrb1*, *gabrd* and *gabrg2* expression.

Conclusions. EO, SEL, ERM and DFX sedative effects are likely resulting from the interaction with the GABAergic system. Our findings support the use of the silver catfish as robust and reliable experimental model to evaluate the efficacy of drugs with putative GABAergic-mediated effects.

Keywords: Sedation. *Gabra1*. *Gabra2*. *Gabra3*. *Gabrb1*. *Gabrd*. *Gabrg2*. Fish.

INTRODUCTION

Essential oils (EOs) are a class of substances originated from plant secondary metabolism (Sharifi-Rad et al. 2017). As a phytocomplex, EOs contain a large number of compounds that vary depending of the plant species in which they are produced (Figueiredo et al. 2008). These EOs and their derived compounds are widely reported as pharmacological active molecules with particular activity on the Central Nervous System (CNS) (Bakkali et al. 2008; de Almeida et al. 2011; de Sousa et al. 2015; de Sousa et al. 2012). The EOs and EO-derived compounds are applied as health-promoting agents for humans and animals due to their antidepressant, sedative and anxiolytic effects (Ali et al. 2015; Dobetsberger and Buchbauer 2011; Saiyudthong et al. 2016; Setzer 2009). Accordingly, several EO and EO-derived constituents have reached clinical efficacy in the treatment of anxiety disorders (Baldinger et al. 2015; de Sousa et al. 2015), which encourages the incessant research around the pharmacological properties of these compounds.

The Brazilian flora is permeated with plants that produce EOs with biological activities (Bizzo et al. 2009). Among the native species from Brazil, *Nectandra grandiflora* Nees has been recently studied regarding its neuronal depressant effects (Barbas et al. 2017; Garlet et al. 2016). The major constituent of the *N. grandiflora* EO is the sesquiterpenoid dehydrofukinone (DHF), which induces sedation/anesthesia in silver catfish and anticonvulsant effects in mice through GABAergic mechanisms. Recently, other DHF-related sesquiterpenoids have been identified in the EO of *N. grandiflora*, such as (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM), and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) (Silva 2017). Although previous studies of our research group showed that these compounds have sedative effects (D. T. Silva, Q. I. Garlet, L. L. Silva, L. Pires, N. H. Bianchini, A. C. F. Amaral, B. Baldisserotto, S. Longhi, B. M. Heinzmann, unpublished observations), the mechanisms of action by which they induce neuronal depression remain unknown.

Preclinical studies have extensively explored the CNS effects of EO-derived substances using different animal models, such as rats, mice, guinea pigs and fish (Sharifi-Rad et al. 2017; Tsuchiya 2017). Pharmacological studies using fish as experimental models have been expanding due to the consistent results obtained for drug efficacy in fish species (Bauquier et al. 2013; Baxendale et al. 2012; Bencan et al. 2009; Bowker et al. 2014; Collymore et al. 2014; de Freitas Souza et al. 2018b; Delgado and Schmachtenberg 2008; Facciolo et al. 2012; Fogliarini et al. 2017; Grossman et al. 2011). Additionally, the inclusion of fish species as

experimental animals in the preclinical research chain (*in vitro*> alternative models (fish)> mammals> humans) supports the 3 Rs policy (replacement, reduction and refinement) of animal use in scientific research (Guhad 2005; MacArthur Clark 2017). In this regard, the freshwater silver catfish (*Rhamdia quelen*) has been reported as a suitable species for pharmacological studies due to its easy cultivation and reproduction and the large range of size/weight (from juveniles (1-2 g) to adult fish (up to 3 kg)), which provide its use in different types of research approaches (Gomes et al. 2000). Studies using the silver cat fish are especially focused in the research of new sedatives and anesthetics from natural sources. Recently, several studies have explored the EOs effect on the GABAergic system, recording silver catfish behavior under immersion bath in water containing GABA_A receptors antagonists (Bianchini et al. 2017; Garlet et al. 2016; Heldwein et al. 2012; Silva et al. 2012). Nevertheless, there is no previous evidence of the GABA_A receptors expression in the *R. quelen* brain. Therefore, the present work aimed to evaluate the long-term effect of the *N. grandiflora* EO and the isolated compounds ERM, DFX and SEL in silver catfish, as well as elucidate the action mechanisms of these substances using different experimental approaches. For this purpose, we exposed ERM-, DFX- and SEL-sedated fish to the GABA_A receptor antagonist flumazenil. Additionally, we made use of molecular assay to confirm whether the silver catfish expressed the GABA_A receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, δ and $\gamma 2$, which are associated with sedation/anesthetic process and/or neurological diseases, such as epilepsy and anxiety disorders. Furthermore, we evaluated how these proteins are expressed in EO/compounds-sedated fish.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and essential oil (EO) extraction

Nectandra grandiflora leaves were collected at the coordinates 29°26'25.09" S and 54°40'27.73" W (Jaguari, State of Rio Grande do Sul, Brazil) and a specimen, botanically identified by Solon Jonas Longhi, was deposited at the Herbarium of the Biology Department at the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil (SMDB 13.162). Access to the national genetic patrimony was given by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil: #010191/2014-3). EO was extracted for 3 h by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus, in triplicate (European Pharmacopoeia, 2010) and stored in a light-proof container at -4 °C until chemical analysis and *in vivo* assays.

EO compounds purification and chromatography analysis

EO and compounds were identified and quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) method (Table 1). The compounds (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) or (+)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) were isolated from the EO by a series of chromatographic columns using silica gel 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) as stationary phase and solvent mixture as mobile phase. Column fractions were grouped according with their elution profile using thin layer chromatography (silica gel 60 F254 chromatoplates; spots detection: vanillin sulfuric acid under UV radiation at 365 nm) and concentrated at 38 °C under reduced pressure. Purified compound samples were stored at -4 °C until chromatographic analysis. EO or compounds samples (2 μ L; 2:1000 in hexane, v/v) were run in an Agilent 7890A gas chromatographer coupled to a 5975C mass selective detector using a non-polar DB5-MS fused silica capillary column (5 % phenyl, 95 % methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness) and electron ionization mode at 70 eV. Helium was used as carrier gas in a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, with injector, detector and interface temperature set at 250 °C and auxiliary temperature set at 280 °C. Oven temperature was kept at 40 °C for 4 min and raised to 320 °C at a rate of 4 °C min⁻¹. Sample injections were performed in split inlet mode (1:50 ratio). Kovats retention index was calculated using a homologous series of C7-C40 n-alkanes injected under the same conditions of the samples. *N. grandiflora* EO compounds were identified by mass spectra and Kovats retention index, comparing with data from the Mass Spectral Library from the National Institute of Standards and Technology (Nist, 2008) and with (Adams, 2009). Compounds purity was estimated by integration of the area under the peak, obtained from TIC-chromatogram, as DHF (99.98 %), DFX (96.5 %), ERM (99.5 %) and SEL (97.03 %).

Drugs

Diazepam (DZP, Germed Pharma®, Brazil) suspension in ultrapure water containing 0.02 % Tween 80 was added into the aquarium water to a final concentration of 25 or 40 mg/L according to experiments. Flumazenil (FMZ; Flumazil®, injectable solution, Cristália, Brazil, 0.1 mg/mL) was directly added into the water to a final concentration of 1.5 mg/L. EO and isolated compounds were diluted in 500 μ L of ethanol 95 % and actively homogenized in vortex homogenizer equipment before they were added into the aquarium water at its respective concentrations. In all experiments, a satellite group (n=8-12) was evaluated in a bath containing 500 μ L of ethanol and 0.02 % Tween 80 (in a solution of the same volume as that used to DZP dilution).

Animals

Juveniles of silver catfish, purchased from a local fish farm, were transported to the Fish Physiology Laboratory (Federal University of Santa Maria, Brazil), where they were placed in a continuously aerated 250 L tanks under a water circulation system with 50 % of the water renovated every 2 days to avoid ammonia toxicity. Room temperature was maintained at 24 ± 1 °C and fish were exposed to light only during management and experiments. Water parameters were controlled as following: dissolved oxygen (7.17 ± 0.05 mg/L) and temperature (21.57 ± 0.41 °C) were measured with a YSI oxygen meter (Model Y5512); pH (7.18 ± 0.10) was measured with a DMPH-2 pH meter. Total ammonia levels (0.81 ± 0.15 mg/L) were assessed by the salicylate method (Verdouw et al. 1978). Fish were fed once a day with commercial feed (28 % crude protein) and they were fasted for a 24 h period prior experiments. At the end of the experiments animals were anesthetized with eugenol 50 mg/L (Cunha et al. 2010b) and killed by medullar section. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in this study. The Ethical and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (Process #74/2014) approved the applied protocol.

Long-term exposure to sedatives

For the long-term exposure (> 30 min) assay, silver catfish juveniles ($n=8$; 4.3 ± 0.11 g; 7.1 ± 0.15 cm) were sedated with 40 mg/L EO, and 12,5 and 25 mg/L SEL, ERM or DFX during 24 h in 1 L aquaria without water change during the observation period. Additionally, we evaluated a control group in a drug-free aquarium, a sham group (treated with vehicle) and a group that was sedated with 25 mg/L DZP, which was used as positive control. Animals behavior were observed at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h and scored with the behavioral scale for fish sedation adapted from Heldwein et al. (2012), as follows: 0: anesthesia, no movement, fish without swimming ability or reflex to contact stimuli on the caudal peduncle; 0.5: caudal peduncle stimulus reflex; 1: spontaneous movement and with loss of posture, turns sideways for swimming; 2: normal swimming without external stimulus reflex (tested by hitting a glass rod on the bottom of the aquarium); 3: normal swimming with external stimulus reflex. Scores from each animal through the sedation period were subjected to an Area Under the Curve (AUC) analysis, and the results were used for statistical analysis of variance (ANOVA). After the 24 h sedation period, animals were grouped back to original experimental group tanks for a 48 h recovery period for visual observation of side effects such as mucous loss, muscle spasms

and signs of infection. Mortality was also observed and recorded during the sedation and recovery period.

GABA_A receptors role in the sedative effects by SEL, ERM and DFX

We next evaluated whether the recovery of the sedation induced by SEL, ERM or DFX in fish could be facilitated in the presence of the GABA_A/benzodiazepine site antagonist, flumazenil (FMZ). For this purpose, silver catfish juveniles (n=12; 4.5 ± 0.16 g; 7.7 ± 0.12 cm) were individually placed in a drug-free bath or in a sedation bath during 30 min with 100-200 mg/L SEL or ERM, 50-100 mg/L DFX or 40 mg/L DZP, used as standard sedative (Garlet et al. 2016; Heldwein et al. 2012; Silva et al. 2013). Sedated animals were transferred (1-2 s) for the recovery bath in water (n=6) or 1.5 mg/L FMZ. Total recovery time were set at 30 min and at the times of 1, 5, 10, 15, 20 and 30 min animals were observed and their behavior was scored following the scale described above. Scores from each animal through the recovery period were subjected to an AUC (area under the curve) analysis and these measures were used for statistical analysis of variance (two-way ANOVA).

GABA_A receptors subunits expression in silver catfish brain

Furthermore, we verified whether the GABA_A receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, δ and $\gamma 2$ were conserved in the *Rhamdia quelen* species. Moreover, we evaluated whether the GABA_A/benzodiazepine site agonist DZP or the EO and its isolated compounds could alter the mRNA expression of the above mentioned GABA_A receptor subunits. To that end, we performed a pilot experiment to detect the presence of the target proteins in this fish species (n=4) before proceeding to the pharmacological approach (data not shown). Subsequently, we established a protocol in which fish (2.9 ± 0.32 g; 5.8 ± 0.13 cm, n=6) were sedated during 4 h with 25 mg/L DZP, 40 mg/L OE, 20 mg/L DHF or 25 mg/L DFX, ERM or SEL. After this sedation period, fish were killed by medullar section and the brain were dissected and immediately transferred to an eppendorf[®] tube containing 750 μ L of Trizol[®] for RNA extraction, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until total RNA extraction and PCR analysis.

Real-time quantitative PCR (qPCR) assay

After total RNA extraction, quantification of RNA was performed using a NanoDrop spectrophotometer, and the RNA purity was assessed by the 260/280 nm absorbance ratio (Thermo Scientific, Delaware, USA). RNA was treated with 0.1 U DNase Amplification Grade

(Invitrogen) for 15 min at 27 °C, followed by DNase inactivation with 1 µL of EDTA at 65 °C for 10 min. Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 500 ng of total RNA with random hexamer primers using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were conducted in a CFX384 thermocycler (BioRad) using BRYT Green® dye and Taq DNA polymerase from GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation), with 5 ng of cDNA in 10 µL. A common thermal cycling program (initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 30 s) was used to amplify each transcript. The product identity was confirmed by a melting curve analysis. We analyzed the mRNA expression of the genes that encode different GABA_A receptor subunits: gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 1 subunit (*gabral*, GenBank acc. no. MK175055), gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 2 subunit (*gabral2*, GenBank acc. no. MK175056), gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 3 subunit (*gabral3*, GenBank acc. no. MK175057), gamma-aminobutyric acid type A receptor beta 1 subunit (*gabbr1*, GenBank acc. no. MK175058), gamma-aminobutyric acid type A receptor delta subunit (*gabbrd*, GenBank acc. no. MK175059), gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma 2 subunit (*gabrg2*, GenBank acc. no. MK175060). Nucleotide sequences are displayed in Table 2. The primers of elongation factor 1 alpha (*ef1a*, GenBank acc. no. MH107165) and β-actin (*actb*, GenBank acc. no. KC195970), used as internal reference controls, were taken from de Freitas Souza et al. (2018b) with stability values (variance coefficient) of 0.33 (0.12) and 0.33 (0.11), respectively. For determining the sequences of all other studied genes, samples of brain were sent to Bioarray (Spain), where a RNAseq experiment was performed by NGS mass sequencing, using the Illumina TruSeq® Stranded mRNA HT kit for the capture and amplification of the mRNA. After, sequencing was performed on an Illumina NextSeq500 sequencer in 2x75 mode. To obtain the sequences, a new alignment was performed with the Trinity software, combining the sequences of the three tissues, annotating the transcripts with the Blast2GO software (Conesa et al. 2005). Once the genes of interest were found, additional blast analyses for nucleotides and putative proteins, as well as alignments of the genes of interest against the ones from related species, were performed. Primers were then designed using the Primer Express software 3.3 (Applied Biosystems). Primers were validated by standard curves. Reactions with a coefficient of determination (R²) higher than 0.98 and efficiency between 85 to 110 % were considered optimized. Samples were run in duplicate and the results are expressed relative to *actb* and *ef1a* expression levels. Data were then normalized to a calibrator sample using $\Delta\Delta Cq$ method as previously described (Pfaffl, 2011).

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm standard error mean (SEM) or median \pm interquartile interval (non-parametric data). Homogeneity of variances and normality were evaluated by Levene and Shapiro-Wilk tests, respectively. Parametric data were submitted to one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test and non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's or Tukey test (one factor experimental design) or Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test, followed by Bonferroni correction (two factors experimental design). Survival were analyzed by the Mantel-Haenszel approach using the log-rank test of Mantel-Cox (Machin et al. 2006). Statistical analysis was carried out using SigmaPlot 11.0 software or GraphPad Prism version 6.01 and the minimum significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

EO and SEL, ERM and DFX induced a sustained sedation on fish

As expected, DZP induced a sustained sedation with loss of swimming posture (scores 0.5 to 1) during the whole 24 h test. The sedation profile of fish during 24 h-immersion bath in 40 mg/L EO were characterized by a 4 h sedation with loss of equilibrium (scores: 0.5 to 1) followed by a slow decrease of the sedation state until the end of the test (Figure 1A). Fish exposed to the EO did not return to normal behavior (score 3) during the 24 h-sedation bath, remaining under light sedation (score 2) in the last 12 h of the test. On the other hand, we observed a different pattern in the long-term sedation among the isolated compounds. Fish exposed to 12.5 mg/L SEL were under light sedation for a short period of 1 h and then returned to normal behavior (Figure 1B). The increase in the SEL concentration to 25 mg/L provide a more sustained sedation with a 4 h-sedation with loss of posture followed by a 2 h-period of light sedation and normal behavior in the last 14 h of the test. Both ERM concentrations induced a 1 h-period of sedation associated with loss of posture (Figure 1C). While fish exposed to 25 mg/L ERM remained in this sedation stage during 8 h, fish under 12.5 mg/L ERM recovered swimming equilibrium after 2 h of sedation bath. However, at the end of the 24 h-immersion bath, both groups reached normal behavior. The compound DFX induced a 2 h-period of sedation associated with loss of posture in both concentrations (Figure 1D). This sedation stage was sustained for 12 h in fish under 25 mg/L DFX immersion bath, which was similar to the sedation induced by DZP. Fish exposed to 12.5 mg/L DFX recovered swimming posture after

4 h and remained in this sedation stage for the last 20 h. Accordingly, the AUC results showed that the behavior of fish exposed to 40 mg/L EO, 25 mg/L SEL or ERM and DFX in both concentrations during 4 h were significantly different from the control group ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test, Dunn's test, Figure 1E). Additionally, the EO- and 25 mg/L ERM-, SEL- and DFX-induced sedation were similar to DZP. Accordingly, after 24 h of immersion in the sedation bath, EO, DFX and 25 mg/L ERM induced a fish behavior significantly different from control group and similar to DZP ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test, Dunn's test, Figure 1F). Furthermore, during the 24 h-sedation bath, fish exposed to EO, SEL, ERM and DFX had 100 % survival and no signs of apparent toxicity, while DZP group survival was 66.7 ± 13.6 % (Figure 2). Survival of DZP and 25 mg/L DFX during the 48 h-recovery bath was 66.7 ± 13.6 % and 87.5 ± 11.7 %, respectively ($p < 0.001$, $\chi^2 = 37.31$, Mantel-Cox log-rank test).

GABA_A receptor role in the SEL-, ERM- and DFX-induced sedation

In this experiment we evaluated whether the FMZ could facilitate the fish recovery from sedation induced by the compounds SEL, ERM and DFX. Fish exposed to FMZ did not show any altered behavior compared to control group and DZP-sedated fish recovery faster when in FMZ-recovery immersion bath (Figure 3A, E), according to previous reports (Garlet et al. 2016; Heldwein et al. 2012; Silva et al. 2013). The presence of FMZ in the immersion bath did not alter the recovery of fish sedated with SEL (Figures 3B, E). On the other hand, the AUC from fish behavioral scores during the 30 min-recovery from ERM- and DFX-induced sedation in water were significantly different from the FMZ-recovery group ($p < 0.01$, Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction, $H_{(1, 80)} = 4.63$, Figures 3C, D and E). Taken together, these results indicate an influence of the GABA/benzodiazepine site antagonist, FMZ, in fish recovery from sedation induced by ERM and DFX.

GABA_A receptor subunits expression in silver catfish

The real-time PCR results detected the expression of the transcripts from GABA_A receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, δ and $\gamma 2$ in the *Rhamdia quelen* brain (Figure 4). The positive control DZP increased the *gabra2*, *gabra3*, *gabrb1*, *gabrd* and *gabrg2* mRNA expression ($p < 0.001$, one-way ANOVA, Dunnet's test, Figure 4A-F). However, it did not alter the expression of the transcript from $\alpha 1$ subunit encoded by the *gabral* gene. The genes that encode the referred GABA_A receptor subunits are modulated by the *N. grandiflora* EO and its isolated compounds in specific ways. Expression from *gabral* mRNA was downregulated in fish sedated with 25 mg/L ERM ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(6, 35)} = 3.11$, Figure

4A). This compound was the only treatment that altered *gabral* expression. We detected an increase in *gabra2* expression in the brain from fish sedated with 40 mg/L EO ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(6, 35)} = 6.44$, Figure 4B). An upregulation of the genes *gabbr1* ($F_{(6, 35)} = 4.53$, Figure 4D), *gabbrd* ($F_{(6, 35)} = 5.53$, Figure 4E) and *gabrg2* ($F_{(6, 35)} = 3.28$, Figure 4F) ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnet's test) was observed in the fish sedated during 4 h with SEL. Exposure to compounds DHF and DFX did not alter the brain expression of any silver catfish/GABA_A receptor subunits tested in this study.

DISCUSSION

In the current study we showed some findings regarding the pharmacological effects of *N. grandiflora* EO and isolated compounds on the CNS of the silver catfish used as experimental model. It is worth to highlight that our results provided for the first time the experimental evidence that the species *R. quelen* express genes that encode GABA_A receptor subunits with major relevance for neurological diseases and for the action of CNS depressants. Furthermore, EO and compounds treatments induced sustained sedation on fish likely through the agonism on the GABA_A receptors as well as the modulation of the GABA_A receptor subunits expression.

The long-term exposure assay aimed to evaluate whether the prolonged contact of fish with the EO and the compounds SEL, ERM e DFX would be able to induce apparent side effects and/or progression in the sedation level through time. This assay has been proposed as a model to evaluate sedation and toxicity of natural occurring compounds on fish. Some substances may induce mucous loss, muscle spasms, susceptibility to infection and excessive defecation/regurgitation in fish and, therefore, they are considered harmful for living organisms (Benovit et al. 2015; Silva et al. 2013a). In all experiments, the concentrations for EO and compounds followed the criteria of sedation level corresponding to a 0.5-1 score in the behavioral scale. The long-term sedation with DHF has been reported using concentrations ranged from 2.5 to 20 mg/L (Garlet et al. 2016). In experiments that expose fish to sedatives for a long period of time, a non-anesthetic concentration is more suitable in order to avoid potential medullar collapse due to excessive neuronal depression (Garlet et al. 2016; Gomes et al. 2011). Conversely, for the observation of all sedative stages in a short period of time, a higher sedative concentration is required, as performed in the assay that evaluated the action

mechanism of the compounds. In the long-term exposure to sedatives experiment, fish sedated with SEL and ERM returned to normal swimming behavior at the end of the 24 h-immersion bath. SEL and ERM share chemical similarities since both molecules contain an alcohol function, which made these compounds less lipophilic than DFX and, consequently, less inclined to be stored in lipophilic tissues, such as the brain (Juan M Pallicer 2011; Liu et al. 2011). Thus, we suggest that the sedative effect of ERM and SEL declined through time due to compound metabolization. Considering the usual metabolism mechanisms of xenobiotics (Raunio et al 2015), since SEL and ERM have an alcoholic group, they do not need to undergo phase I reactions of biotransformation. These compounds may undergo direct conjugation with glucuronic acid or glycine in the hepatocytes through phase II reactions, which will increase their hydrophilicity, thus favoring their elimination through urine. Thus, we suggest that the sedative effect of ERM and SEL declined through time due to compound metabolization and elimination. Additionally, we did not rule out the possibility of compound volatilization from water to environment, since EO-derived compounds often have this property (Chiang et al. 2010; Flores et al. 2011; Sharifi-Rad et al. 2017).

The EO major constituent, DHF, has been addressed as a GABA_A/benzodiazepine site modulator in fish and rodents (Garlet et al. 2016; Garlet et al. 2017) and until now it has been considered the main responsible for the biological activities of the EO (Barbas et al. 2017; Silva 2017; Silva et al. 2016; Silva et al. 2018). Nevertheless, in this study we showed experimental evidence that the sesquiterpenoids ERM, DFX and SEL also interact with the GABA_A receptors due to their sedation profile sensitive to FMZ and/or modulation of the GABA_A subunits expression. The recovery of the ERM-induced sedation was facilitated when fish were exposed to FMZ and this compound downregulated the expression of the *gabral* gene, suggesting a role for this subunit in the effects of this compound. The α subunit-encoding genes are the largest and most diverse gene family and it has been confirmed to be well-conserved across species, including fish and mammals (Monesson-Olson et al. 2018). The GABA_A/ α 1 subunit has a pivotal role in the time of sleep induced by the benzodiazepine midazolam in humans (Choi et al. 2015) and a specific decrease in the GABA_A/ α 1 subunit has been linked to neurological diseases such as epilepsy and anxiety in both humans and experimental animals (Devaud et al. 1997; Johannesen et al. 2016; Lund et al. 2008; Ye et al. 2010). The GABA_A/benzodiazepine high affinity binding site (canonical site) are assembled by a receptor configuration containing a α_{1-3} or γ_{1-3} subunit interface (Sigel and Ernst 2018). Therefore, the neuronal effects of the compound ERM may also require other subunits than those evaluated in the present study.

Furthermore, we detected an increase in the expression of the $\beta 1$ -, δ - and $\gamma 2$ -encoding genes in the brain of fish sedated with the compound SEL. The GABA α / $\beta 1$ subunit is actively involved in the endogenous sleep pathway in the hypothalamus, which modulates the sedation and anesthetic process (Yanovsky et al. 2012). The $\gamma 2$ subunit is highly expressed throughout developing and adult brain and is a component of almost 60 % of all GABA α receptors (Jembrek and Vlainic 2015; Whiting 2003). This subunit is linked to receptor traffic, postsynaptic clustering, synaptic maintenance, GABA conductance (Farrant and Nusser 2005; Saari et al. 2011; Schweizer et al. 2003), and modulates the GABA α sensitivity to neurosteroids (Shingai et al. 1991). A decrease in the $\gamma 2$ subunit expression is observed in some types of epilepsy (Bhat et al. 2018; Schipper et al. 2015; Wei et al. 2017) and GABA α / $\gamma 2$ knockdown mice have increased anxiety-like behavior (Chandra et al. 2005). The GABA α / $\gamma 2$ are highly concentrated in the synaptic domains of the GABAergic neurons (Somogyi et al. 1996) and an increase in this receptor subtype lead to the strengthening of the postsynaptic inhibitory currents (Nusser et al. 1998). Moreover, our results suggest that the compound SEL interacts with the GABA α / δ subunit, which may enlighten the fact that the recovery of sedation induced by this compound was not facilitated in the presence of FMZ. The GABA α receptors that express the δ subunit are placed in extrasynaptic domains and mediate the GABAergic tonic currents (Alexeev et al. 2012; Bohnsack et al. 2016; Schipper et al. 2015; Sigel and Ernst 2018; Zhang et al. 2017). Increased δ subunit levels has been associated with a decrease in kainic acid-induced seizures in mice (Maguire et al. 2005). Additionally, these δ subunit-containing receptors lack the γ subunit, which is essential to FMZ binding (Farrant and Nusser 2005; Hall et al. 2004). Therefore, the SEL GABA α / δ -mediated effects may be insensitive to FMZ competitive antagonism and this would explain why FMZ did not facilitate the fish recovery from SEL-induced sedation.

Interestingly, the sedation induced by the EO increased the GABA α / $\alpha 2$ subunit expression and did not alter the expression of the $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 1$, δ and $\gamma 2$ encoding genes in the silver catfish brain. This subunit plays a role in the regulation of emotional behaviors and chronic pain and it is required for the anxiolytic effects of the benzodiazepines (Sigel and Ernst 2018). Furthermore, mutations in the $\alpha 2$ subunit-encoding gene are found in several types of epilepsy (Bhat et al. 2018; May et al. 2018; Orenstein et al. 2018). Selective modulation of the $\alpha 2$ subunit induce GABAergic-mediated effects with a lower probability to induce treatment tolerance (Engin et al. 2012). These properties make this subunit a therapeutic target to depression and anxiety treatments (Engin et al. 2012; Rudolph and Möhler 2006). Therefore, we suggest that the *N. grandiflora* EO may hold anxiolytic potential. One may find inconsistent

the fact that EO only altered the expression of the $\alpha 2$ subunit-encoding gene while the EO-derived compounds ERM and SEL modulate other subunits but not the $\alpha 2$. On this matter, it is worth to point out that the ERM and SEL amount containing in the 40 mg/L EO is lower than the tested 25 mg/L ERM or SEL. Consequently, these compounds may not reach the concentrations needed for gene modulation in the fish brain. EO biological activities are acknowledged, in general, as the outcome of the combined effects of its constituents (de Sousa et al. 2015; Dobetsberger and Buchbauer 2011; Gomez et al. 2013; Raut and Karuppayil 2014; Tak et al. 2017; Wang and Heinbockel 2018). Therefore, we suggest that the EO-induced increase in the GABA α / $\alpha 2$ expression was a result of the combined effects of the compounds present in the EO. Alternatively, the EO contains other non-identified compounds and may suggest that these compounds may also play a role in the EO-induced increase in GABA α / $\alpha 2$ expression.

The GABA α subunits expression in the silver catfish reported in this study shows that these receptor proteins are conserved in this species. Similar results have been demonstrated with the zebrafish (*Danio rerio*), which express at least 23 different GABA α receptor subunits (Cocco et al. 2017; Monesson-Olson et al. 2018). Our results share some similarities with those obtained with the zebrafish. For instance, the $\beta 1$ subunit-encoding gene had a lower relative expression compared to the other subunits in the zebrafish (Cocco et al. 2017) and this pattern was also detected in the silver catfish brain ($p < 0.001$, one-way ANOVA, $F_{(5, 30)} = 6.14$, Tukey test). The zebrafish GABA α subunits-encoding genes have high homology with their corresponding homologous in mammals, indicating that these genes are well-conserved among vertebrates (Monesson-Olson et al. 2018). Therefore, experimental animal models using fish species have a high predictive value in the translation of drug effects to mammals.

Literature reports a large arsenal of EO-derived compounds with GABAergic activities, and these substances are believed to have a potential application to treat several pathological conditions in animals and humans (de Almeida et al. 2011; de Sousa 2011; de Sousa et al. 2015; Dobetsberger and Buchbauer 2011; Langeveld et al. 2014; Raut and Karuppayil 2014; Sharifi-Rad et al. 2017; Wang and Heinbockel 2018). Natural compounds/extracts that induce sedation in fish are often proposed as suitable agents for application in veterinary, more precisely in the management of aquatic species (Barbas et al. 2017; Bowker et al. 2014; Zahl et al. 2012). In this scenario, *R. quelen* rises as an experimental animal model to evaluate the efficacy of veterinary products, since this species is cultivated for food consumption in Brazil (Barcellos et al. 2012; Barcellos et al. 2006; Becker et al. 2012; Cunha et al. 2010a; Daniel et al. 2014; Fracalossi et al. 2004; Menezes et al. 2015; Veeck et al. 2013). In the last decade, studies about

the efficacy and mechanism of action of a large number of EOs have been published using the silver catfish as animal model in pharmacology (Bandeira et al. 2017; Benovit et al. 2015; Bianchini et al. 2017; Cunha et al. 2010a; de Freitas Souza et al. 2018a; de Freitas Souza et al. 2018b; Garlet et al. 2016; Gressler et al. 2012a; Gressler et al. 2012b; Heldwein et al. 2014; Heldwein et al. 2012; Saccol et al. 2018; Salbego et al. 2017; Silva et al. 2017; Silva et al. 2013b; Toni et al. 2013; Veit et al. 2018; Zago et al. 2018). As the studies around fish sedatives and anesthetics advance, the need for a better understanding of the species neurobiology has increased. Therefore, the findings of the present study provide the first step to the GABAergic system mapping in the silver catfish brain and corroborates the consolidation of this species as an experimental model in pharmacological studies.

CONCLUSION

In this study we detected that *N. grandiflora* EO, and the compounds (-)-selin-11-en-4- α -ol, (+)-eremophilan-11-en-10-ol and (+)-dehydrofukinone epoxide, induced sustained sedation in fish, likely due to their interaction with the GABA_A receptors. Here, we acknowledged for the first time that the species *R. quelen* express GABA_A receptors subunits with pharmacological relevance in the pathology of CNS diseases. Moreover, we showed that the EO selectively increased the GABA_A/ α 2 subunit, which suggest a potential effect of this extract as an anxiolytic agent. Therefore, our results support the proposed use of the silver catfish as a robust and reliable experimental model to evaluate the efficacy of drugs with putative GABAergic-mediated effects.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Participated in research design: QIG, BMH and BB.

Conducted experiments: QIG, PR, CFS, SND.

Performed data analysis: QIG

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: QIG, BMH, GMR and BB.

REFERENCES

- Adams RP (2009) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Illinois
- Alexeev M, Grosenbaugh DK, Mott DD, Fisher JL (2012) The natural products magnolol and honokiol are positive allosteric modulators of both synaptic and extra-synaptic GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 62: 2507-14.
- Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F (2015) Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5: 601-611.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.
- Baldinger P, Höflich AS, Mitterhauser M, Hahn A, Rami-Mark C, Spies M, Wadsak W, Lanzenberger R, Kasper S (2015) Effects of Silexan on the Serotonin-1A receptor and microstructure of the human brain: A randomized, placebo-controlled, double-blind, cross-over study with molecular and structural neuroimaging. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18: pyu063.
- Bandeira G, Pês TS, Saccol EMH, Sutili FJ, Rossi W, Murari AL, Heinzmann BM, Pavanato MA, de Vargas AC, de L. Silva L, Baldisserotto B (2017) Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Industrial Crops and Products* 97: 484-491.
- Barbas LAL, Maltez LC, Stringheta GR, Garcia LdO, Monserrat JM, da Silva DT, Heinzmann BM, Sampaio LA (2017) Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469: 79-87.
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Koakoski G, Oliveira TA, Rosa JGSd, Fagundes M (2012) Fish age, instead of weight and size, as a determining factor for time course differences in cortisol response to stress. 107: 397-400.
- Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM (2006) Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. 253: 317-321.
- Bauquier SH, Greenwood J, Whitem T (2013) Evaluation of the sedative and anaesthetic effects of five different concentrations of axalone in goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 396-399: 119-123.
- Baxendale S, Holdsworth CJ, Meza Santoscoy PL, Harrison MRM, Fox J, Parkin CA, Ingham PW, Cunliffe VT (2012) Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *DMM Disease Models and Mechanisms* 5: 773-784.
- Becker AG, Parodi TV, Heldwein CG, Zeppenfeld CC, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2012) Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 789-796.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED (2009) Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 94: 75-80.
- Benovit SC, Silva LL, Salbego J, Loro VL, Mallmann CA, Baldisserotto B, Flores EM, Heinzmann BM (2015) Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. *An Acad Bras Cienc* 87: 1675-89.
- Bhat MA, Guru SA, Mir R, Waza AA, Zuberi M, Sumi MP, Bodeliwala S, Puri V, Saxena A (2018) Association of GABAA Receptor Gene with Epilepsy Syndromes. *Journal of Molecular Neuroscience* 65: 141-153.
- Bianchini AE, Garlet QI, da Cunha JA, Bandeira G, Brusque ICM, Salbego J, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2017) Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 50: e6346.
- Bizzo HR, Ana Maria CH, Rezende CM (2009) Brazilian essential oils: general view, developments and perspectives. *Quimica Nova* 32: 588-594.
- Bohnsack JP, Carlson SL, Morrow AL (2016) Differential regulation of synaptic and extrasynaptic $\alpha 4$ GABA(A) receptor populations by protein kinase A and protein kinase C in cultured cortical neurons. *Neuropharmacology* 105: 124-32.
- Bowker JD, Trushenski JT, Glover DC, Carty DG, Wandelaar N (2014) Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm-, cool-, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.
- Chandra D, Korpi ER, Miralles CP, De Blas AL, Homanics GE (2005) GABA(A)receptor $\gamma 2$ subunit knockdown mice have enhanced anxiety-like behavior but unaltered hypnotic response to benzodiazepines. *BMC Neuroscience* 6: 30-30.
- Chiang H-M, Chiu H-H, Lai Y-M, Chen C-Y, Chiang H-L (2010) Carbonyl species characteristics during the evaporation of essential oils. *Atmospheric Environment* 44: 2240-2247.

- Choi Y-J, Lee SY, Yang K-S, Park J-Y, Yoon SZ, Yoon SM (2015) Polymorphism rs4263535 in *gabral* intron 4 was related to deeper sedation by intravenous midazolam. *Journal of International Medical Research* 43: 686-698.
- Cocco A, Ronnberg AM, Jin Z, Andre GI, Vossen LE, Bhandage AK, Thornqvist PO, Birnir B, Winberg S (2017) Characterization of the gamma-aminobutyric acid signaling system in the zebrafish (*Danio rerio* Hamilton) central nervous system by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. *Neuroscience* 343: 300-321.
- Collymore C, Tolwani A, Lieggi C, Rasmussen S (2014) Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 53: 198-203.
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21: 3674-6.
- Cunha MA, Barros FMCd, Garcia LdO, Veeck APL, Heinzmann BM, Lucia Loro V, Emanuelli T, Baldisserotto B (2010a) Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 306: 403-406.
- Cunha MA, Zeppenfeld CC, Garcia LdO, Loro VL, Fonseca MBd, Emanuelli T, Veeck APdL, Copatti CE, Baldisserotto B (2010b) Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Cienc Rural* 40: 2107-2114.
- Daniel AP, Veeck APL, Klein B, Ferreira LF, da Cunha MA, Parodi TV, Zeppenfeld CC, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM, Baldisserotto B, Emanuelli T (2014) Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. *Journal of Food Science* 79: S1205-S1211.
- de Almeida RN, Agra Mde F, Maior FN, de Sousa DP (2011) Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules* 16: 2726-42.
- de Freitas Souza C, Baldissera MD, Bianchini AE, da Silva EG, Mourao RHV, da Silva LVF, Schmidt D, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2018a) Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish physiology and biochemistry* 44: 21-34.
- de Freitas Souza C, Descovi S, Baldissera MD, Bertolin K, Bianchini AE, Mourao RHV, Schmidt D, Heinzmann BM, Antoniazzi A, Baldisserotto B, Martinez-Rodriguez G (2018b) Involvement of HPI-axis in anesthesia with *Lippia alba* essential oil citral and linalool chemotypes: gene expression in the secondary responses in silver catfish. *Fish physiology and biochemistry*.
- de Sousa DP (2011) Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules* 16: 2233-52.
- de Sousa DP, de Almeida Soares Hocayen P, Andrade LN, Andreatini R (2015) A Systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. *Molecules* 20: 18620-60.
- de Sousa FCF, Oliveira ÍCM, Fernandes ML, de Sousa DP (2012) Advances in the research of essential oils: Anxiolytic and sedative activity. *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*, pp 123-140
- Delgado L, Schmachtenberg O (2008) Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAA α 1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. *Cerebellum* 7: 444-50.
- Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL (1997) Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem* 69: 126-30.
- Dobetsberger C, Buchbauer G (2011) Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 26: 300-316.
- Engin E, Liu J, Rudolph U (2012) α 2-containing GABA(A) receptors: A target for the development of novel treatment strategies for CNS disorders. *Pharmacology & therapeutics* 136: 142-152.
- European Pharmacopoeia (2010) European Directorate for the Quality of Medicines. In: *Pharmacopoeia E* (ed), Strassbourg
- Facciolo RM, Crudo M, Zizza M, Giusi G, Canonaco M (2012) α GABA(A) subunit-orexin receptor interactions activate learning/motivational pathways in the goldfish. *Behav Brain Res* 234: 349-56.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6: 215-29.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 213-226.
- Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, Silva CdBd, Pohlmann AR, Beck RCR, Guterres SS (2011) Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Química Nova* 34: 968-972.

- Fogliarini CO, Garlet QI, Parodi TV, Becker AG, Garcia LO, Heinzmann BM, Pereira AMS, Baldisserotto B (2017) Anesthesia of *Epinephelus marginatus* with essential oil of *Aloysia polystachya*: an approach on blood parameters. *An Acad Bras Cienc* 89: 445-456.
- Fracalossi DM, Meyer G, Mazzoti F, Weingartner M, Zanbonini F (2004) Performance of jundiá, *Rhamdia quelen*, and dourado, *Salminus brasiliensis*, in earth ponds of southern Brazil. *Acta Scientiarum (Animal Sciences)* 26: 345-352.
- Garlet QI, Pires LC, Silva DT, Spall S, Gressler LT, Bürger ME, Baldisserotto B, Heinzmann BM (2016) Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. *Braz J Med Biol Res* 49: e4872.
- Garlet QI, Pires LDC, Milanese LH, Marafija JR, Baldisserotto B, Mello CF, Heinzmann BM (2017) (+)-Dehydrofukinone modulates membrane potential and delays seizure onset by GABA_A receptor-mediated mechanism in mice. *Toxicology and applied pharmacology* 332: 52-63.
- Gomes DP, Chaves BW, Becker AG, Baldisserotto B (2011) Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Research*: 878-886.
- Gomes LdC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B (2000) Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30: 179-185.
- Gomez LA, Stashenko E, Ocazionez RE (2013) Comparative study on in vitro activities of citral, limonene and essential oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on yellow fever virus. *Nat Prod Commun* 8: 249-52.
- Gressler LT, Parodi TV, Riffel APK, DaCosta ST, Baldisserotto B (2012a) Immersion anaesthesia with tricaine methanesulphonate or propofol on different sizes and strains of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology* 81: 1436-1445.
- Gressler LT, Riffel APK, Saccol EMH, Koakoski G, Costa STd, Pavanato MA, Heinzmann BM, Caron B, Schmidt D, Llesuy SF, Barcellos LJG, Baldisserotto B (2012b) Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research*.
- Grossman L, Stewart A, Gaikwad S, Utterback E, Wu N, DiLeo J, Frank K, Hart P, Howard H, Kalueff AV (2011) Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish. *Brain Research Bulletin* 85: 58-63.
- Guhad F (2005) Introduction to the 3Rs (Refinement, Reduction and Replacement). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 44: 58-59.
- Hall BJ, Chebib M, Hanrahan JR, Johnston GAR (2004) Flumazenil-independent positive modulation of γ -aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ and $\alpha 1\beta 2$ GABA_A receptors. *European Journal of Pharmacology* 491: 1-8.
- Heldwein CG, Silva LdL, Gai EZ, Roman C, Parodi TV, Bürger ME, Baldisserotto B, Flores EMdM, Heinzmann BM (2014) S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 41: 621-629.
- Heldwein CG, Silva LL, Reckziegel P, Barros FM, Burger ME, Baldisserotto B, Mallmann CA, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM (2012) Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. *Braz J Med Biol Res* 45: 436-43.
- Jembrek MJ, Vlainic J (2015) GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls.
- Johannesen K, Marini C, Pfeffer S, Møller RS, Dorn T, Niturad C, Gardella E, Weber Y, Søndergård M, Hjalgrim H, Nikanorova M, Becker F, Larsen LHG, Dahl HA, Maier O, Mei D, Biskup S, Klein KM, Reif PS, Rosenow F, Elias AF, Hudson C, Helbig KL, Schubert-Bast S, Scordo MR, Craiu D, Djémié T, Hoffman-Zacharska D, Caglayan H, Helbig I, Serratosa J, Striano P, De Jonghe P, Weckhuysen S, Suls A, Muru K, Talvik I, Talvik T, Muhle H, Borggraefe I, Rost I, Guerrini R, Lerche H, Lemke JR, Rubboli G, Maljevic S (2016) Phenotypic spectrum of *gabra1*. *Neurology* 87: 1140-1151.
- Juan M Pallicer JSMRsCRfEB (2011) Lipophilicity assessment of basic drugs (log Po/w determination) by a chromatographic method. *Journal of chromatography A* 1218.
- Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA (2014) Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Critical Reviews in Microbiology* 40: 76-94.
- Liu X, Testa B, Fahr A (2011) Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharmaceutical Research* 26: 962-977.
- Lund IV, Hu Y, Raol YH, Benham RS, Faris R, Russek SJ, Brooks-Kayal AR (2008) BDNF selectively regulates GABA_A receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Science Signaling* 1: ra9.
- MacArthur Clark J (2017) The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition* 120: S1-S7.
- Machin D, Cheung YB, Parmar M (2006) *Survival Analysis: A Practical Approach*, 2nd edn. Wiley
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8: 797-804.
- May P, Girard S, Harrer M, Bobbili DR, Schubert J, Wolking S, Becker F, Lachance-Touchette P, Meloche C, Gravel M, Niturad CE, Knaus J, De Kovel C, Toliat M, Polvi A, Iacomino M, Guerrero-Lopez R, Baulac

- S, Marini C, Thiele H, Altmuller J, Jabbari K, Ruppert AK, Jurkowski W, Lal D, Rusconi R, Cestele S, Terragni B, Coombs ID, Reid CA, Striano P, Caglayan H, Siren A, Everett K, Moller RS, Hjalgrim H, Muhle H, Helbig I, Kunz WS, Weber YG, Weckhuysen S, Jonghe P, Sisodiya SM, Nabbout R, Franceschetti S, Coppola A, Vari MS et al (2018) Rare coding variants in genes encoding GABAA receptors in genetic generalised epilepsies: an exome-based case-control study. *The Lancet Neurology* 17: 699-708.
- Menezes C, Ruiz-Jarabo I, Martos-Sitcha JA, Toni C, Salbego J, Becker A, Loro VL, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM, Baldisserotto B (2015) The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): A metabolic and endocrine approach. *Aquaculture* 435: 257-264.
- Monesson-Olson B, McClain JJ, Case AE, Dorman HE, Turkewitz DR, Steiner AB, Downes GB (2018) Expression of the eight GABA α receptor α subunits in the developing zebrafish central nervous system. *PLoS ONE* 13.
- Nist (2008) National Institute of Standards and Technology. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH). Gaithersburg, USA.
- Nusser Z, Hájos N, Somogyi P, Mody I (1998) Increased number of synaptic GABAA receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395: 172.
- Orenstein N, Goldberg-Stern H, Straussberg R, Bazak L, Weisz Hubshman M, Kropach N, Gilad O, Scheurman O, Dory Y, Kraus D, Tzur S, Magal N, Kilim Y, Shkalim Zemer V, Basel-Salmon L (2018) A de novo *gabra2* missense mutation in severe early-onset epileptic encephalopathy with a choreiform movement disorder. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 22: 516-524.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.
- Raut JS, Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62: 250-264.
- Raunio H, Kuusisto M, Juvonen RO, Pentikäinen OT (2015) Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Frontiers in Pharmacology* 6: 1-14.
- Rudolph U, Möhler H (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Current Opinion in Pharmacology* 6: 18-23.
- Saari TI, Uusi-Oukari M, Ahonen J, Olkkola KT (2011) Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology. *Pharmacol Rev* 63: 243-67.
- Saccol EMH, Jerez-Cepa I, Ourique GM, Pes TS, Gressler LT, Mourao RHV, Martinez-Rodriguez G, Mancera JM, Baldisserotto B, Pavanato MA, Martos-Sitcha JA (2018) *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. *Research in Veterinary Science* 117: 150-160.
- Saiyudthong S, Mekseepalard C, Srijittapong D (2016) PS120. Effects of linalool on chronic stress-induced depressive-like behaviour and BDNF protein in the hippocampus of rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19: 40-41.
- Salbego J, Toni C, Becker AG, Zeppenfeld CC, Menezes CC, Loro VL, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2017) Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. *Braz J Biol* 77: 696-702.
- Schipper S, Aalbers MW, Rijkers K, Swijsen A, Rigo JM, Hoogland G, Vles JS (2015) Tonic GABA Receptors as Potential Target for the Treatment of Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular neurobiology* 53: 5252–5265.
- Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, Mansuy IM, Fritschy JM, Mohler H, Luscher B (2003) The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Molecular and cellular neurosciences* 24: 442-50.
- Setzer WN (2009) Essential oils and anxiolytic aromatherapy. *Natural Product Communications* 4: 1305-1316.
- Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo MR, Ademiluyi AO, Sharifi-Rad R, Ayatollahi SA, Iriti M (2017) Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules* 22, E70.
- Shingai R, Sutherland ML, Barnard EA (1991) Effects of subunit types of the cloned GABAA receptor on the response to a neurosteroid. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 206: 77-80.
- Sigel E, Ernst M (2018) The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 39: 659-671.
- Silva DT (2017) Chemical characterization and biological activities of the extractives obtained from *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea lancifolia* (Shott) Mez Doctoral Thesis, Forest Engineering. Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil., pp 159

- Silva DT, Bianchini NH, Muniz MFB, Heinzmann BM, Labidi J (2016) Chemical composition and inhibitory effects of *Nectandra grandiflora* leaves essential oil against wood decay fungi. *Drewno* 59: 189-198.
- Silva DT, Herrera R, Heinzmann BM, Calvo J, Labidi J (2018) *Nectandra grandiflora* by-products obtained by alternative extraction methods as a source of phytochemicals with antioxidant and antifungal properties. *Molecules* 23: E372.
- Silva LL, Balconi LS, Gressler LT, Garlet QI, Sutili FJ, Vargas APC, Baldisserotto B, Morel AF, Heinzmann BM (2017) S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish. *An Acad Bras Cienc* 89: 203-212.
- Silva LL, Garlet QI, Benovit SC, Dolci G, Mallmann CA, Burger ME, Baldisserotto B, Longhi SJ, Heinzmann BM (2013a) Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz J Med Biol Res* 46: 771-779.
- Silva LL, Parodi TV, Reckziegel P, Garcia VO, Bürger ME, Baldisserotto B, Malmann CA, Pereira AMS, Heinzmann BM (2012) Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Volumes* 350–353: 91–97.
- Silva LL, Silva DTd, Garlet QI, Cunha MA, Mallmann CA, Baldisserotto B, Longhi SJ, Pereira AMS, Heinzmann BM (2013b) Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology* 11: 443-451.
- Somogyi P, Fritschy JM, Benke D, Roberts JDB, Sieghart W (1996) The γ 2 Subunit of the GABAA receptor is concentrated in synaptic junctions containing the α 1 and β 23 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus. *Neuropharmacology* 35: 1425-1444.
- Tak J-H, Jovel E, Isman MB (2017) Synergistic interactions among the major constituents of lemongrass essential oil against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Pest Science* 90: 735-744.
- Toni C, Becker AG, Simões LN, Pinheiro CG, Silva LdL, Heinzmann BM, Caron BO, Baldisserotto B (2013) Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*: 1-14.
- Tsuchiya H (2017) Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules* 22.
- Veeck APL, Klein B, Ferreira LF, Becker AG, Heldwein CG, Heinzmann BM, Baldisserotto B, Emanuelli T (2013) Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 955-960.
- Veit JC, Piccolo J, Scherer AF, Machado IS, Maurer LH, Conte L, Baldisserotto B, Koakoski G, Menezes CC, Loro VL, Barcellos LJG, Heinzmann BM, Poletto G, Menezes CR, Emanuelli T (2018) Preslaughter Anesthesia with *Lippia alba* essential oil delays the spoilage of chilled *Rhamdia quelen*. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 27: 258-271.
- Verdouw H, Van Echteld CJA, Dekkers EMJ (1978) Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research* 12: 399–402.
- Wang ZJ, Heinbockel T (2018) Essential oils and their constituents targeting the GABAergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. *Molecules* 23: E1061.
- Wei F, Yan LM, Su T, He N, Lin ZJ, Wang J, Shi YW, Yi YH, Liao WP (2017) Ion channel genes and epilepsy: functional alteration, pathogenic potential, and mechanism of epilepsy. *Neuroscience Bulletin* 33: 455-477.
- Whiting PJ (2003) The GABAA receptor gene family: new opportunities for drug development. *Current opinion in drug discovery & development* 6: 648-57.
- Yanovsky Y, Schubring S, Fleischer W, Gisselmann G, Zhu XR, Lübbert H, Hatt H, Rudolph U, Haas HL, Sergeeva OA (2012) GABA α receptors involved in sleep and anaesthesia: β 1- versus β 3-containing assemblies. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 463: 187-199.
- Ye G-L, Baker KB, Mason SM, Zhang W, Kirkpatrick L, Lanthorn TH, Savelieva KV (2010) GABAA receptor α 1 subunit (*gabral1*) knockout mice: review and new results. In: Kalueff AV, Bergner CL (eds) *Transgenic and Mutant Tools to Model Brain Disorders*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 65-90
- Zago DC, Santos AC, Lanes CFC, Almeida DV, Koakoski G, de Abreu MS, Zeppenfeld CC, Heinzmann BM, Marins LF, Baldisserotto B, Barcellos LJG, Cunha MA (2018) *Aloysia triphylla* in the zebrafish food: effects on physiology, behavior, and growth performance. *Fish physiology and biochemistry* 44: 465-474.
- Zahl IH, Samuelsen O, Kiessling A (2012) Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish physiology and biochemistry* 38: 201-18.
- Zhang WH, Zhou J, Pan HQ, Wang XY, Liu WZ, Zhang JY, Yin XP, Pan BX (2017) δ Subunit-containing GABA α receptor prevents overgeneralization of fear in adult mice. *Learning and Memory* 24: 381-384.

Table 1. Chemical composition of the *Nectandra grandiflora* EO. RT= compound retention time in the column (min.); NI= non-identified compound; KI_C= calculated Kovats index; KI_L=literature Kovats index; N= Nist (2008); A= Adams (2009); S= Silva (2017).

RT	Compound	KI _C	KI _L	%
10.32	α -Pinene	931	937 ^N	2.14
12.01	β -Pinene	973	978 ^N	2.27
14.61	(<i>Z</i>)-Ocimene	1039	1038 ^N	0.27
15.00	(<i>E</i>)-Ocimene	1049	1048 ^N	0.63
17.02	Linalool	1101	1101 ^N	4.42
20.27	(<i>2E</i>)- Hexenyl butyrate	1188	1191 ^{N/A}	0.53
27.22	β -Elemene	1393	1394 ^N	0.47
28.09	Aromadendrene	1421	1418 ^N	1.05
28.77	NI	1443	–	2.75
29.66	α -Muurolene	1471	1472 ^N	1.04
29.89	Allo-Aromadendrene	1479	1478 ^N	1.30
30.02	Amorpha-4,7(11)-diene	1483	1479 ^A	3.79
30.21	Valencene	1489	1490 ^N	1.40
30.38	Eremophilene	1495	1489 ^N	0.90
30.49	Biciclogermacrene	1498	1500 ^A	5.93
30.75	NI	1507	–	7.52
30.81	NI	1509	–	2.59
31.76	NI	1542	–	0.75
32.87	Spathulenol	1579	1578 ^{N/A}	3.48
33.05	NI	1586	–	0.75
33.19	NI	1590	–	0.57
33.36	NI	1596	–	0.58
34.96	Dehydrofukinone epoxide	1653	1656^S	10.07
35.06	Selin-11-en-4-α-ol	1657	1659^A	4.09
37.70	NI	1755	–	3.66
37.86	NI	1761	–	1.32
39.08	Dehydrofukinone	1808	1813^S	22.21
39.40	Eremophilan-11-en-10-ol	1821	1824^S	6.19
42.18	Rumueno	1933	1930 ^N	1.62
44.72	(-)-Caureno	2040	2041 ^N	5.50

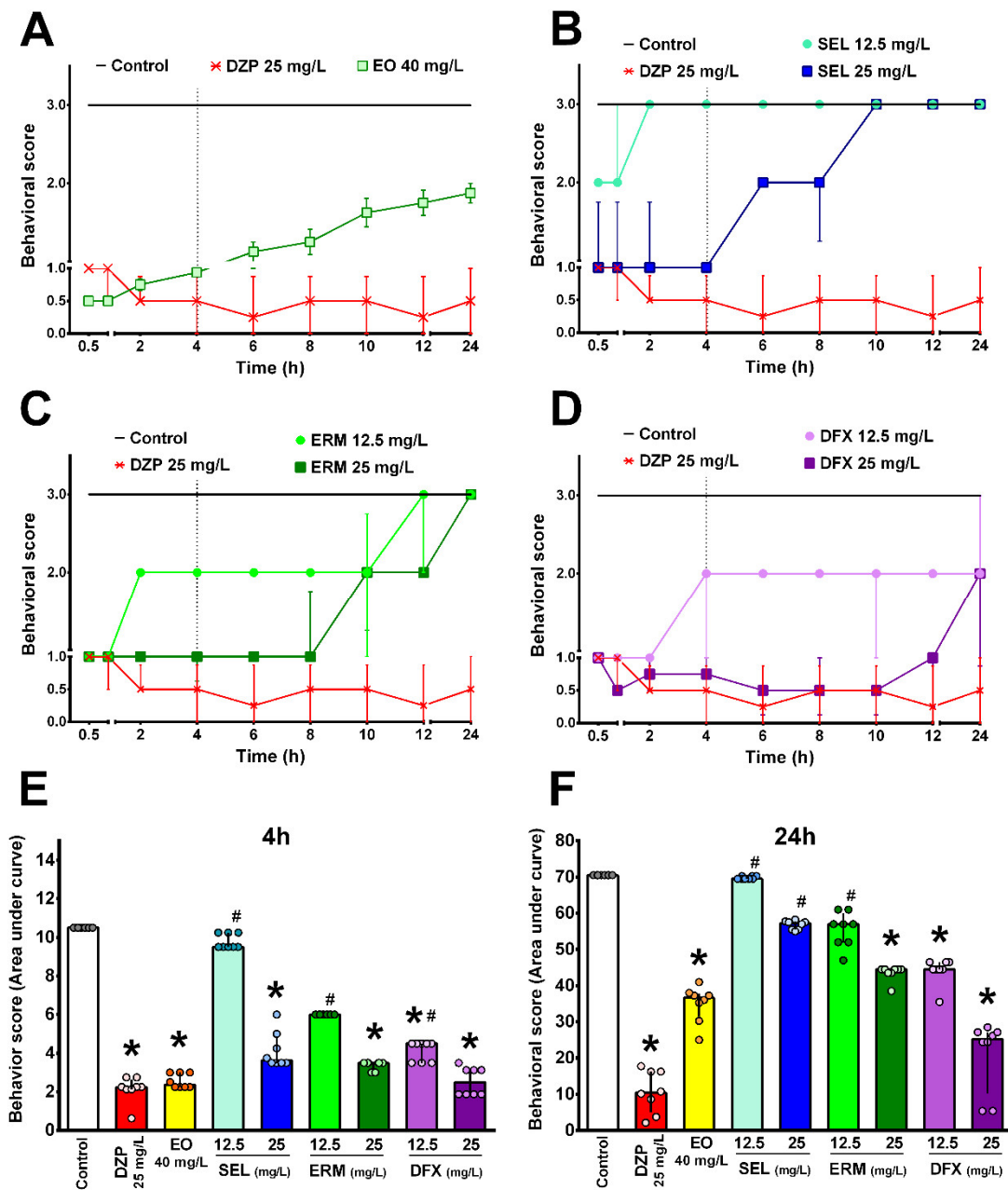


Figure 1. Silver catfish long-term exposure to diazepam (DZP), essential oil (EO) or the sesquiterpenoids (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) and (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX). Behavioral score along the 24 h sedation bath of fish exposed to EO (A), SEL (B), ERM (C) and DFX (D). Quantification (area under curve) of the compounds sedation profile was performed after 4 h (E) and 24 h (F). Data are presented as median \pm interquartile interval (n=8). * $p < 0.001$ versus control group, # $p < 0.001$ from DZP, Kruskal-Wallis test, *post-hoc*: Dunn's test.

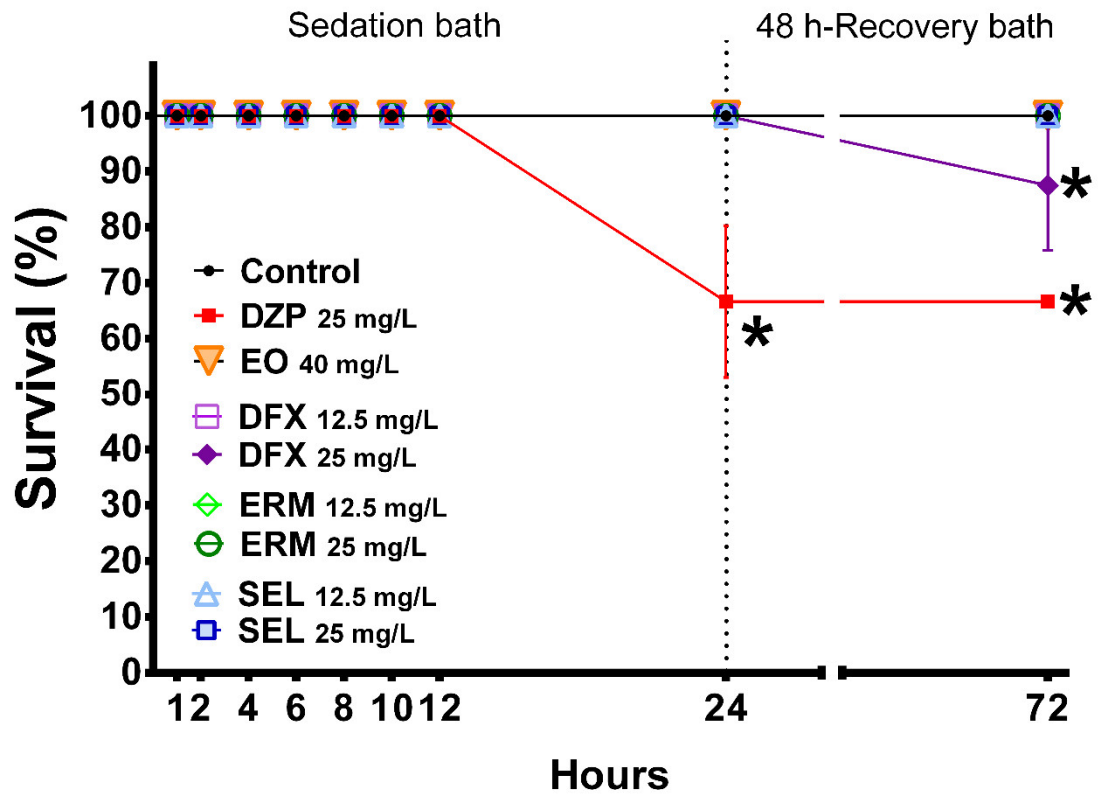


Figure 2. Fish survival were assessed during the 24 h sedation bath and after 48 h of drug withdrawal. * $p < 0.001$ from control group, Mantel-Haenszel approach using the log-rank test of Mantel-Cox, $\chi^2 = 37.31$.

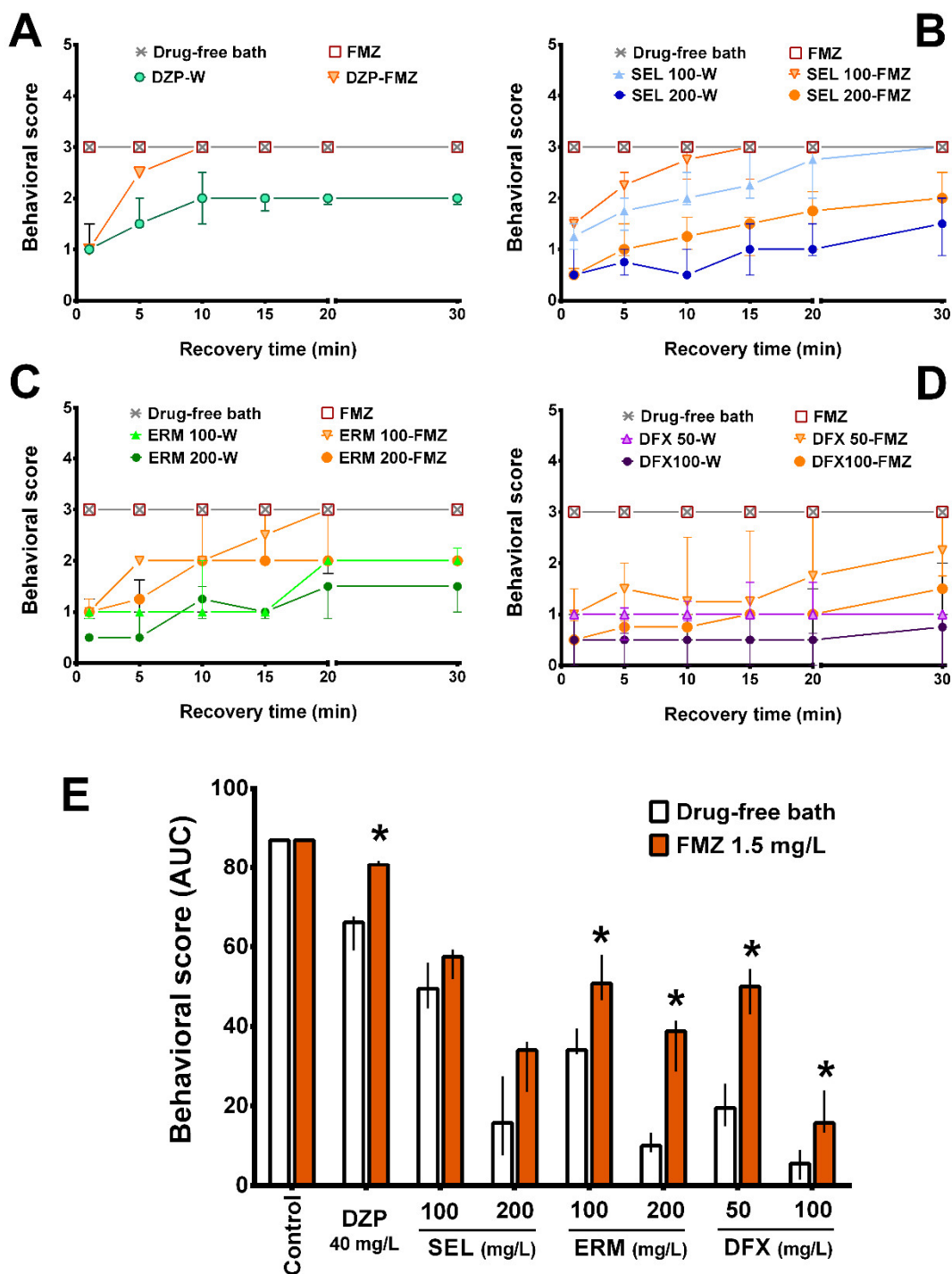


Figure 3. Influence of flumazenil (FMZ) in the fish recovery from neuronal depression induced by *N. grandiflora* isolated compounds. A, B, C and D show the performance of animals exposed to diazepam (DZP) or the sesquiterpenoids (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) and (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), respectively, and its recovery in water bath or 1.5 mg/L FMZ bath over time. E shows the quantification of the area under the curve obtained from scores along 30 min of recovery bath. Data are presented as median \pm interquartile interval (n = 6). Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test, followed by Bonferroni correction ($H_{(1, 80)} = 4.63$; * p < 0.01).

Table 2. Primer oligonucleotide sequences used for qPCR analysis

Gene	Primer (Forward and reverse)	Sequence (5 → 3)	Product size (bp)
<i>gabra1</i>	qrqGABRA1-F qrqGABRA1-R	GAGTCGTCCAATCCAGCAC AGCCAGAAGGAAACCTGTGA	3495
<i>gabra2</i>	qrqGABRA2-F qrqGABRA2-R	CGAACTACGCTCCCAACATC CATGCGGTTCGATCTTACTCA	3701
<i>gabra3</i>	qrqGABRA3-F qrqGABRA3-R	CGAGTCAGCAAAGTGGACAA TATGAGGGTTGGACCTCCTG	4297
<i>gabrb1</i>	qrqGABRB1-F qrqGABRB1-R	GAGGTCCTCACCTGCAGAAG GTTTCCATGAGCATCCACCT	3135
<i>gabrd</i>	qrqGABRD-F qrqGABRD-R	TTGCACTTCCAGTTGAGACG GTGATACTCTCGCAGGCACA	2618
<i>gabrg2</i>	qrqGABRG2-F qrqGABRG2-R	CAGAAAGTCGCTTCCCAAAG TGCGGTTGCTCACAAAGTAG	2638

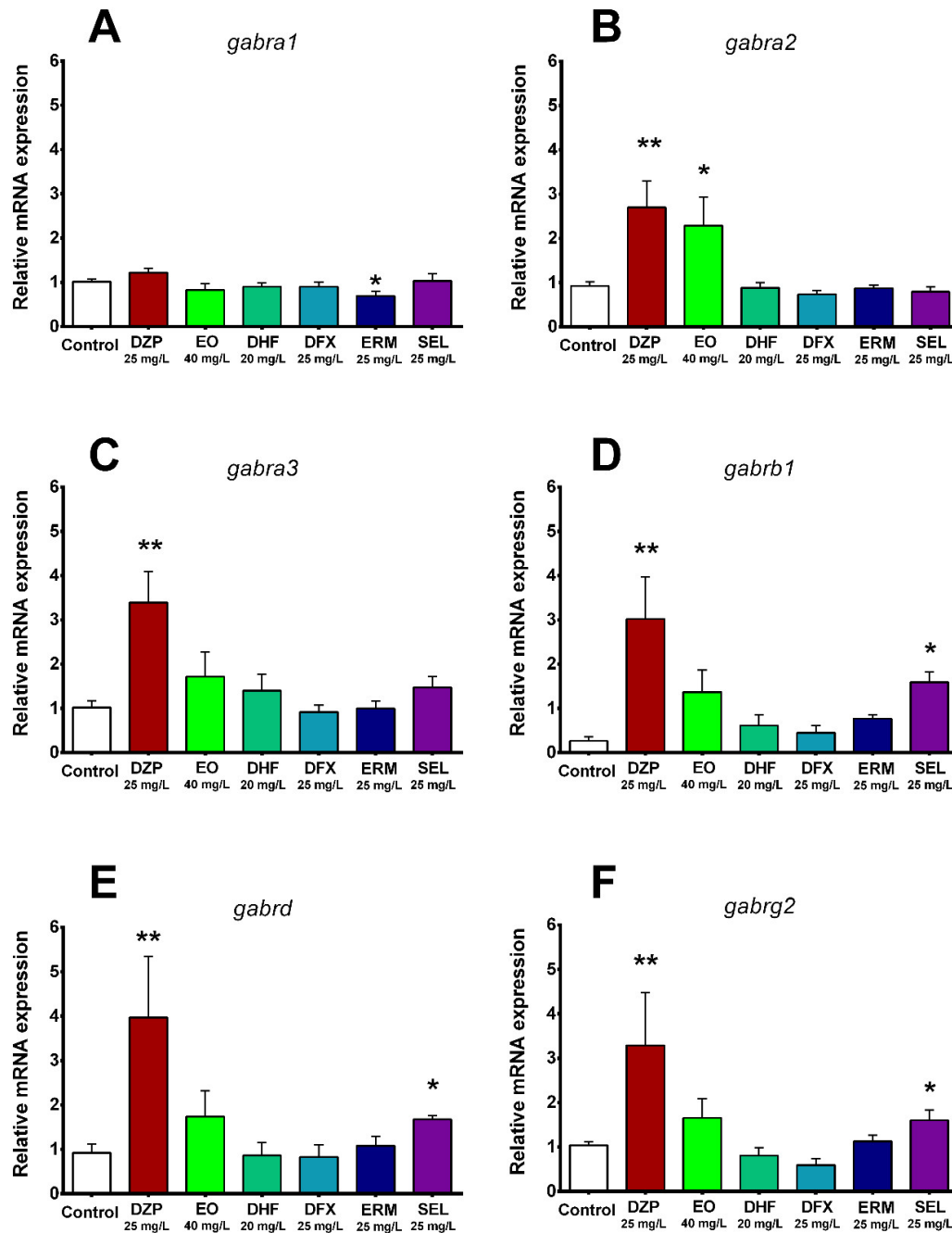


Figure 4. GABA α subunits expression in silver catfish. Relative brain expression of the genes (A) *gabral*: encodes the $\alpha 1$ subunit, (B) *gabra2*: encodes the $\alpha 2$ subunit, (C) *gabra3*: encodes the $\alpha 3$ subunit, (D) *gabrb1*: encodes the $\beta 1$ subunit, (E) *gabrd*: encodes the δ subunit and (F) *gabrg2*: encodes the $\gamma 2$ subunit, from fish treated with diazepam (DZP), *N. grandiflora* essential oil (EO), (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) or (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) are shown. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ from control group, one-way ANOVA, Dunnet's multiple comparisons test.

7 MANUSCRITO 2

Manuscrito submetido no periódico Neuropharmacology (ISSN: 0028-3908):

***Nectandra grandiflora* essential oil and its isolated sesquiterpenoids minimize anxiety-related behaviors in mice through GABAergic mechanisms**

Quelen Iane Garlet¹, Patrícia Rodrigues¹, Luísa Barichello Barbosa², André Luís Londero³,

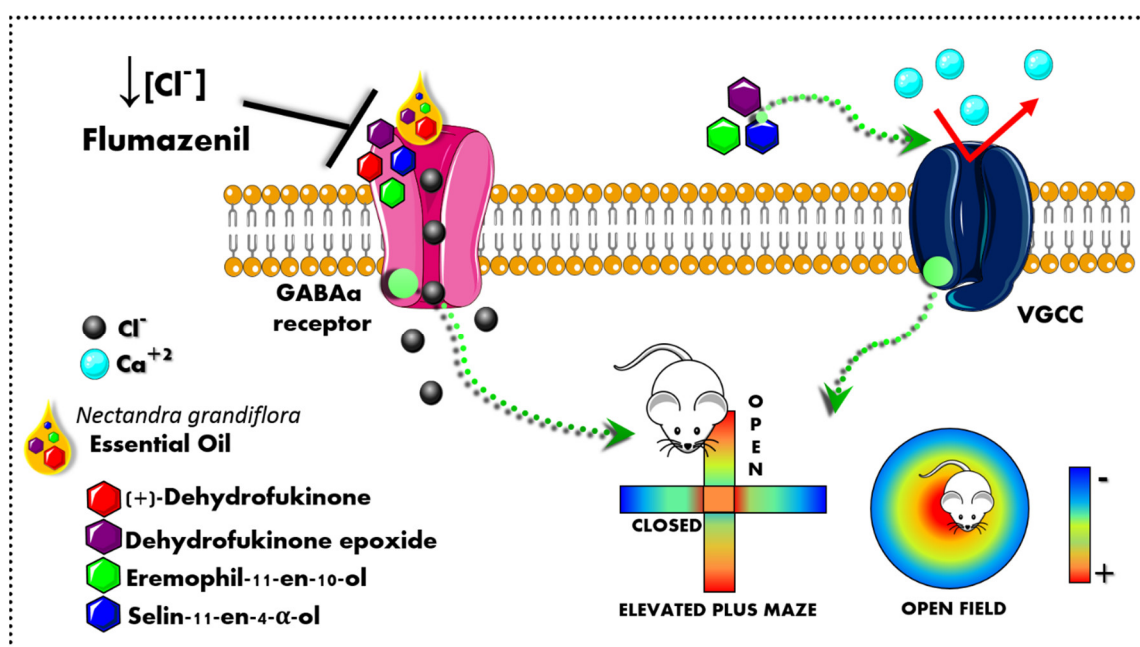
Carlos Fernando Mello^{1,3}, Berta Maria Heinzmann^{1,2*}

¹Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Pharmacy Graduation Course, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Medicine Graduation Course, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Department of Industrial Pharmacy, Post-Graduation Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000 – Building 44, CEP 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel: +55 55 3220-9674. Email: berta.heinzmann@gmail.com.



Abbreviations: EO, essential oil; DHF, dehydrofukinone; DFX, dehydrofukinone epoxide; ERM, eremophil-11-en-10-ol; SEL, selin-11-en-4- α -ol; DZP, diazepam; FMZ, flumazenil; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; PBS, phosphate buffered saline.

Abstract

Nectandra grandiflora Nees (Lauraceae) essential oil (EO) main constituent, the sesquiterpenoid (+)-dehydrofukinone (DHF), has sedative and anticonvulsant effects through GABAergic mechanisms. Other DHF-related sesquiterpenoids have been identified in the EO, such as, (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophil-11-en-10-ol (ERM) and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL). However, the neuronal effects of these compounds in mammals remain unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the anxiolytic potential of the *N. grandiflora* EO and the isolated compounds in mice. For this purpose, mice were administered orally with vehicle, 10, 30 or 100 mg/kg EO, DHF, DFX, ERM or SEL or 1mg/kg diazepam. Locomotion and ethological parameters in the open field (OF) and elevated plus maze (EPM) were recorded. We also examined the effect of DFX, ERM and SEL on the membrane potential and calcium influx in synaptosomes, and the presence of the compounds in the cortical tissue using gas chromatography. EOs and isolated compounds reduced anxiety-related parameters in the EPM (open arms time and entries, end activity, head dipping) and OF (center time and entries, total rearing, unprotected rearing, sniffing, grooming) without alter ambulation or induce sedation. Flumazenil (2mg/kg, i.p.) altered the anxiolytic-like effect of all treatments and vanished the DFX, ERM and SEL-induced changes in membrane potential. However, FMZ did not blocked the DFX-, ERM- and SEL-induced inhibition of calcium influx. Therefore, our results suggest that *N. grandiflora* EO and isolated compounds induced anxiolytic-like effect in mice due to positive modulation of GABA_A receptors and/or inhibition of neuronal calcium influx.

Keywords: (+)-dehydrofukinone; eremophil-11-en-10-ol; selin-11-en-4- α -ol; membrane potential; calcium influx; synaptosome.

1 Introduction

Nectandra grandiflora Nees (Lauraceae), commonly known as “canela-amarela”, is a native endemic tree from Southern Brazil. This plant is ethnopharmacologically used as antirheumatic, diuretic and digestion facilitator (Raggi, 2008). Motivated by a public policy of screening novel phytocomplexes and/or compounds from the Brazilian biodiversity and evaluate their pharmacological potential, it was recently shown that the major constituent of *N. grandiflora* essential oil (EO), (+)-dehydrofukinone (DHF), has sedative activity in fish (Garlet et al., 2016). The mechanism of action of this sesquiterpenoid, which also has anticonvulsant activity in mice, involves GABA_A receptors (Garlet et al., 2016; Garlet et al., 2017). Other DHF-related sesquiterpenoids have been identified in the EO of *N. grandiflora*, such as (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophil-11-en-10-ol (ERM) and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) (Silva, 2016). However, the effects of these compounds on the Central Nervous System (CNS) of mammals remain unknown.

Natural products have a historical use as main therapy or adjuvant to synthetic therapeutics in the treatment of several psychiatric and neurological disorders, in particular epilepsy, sleep disorders and anxiety (Manayi et al., 2016; Rodrigues et al., 2016; Salat et al., 2017; Zhao and Medema, 2016). Within the natural collection of compounds with medicinal potential, EOs combine substances that are often established as pharmacologically active on the CNS (Oliveira Junior et al., 2018). EOs from several species and its isolated compounds have been studied in both experimental animals and humans regarding its effects on anxiety (de Sousa et al., 2015; Fajemiroye et al., 2014; Gelfuso et al., 2014; Lee et al., 2011; Ni et al., 2013; Rombolà et al., 2017; Saiyudthong et al., 2015; Takahashi et al., 2011). The main mechanism of action of these EOs include positive modulation of GABA_A receptors, interaction with the serotonergic system and the reduction of calcium signaling upon neuronal activation (Azanchi

et al., 2014; Chioca et al., 2013; Costa et al., 2011; Costa et al., 2013; Moreira et al., 2014; Ojha et al., 2016; Wang and Heinbockel, 2018). Therefore, one might consider these possible mechanisms while investigating the anxiolytic activity of EOs and/or its derived compounds.

Humans and experimental animals share several aspects of the anxiety-related behavior. In rodents, anxiety can be evaluated by using conflict-based avoidance tasks (Calhoun and Tye, 2015). Animal testing has been the backbone of preclinical screening for potential anxiolytic drugs. The most commonly used tests to evaluate anxiety rely on unconditioned conflict between the innate avoidance to aversive large and lighted spaces and the urge to explore novel environments (Davis et al., 2010; Rodgers et al., 1997). Additionally, behavioral testing is a suitable non-invasive tool to evaluate the effects of stress and stress-reducing drugs on experimental animals using a large set of behavioral parameters. Ethological techniques applied to classical behavioral testing can be used to enhance pharmacological sensitivity and explore the behavioral selectivity of the drugs tested (Dalvi and Rodgers, 1999; Rodgers et al., 1997). Therefore, the aim of this study was to evaluate the anxiolytic potential of the *N. grandiflora* EO and its isolated compounds DHF, DFX, ERM and SEL in mice using a multifactorial perspective of the anxiety-related behaviors. Additionally, we used an antagonist-driven protocol to assess the involvement of the GABA_A/benzodiazepine site in the neurochemical behavioral effects of the EO and respective compounds. We applied a discriminant multivariate analysis to group the variables obtained from the behavioral tests into main behavioral components and evaluate to which extent each component contributes to the final treatment effects. The participation of each isolated compound in the overall effect of the EO on the behavior of the animals was determined. At last, we assessed the effect of the isolated compounds on synaptosomal plasma membrane potential and depolarization-induced synaptosomal calcium influx, aiming to obtain additional experimental evidence for the involvement of GABAergic mechanisms in the effect of the tested compounds.

2 Material and Methods

2.1 Plant material and Essential oil (EO) extraction

Nectandra grandiflora leaves were collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil at 29°26' 25.09" S and 54°40' 27.73" W. Access to the national genetic patrimony was given by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil: #010191/2014-3). Botanical identification was performed by Dr. Solon Jonas Longhi and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Biology Department of Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (SMDB 13.162). EO was extracted for 3 h by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus, in triplicate (European Pharmacopoeia, 2010).

2.2 EO isolated compounds

The sesquiterpenoids DHF, DFX, ERM and SEL respectively amounted 22%, 10%, 6% and 4% of the *N. grandiflora* EO (Figure 1). The compounds were purified by column chromatography using silica gel 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) as stationary phase and a combination of organic solvents (hexane, acetone, ether or ethyl acetate) as mobile phase, as previously reported (Garlet et al., 2016). The isolated compounds were kept in a light-free environment at -4°C until chemical analysis and biological tests. Purity and chemical identity were assessed using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The chromatographic method is described in the supplementary material (S1a) and the total ion current (TIC-chromatogram) obtained from mass spectrometry are shown in Figure 1. Compound chemical information: DHF: 99.99% purity, C₁₅H₂₂O, CAS: 19598-45-9; density 0.9454 g/ml; Molecular weight: 218 g/mol; DFX: 96.40% purity, Molecular weight: 234 g/mol; ERM: 99.50% purity

Molecular weight: 222 g/mol SEL: 97.01 % purity, C₁₅H₂₆O, CAS: 16641-47-7; Molecular weight: 222 g/mol (Garlet et al., 2017; PubChem, 2016; Silva, 2016).

2.3 Drugs

Diazepam (DZP, Germed Pharma®, Brazil) was diluted in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4; containing 0.02% Tween 80) or in artificial cerebrospinal fluid (aCSF - 124 mM NaCl; 3.5 mM KCl; 1.25 mM NaH₂PO₄; 2 mM MgSO₄; 2 mM CaCl₂; 26 mM NaHCO₃; 10 mM D-glucose; pH: 7.35-7.45; 300-306 mOsm) and used as standard anxiolytic drug for *in vivo* tests and as positive control in *in vitro* assays. Flumazenil (FMZ) (Flumazil®, Cristália, Brazil, 0.1 mg/ml) was administered intraperitoneally in the behavioral studies and diluted in aCSF for *in vitro* assays. EO and isolated compounds were diluted in PBS containing 0.02% Tween 80 or in aCSF for *in vivo* and *in vitro* assays, respectively. All solutions were vigorously vortexed before use.

2.4 Animals

Adult male Swiss mice (25-30 g) were provided by the Animal House of the Federal University of Santa Maria. Mice were housed 8 to a cage and kept in a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00, 22 ± 1 °C; 55% relative humidity). All experiments were conducted during the light phase of the cycle (between 08:00 a.m. and 1:00 p.m.). Animals were randomly assigned to treatments and tested at random order. Mice had free access to food and water, except during tests. After each test, the animals were euthanized by decapitation and had their brains dissected for chromatographic determination of compounds. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Santa Maria, Brazil (Process number: 3627041115).

2.5 Experimental protocol

Animals were transported from the animal facility to the testing rooms (room #1 or room #2), where they were allowed to acclimate for a minimum of 20 min prior to behavioral testing. In those experiments designed to evaluate the effect of the acute administration of EO or compounds on behavioral parameters, mice (8/group) received DZP (1 mg/kg) (Chaves et al., 2017; Liu et al., 2007; Oliveira Junior et al., 2018) or EO, DHF, DFX, ERM or SEL at the doses of 10, 30 or 100 mg/kg by oral gavage (10 ml/kg, p.o.). In a complementary experiment, animals received each compound at a dose proportional to its content in the 100 mg/kg EO: 22 mg/kg DHF, 10 mg/kg DFX, 6 mg/kg ERM and 4 mg/kg SEL by gavage (10 ml/kg, p.o.). Sixty minutes after the gavage the animals were sequentially subjected to the open field and elevated plus maze for evaluation of anxiety-related behavior in room #1, as described below. The animals administered with vehicle, 1 mg/kg DZP and 10, 30 or 100 mg/kg EO were subjected to a subchronic protocol, in which they continued receiving the same drug treatment of the acute experiment once a day, for 21 days (n=8/ group). Behavioral tests were performed 24 h after the last drug administration in room #2, in order to avoid environment habituation bias and one-trial tolerance, according to Walf and Frye (2007).

In the experiments designed to investigate a possible mechanism of action of the EO and isolated compounds, we used the lowest dose with anxiolytic-like effect of each pharmacological treatment. Aiming to evaluate whether the GABA_A/benzodiazepine site plays a role in the anxiolytic effect of *N. grandiflora* EO and isolated compounds, we injected mice (n=8/ group) with vehicle or 2 mg/kg, i.p. FMZ 15 min before (Dalvi and Rodgers, 1999) vehicle, 1 mg/kg DZP, EO, DHF, DFX, ERM or SEL administration. After 60 min, mice were subjected to the behavioral evaluation in the open field and elevated plus maze. All tests were video-monitored and analyzed using the ANY-maze® software (Stoelting Co, Wood Dale, IL). Since behavioral testing is exquisitely sensitive to environmental factors, we carefully

controlled these variables, particularly experimenter presence/absence, room furniture and illumination (Sousa et al., 2006). Test room illumination was kept at 500-lux at floor level in all experiments, since high illumination levels facilitate the expression of drug-induced anxiolytic-like effects in the EPM (Leo et al., 2014; Pardon et al., 2002; Ramos et al., 2003).

2.6 Open field (OF) test

After 60 min of drug treatment, mice were individually placed in the center of a circular OF arena (30 cm high x 64 cm diameter). The animal was left alone in the room during the test. The arena was divided in three areas: center (380 cm²), middle-center (1243 cm²) and periphery (1626 cm²). Motor and ethologic activities quantified during 5 min were: number of center entries; total time spent in the center, middle-center and periphery; immobility time (scored after initial 2s of immobility); mean freezing score; number of rearing and grooming responses; total time spent rearing, grooming and sniffing (investigative floor exploration); total distance traveled and mean speed. ANY-maze ethological keyboards were set for rearing, grooming and sniffing activities. At the end of the test the apparatus was cleaned with 40% ethanol. The apparatus was completely dry prior to testing other mice.

2.7 Elevated Plus Maze (EPM) test

Immediately after the OF test, mice were transferred to an individual temporary waiting cage (1-2 s.), and then to the EPM apparatus. The EPM apparatus (two open and two enclosed arms: 30 cm x 5 cm) was made of wood with a black floor, a 5 cm x 5 cm central area positioned 40 cm above the floor and clear glass walls (15 cm high), in order to minimize the variability in the illumination level across the maze (Lister, 1987). One experimenter stayed in the room during the test to watch for animal falls. The experimenter maintained a fixed position in the room, keeping noise and movement at a minimum. Mice were placed in the center of the

apparatus facing the open arm opposite to the experimenter, and allowed to explore the EPM for 5 min (Montgomery, 1955). The parameters recorded were: number of entries and time spent in the open and closed arms; latency to enter the open arm, time spent in the distal extremity of the open arm (end activity), latency to end activity, immobility time (scored after initial 2s of immobility), mean freezing score, total distance traveled and mean speed. Ethological parameters, such as head dipping (dipping the head below the level of the maze floor), stretch-attend posture (SAP: mice stretches to its full length with the forepaws, keeping the hind paws still, and returning to its previous position), closed arms return (exiting a closed arm with only the forepaws, and returning back into a closed arm) were also recorded to increase the sensitivity of the test (Rodgers et al., 1997; Rodgers et al., 1999). Arm entries were counted when animal area within the zone were $\geq 75\%$ and arm exits were counted when animal area within the zone were $\leq 30\%$. ANY-maze ethological keyboards were set for SAP, closed arms return and head dipping activities.

2.8 Determination of EO and isolated compounds in the cortex

A satellite group of animals (n=4) was euthanized sixty minutes after drug treatment for the determination of the compound levels in the total cortex, which was isolated on ice and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The tissue was homogenized in 90% methanol (in ultrapure water) and centrifuged at $16.000\text{ }x\text{ }g$ (Centrifuge 5427R, Eppendorff®, USA) at -4°C for 15 min. The supernatant was extracted with hexane (99.99% purity) in the proportion 1:1 and centrifuged at $1300\text{ }x\text{ }g$ for 5 min for phase separation. The hexane phase was filtered in a PTFE membrane and 1 ml of the solution was transferred to a vial, had internal standard (IS) eugenol (99.99% purity) added (1mg/mL) and analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (FID). The detailed GC/FID method is shown in the supplementary material (S1b). Calibrations curves were performed with standard compounds obtained in our laboratory, as described

above. Due to the compounds profiles in the chromatographic system the EO (calculated as equivalents of DHF), DHF and ERM concentrations in the tissue were calculated by the equation $C_A/IS_A = 0.382 * ([C]/[IS]) - 4.89 \times 10^{-4}$ ($r^2 = 0.998$, $p < 0.0001$; detection limit: 4.22 ppm, quantification limit: 12.8 ppm), while DFX and SEL concentration was calculated by the equation $C_A/IS_A = 0.2059 * ([C]/[IS]) - 7.7 \times 10^{-6}$ ($r^2 = 0.994$, $p < 0.0001$; detection limit: 0.12 ppm, quantification limit: 0.38 ppm), where C_A is the integrated peak area area of the corresponding compound; IS_A is the IS integrated peak area; and $[C]$ and $[IS]$ are the compound and IS concentrations, respectively.

2.9 Synaptosomal membrane potential and free $[Ca^{+2}]$ assays

Synaptosomes were obtained according to Nagy and Delgado-Escueta (1984), with minor modifications (Garlet et al., 2017). Synaptosomal viability was monitored by lactate dehydrogenase activity. All experiments were performed in duplicate using synaptosomes with > 80% viability. Synaptosomal membrane potential was assessed by fluorescent indicator FLIPR Membrane Potential-Blue (Molecular Devices, California, USA) under resting conditions in a FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader®. Synaptosomes were incubated with 1 μ M GABA and loaded with membrane potential indicator for 30 min. Fluorescence data (excitation wavelength of 530 nm; emission wavelength: 565 nm; automatic emission cut-off: 550 nm; 1.53 s intervals) were acquired before and after the addition of aCSF (vehicle), 1-10 μ M DZP and 0.1-100 μ M DFX, ERM or SEL on synaptosomes. Membrane potential values were expressed as a ratio between variation of relative units of fluorescence and baseline values ($\Delta RFU/F$). We also investigated whether the effect these compounds on membrane potential was dependent on the presence of extracellular chloride. Therefore, vehicle, 1-10 μ M DZP and the compounds DFX, ERM and SEL were prepared in low $[Cl^-]$ -solutions using low $[Cl^-]$ -aCSF (120 mM sodium acetate; 3.5 mM KCl; 1.25 mM NaH_2PO_4 ; 2 mM $MgSO_4$; 2 mM $CaCl_2$; 26

mM NaHCO₃; 10 mM D-glucose; pH: 7.4; osmolarity: 300-306 mOsm). Synaptosome-emitted fluorescence was measured before and after the addition of the compounds to the incubation medium. Additionally, we measured intrasynaptosomal [Ca⁺²] using a calcium fluorescent probe FLIPR Calcium-5 (Calcium assay kit, Molecular Devices, California, USA). After the incubation with aCSF, 1-10 μM DZP and 0.1-100 μM DFX, ERM or SEL, the synaptosomes were loaded with the fluorescent indicator for one hour, according to the manufacturer's instructions. Synaptosomal calcium was measured before and after the addition of 10 mM KCl (to induce depolarization). Fluorescence data were obtained at excitation wavelength: 485 nm; emission wavelength: 525 nm; automatic emission cut-off: 515 nm at 1.3 s intervals. Calcium influx was expressed as fraction of maximal free-[Ca⁺²] fluorescence obtained with 1% Triton X-100 (F_{max}) by the equation $F_{Ca+2} = [(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$, where F_{min} is the mean of baseline points before KCl addition. Moreover, 1 μM FMZ pretreatment (15 min before fluorescent indicator addition) was used to evaluate whether GABA_A receptors played a role in DFX, ERM or SEL-induced changes in synaptosomal membrane potential and calcium influx.

2.10 Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM and were analyzed by one- or two-way ANOVA, depending on the experimental design. Non-parametric data were analyzed by Kruskal Wallis test, when appropriate. In order to compare acute and subchronic treatments, two-way ANOVA with repeated measures were applied on the data. A Principal Component Analysis (PCA) was used to estimate the potential multivariate correlation between the variables assessed in the OF and EPM tests. The component matrix was submitted to Kaiser-Meyer-Olkin measure of sampling adequacy, Bartlett's test of sphericity and Varimax rotation with Kaiser normalization. Principal Components with eigenvalue higher than 1 and factor loadings greater than 0.5 were considered significant. The factor loading indicates how that item correlates with the factor.

Accordingly, a loading of 1.0 specifies a perfect (positive/negative) correlation, whereas a loading of less than 0.4 would suggest that the item is rather weakly linked to the factor (Rodgers and Johnson, 1995). In this method, the first principal component (PC1) extracted is responsible for the largest percent of data variance. The subsequent components (PC2, PC3, ... PCn) explain the respective remaining variance (Henson and Roberts, 2006). *Post-hoc* analysis was carried out using the Dunnett, Tukey or Bonferroni tests. The threshold for statistical significance was set as $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] version 6.05 or SPSS (PAWS Statistic) software version 18.

3 Results

3.1 Principal component analysis (PCA) of mice behavior

Factor analysis is often used to explain a complex set of measured variables with a smaller set of constructs (PCs), enabling a more accurate interpretation of the data (Henson and Roberts, 2006). Thus, we applied this statistical method to the data obtained from the OF and EPM tests in order to detect effects of pharmacological treatment on sets of behavioral variables. The PCA scores from each pharmacological treatment were grouped in order to evaluate the overall effect of treatments on mice behavior. The PCA revealed 7 PCs that explained 70% of the data variance (Kaiser-Meyer-Olkin measure of sampling adequacy: 0.71; Bartlett's tests of sphericity: $\chi^2 = 1225.001$, $df = 210$, $p < 0.0001$). The details of the analysis are in supplementary material S2 (Tables S2a, b and Figure S2c). The detected components are described below in decrescent order of variance influence. The PC1, which explained 15.6% of the total variance, was positively associated with total time spent in open arms and open arms entries, end activity and head dipping, and negatively associated with SAP frequency. Statistical

analysis revealed that all pharmacological treatments decreased PC1 scores (Figure 2A, $p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(6, 153)} = 19.91$). The PC2 (12.8% of total variance) comprehended the OF variables total time spent in the center and middle center (positive association) and total time spent in the periphery (negative association). Statistical analysis also showed that only EO and DFX increased PC2 scores, (Figure 2B, $p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(6, 153)} = 6.16$). The PC3 (10.5% of total variance) was positively associated with immobility time, latencies to end activity and open arm entry and SAP frequency in the EPM. It is interesting that the EO and isolated compounds, but not DZP, decreased PC3 scores, which was positively associated with anxiety-related behaviors in the EPM (Figure 2C, $p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(6, 153)} = 31.06$). DZP and EO increased PC4 (9.1% of total variance) scores (Figure 2D, $p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(6, 153)} = 8.25$). This component was positively associated with total time spent in the center, number of center entries, total distance traveled in the OF and number of closed arms returns in the EPM. The PC5 (9.0% of total variance) was positively associated with vertical exploration, including number of rearings, time spent rearing and number of rearings in the center of the OF. ERM and SEL significantly increased PC5 scores (Figure 2E, $p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(6, 153)} = 5.95$). Since PC6 (7.0% of total variance) and PC7 (5.9% of total variance) were composed by a single behavioral variable each (time spent sniffing and time spent grooming, respectively), they will be discussed as a single variable, below (Figure 4). Taken together, the PCA results showed that each treatment affects distinct and overlapping sets of mice behaviors.

3.2 OF test: locomotor and ethological aspects

We also performed a *post-hoc* analysis on each behavioral variable to better characterize the anxiolytic effect of *N. grandiflora* EO and isolated compounds DHF, DFX, ERM and SEL.

The effect of these treatments on OF-derived variables are shown in Figures 3 and 4. Statistical analysis revealed a significant effect of pharmacological treatment (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 9.38$, $p < 0.05$, Figure 3A). *Post hoc* analysis (Dunnet's multiple comparison test) showed that mice treated with 1 mg/kg DZP, all doses of EO (both acute and subchronic), 100 mg/kg DHF, 30 mg/kg DFX or 30-100 mg/kg SEL spent more time in the center of the arena than control animals. Accordingly, EO (both acute and subchronic), DHF, DFX and SEL increased the number of OF center entries (one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(19, 140)} = 5.59$, $p < 0.05$, Figure 3B). All treatments, except 4 mg/kg SEL, decreased animal preference for the arena periphery (one-way ANOVA, Dunnet's test, $p < 0.001$, $F_{(19, 140)} = 4.73$, Figure 3D). EO and isolated compounds did not alter mean speed and total distance travelled (Figure 3E, F). Heatmaps of preferential mice placing in the OF arena are displayed in supplementary material (Figure S3).

Grooming behavior was modulated by all treatments: 1 mg/kg DZP, 10-30 mg/kg EO (acute and subchronic), 10-30 mg/kg, ERM, 4 and 30 mg/kg SEL increase the number of grooming (one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(19, 140)} = 7.36$, $p < 0.05$, Figure 4A). On the other hand, 1 mg/kg DZP, all EO doses (acute and subchronic), 100 mg/kg DHF, 10 mg/kg DFX, 100 mg/kg ERM and 4 and 30 mg/kg SEL increased time spent grooming (one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(19, 140)} = 4.73$, Figure 4B). Both EO (acute and subchronic) and isolated compounds increased vertical exploration in the OF. While EO and all isolated compounds increased the time spent rearing (one-way ANOVA, Dunnet's test, $p < 0.05$, $F_{(19, 140)} = 1.67$, Figure 4C), only isolated compounds increased the number of rearings (one-way ANOVA, Dunnet's test, $p < 0.05$, $F_{(19, 140)} = 4.49$, Figure 4D). We also measured the unprotected vertical exploration (rearing without wall support) in the center of the OF arena. Administration of EO, 30-100 mg/kg DHF, DFX and SEL increased unprotected rearing in the OF center (one-way ANOVA, Dunnet's test, $p < 0.05$, $F_{(19, 140)} = 2.82$, Figure 4E). Subchronic treatment with 30

mg/kg EO increased this behavior when compared with the same dose of the acute treatment. The positive control DZP (1 mg/kg) did not alter vertical exploration. All treatments increased time spent sniffing (one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(19, 140)} = 3.12$, $p < 0.001$, Figure 4F). Moreover, EO, DHF, 30-100 mg/kg DFX, 6 mg/kg ERM and 4 mg/kg SEL decreased immobility duration (one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(19, 140)} = 2.79$, $p < 0.05$, Figure 4G) and only 22-100 mg/kg DHF and 100 mg/kg DFX increased mean freezing scores (one-way ANOVA, Dunnet's test, $F_{(19, 140)} = 30.25$, $p < 0.05$, Figure 4H).

3.3 Anxiolytic-like effect of EO and isolated compounds in the EPM test

The EPM test was carried out to assess anxiety-like behavior of mice treated with *N. grandiflora* EO and its isolated compounds, and the effect of pharmacological treatment on each EPM variable is shown in Figures 5 and 6. The EO subchronic treatment at the dose of 10 mg/kg induced a higher number of open arms entries compared to the same dose of the EO acute treatment (two-way ANOVA with repeated measures, $F_{(1, 35)} = 7,629$, $p < 0.01$, Figure 5A). The administration of 1 mg/kg DZP, 10-100 mg/kg EO (acute and subchronic), 10, 22 and 100 mg/kg DHF and all tested doses of DFX, ERM and SEL increased the number of entries in the open arms (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 3.61$, $p < 0.05$, Figure 5A), as well as the time spent in these areas (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 3.79$, $p < 0.001$, Figure 5B). Only DZP treatment altered the number of closed arms entries (Figure 5C), while DZP, 30 mg/kg EO and the isolated compounds at all doses decreased the time spent in the closed arms (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 2.39$, $p < 0.001$, Figure 5D). Furthermore, the latency to the animal first entry in the open arms was decreased in more than 50% by all treatments (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 6.35$, $p < 0.001$, Figure 5E). Time spent in the open arms borders (end activity) was increased by the positive control 1 mg/kg DZP, 30-100 mg/kg EO, 30-100 mg/kg DHF, 10 mg/kg DFX and 10-100 mg/kg SEL (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 5.55$, $p < 0.05$, Figure 5F). Treatment with EO

(acute and subchronic), 22-100 mg/kg DHF and all doses of DFX, ERM and SEL prompted the exploration of the open arms borders (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 3.96$, $p < 0.001$, Figure 6A), whereas this parameter was not affected by the positive control 1 mg/kg DZP. Heatmaps of mice spatial profile in the EPM are displayed in supplementary material (Figure S4).

All treatments, except 6 mg/kg ERM, increased the number of head dips (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 5.14$, $p < 0.001$, Figure 6B). Defensive behavior, measured as SAP and number of closed arms returns were decreased by all treatments (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 12.31$, 20.46 , $p < 0.001$, Figure 6C, D, respectively). Animal immobility was not affected by DZP while was decreased by EO (acute and subchronic) and the isolated compounds at all doses (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 5.19$, $p < 0.001$, Figure 6E). However, the mean freezing score was only increased by DZP (acute treatment), all doses of EO (acute and subchronic) and DHF, 10 mg/kg DFX and 6 mg/kg ERM (one-way ANOVA, $F_{(19, 140)} = 4.92$, $p < 0.05$, Figure 6F). As observed in the OF test, locomotory behavior was not affected in the EPM test by the treatment with EO (acute nor subchronic) or isolated compounds (Figures 6G, H). Lastly, the experiment that evaluated the effect of each isolated compound, at a dose proportional its respective amount in the EO, on OF and EPM parameters (Figures 3-6) revealed that, in general, each isolated compound induced similar or larger (anxiolytic-like) effects than its natural combination in the EO.

3.4 GABA_A receptors role in the EO and isolated compounds anxiolytic-like effect

We further evaluated whether the effect of the *N. grandiflora* EO and the compounds DHF, DFX, ERM and SEL on mice anxiety-like behavior required the involvement of the GABA_A receptors. For this purpose, we pretreated the animals with the GABA_A/benzodiazepine site antagonist flumazenil before the acute administration of a single dose of the EO or the isolated compounds capable to induce anxiolytic-like effect in all analyzed parameters. The

pre-administration of 2 mg/kg FMZ prevented the anxiolytic-like effect of the EO and isolated compounds regarding several parameters in the OF and EPM test. Therefore, we grouped this larger set of results into the previous 7 PCs extracted from the PCA. The results are shown in Figure 7 and the heatmaps of the locomotory profile in the OF arena and EPM apparatus of mice injected with vehicle or FMZ before selected doses of EO and the isolated compounds are displayed in Figure 8. The injection of FMZ *per se* did not alter any analyzed parameter and prevented all DZP-induced anxiolytic-like effects. The injection of FMZ prevented the EO and the compounds DHF and DFX effect on the PC1 parameters (two-way ANOVA, $F_{(6, 98)} = 5,39$, $p < 0.001$). The EO-, DHF- and SEL-induced changes in the PC2 was prevented by FMZ (two-way ANOVA, $F_{(6, 98)} = 3,54$, $p < 0.001$). The FMZ injection prevented the effect of all treatments on the PC3 (two-way ANOVA, $F_{(6, 98)} = 2,68$, $p < 0.05$), while only EO and DFX effect on PC4 (two-way ANOVA, $F_{(6, 98)} = 2,61$, $p < 0.05$) and DHF and ERM effect on PC5 (two-way ANOVA, $F_{(6, 98)} = 2,39$, $p < 0.05$) were sensitive to the FMZ. Additionally, FMZ did not alter the treatments effect on sniffing behavior (PC6) while, in turn, blocked the effect of the EO and DHF on grooming time (PC7) (two-way ANOVA, $F_{(6, 98)} = 3,99$, $p < 0.001$; data not shown). Taken together, these results suggest the involvement of GABA_A receptors in several, but not all, aspects of the anxiolytic-like effect of the *N. grandiflora* EO or the compounds DHF, DFX, ERM and SEL.

3.5 EO subchronic treatment altered animal weight gain

We observed that mice undergoing EO subchronic treatment had a higher weight gain than control animals similarly to those animals under DZP treatment (Figure S5). Diazepam-treated mice showed a higher weight gain after the 15^o day, while 30 mg/kg EO-treated mice exhibited a significantly body weight gain after the 12^o day of treatment, when compared to control group (two-way ANOVA with repeated measurements, $F_{(80, 700)} = 1.882$, $p < 0.05$).

Vehicle-treated mice had a significantly increase in body weight after the 10^o day, while 10, 30 and 100 mg/kg EO induced an increase in body weight after the 5^o, 4^o and 7^o day of treatment, respectively, when compared to the first day of treatment.

3.6 Cortical concentration of EO and isolated compounds

We measured the content of EO and isolated compounds in the cerebral cortex by gas chromatography and the results are displayed in Figure 9. Overall EO content in cortical tissue ranged from 30.2 ± 3.4 to 65.0 ± 0.5 and 36.8 ± 1.3 to 41.2 ± 5.8 ng/mg after acute and subchronic treatment, respectively. The higher EO content was detected in the cortex of mice treated acutely with 30 mg/kg EO and this value differed from the subchronic treatment ($p < 0.001$, two-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(2, 6)} = 7.6$). The lower content of the compound DHF was detected in the cortex of the 10 mg/kg treated mice (8.0 ± 0.1 , 12.7 ng/mg), which was statically different from the remaining groups 22 30 and 100 mg/kg DHF-treated mice (17.8 ± 4.3 , 12.7 ± 1.4 and 19.4 ± 0.4 ng/mg, respectively) ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey's test, $F_{(3, 8)} = 5.2$). The amount of DFX did not differ among the treatment doses and ranged from 6.4 ± 0.2 to 7.2 ± 0.8 ng/mg. The increase of the cortical content of ERM and SEL was dose dependent. The concentration of ERM ranged from 1.6 ± 0.3 to 15.1 ± 1.4 (one-way ANOVA, Tukey's test, $F_{(3, 8)} = 27.4$, $p < 0.05$), while SEL concentrations ranged from 0.2 ± 0.1 to 1.4 ± 0.1 ng/mg (one-way ANOVA, Tukey's test, $F_{(3, 8)} = 6.9$, $p < 0.05$).

3.7 Synaptosomal membrane potential and free $[Ca^{+2}]$ assays

Since we previously reported that DHF decreases KCl-induced depolarization and calcium influx (Garlet et al., 2017), we evaluated whether DFX, ERM and SEL modulate membrane potential and the downstream calcium influx in synaptosomes. We found that 10-100 μ M DFX, 100 μ M ERM and 1-100 μ M SEL facilitate GABA (1 μ M)-induced

depolarization (Figure 10A; * $p < 0.001$, one-way ANOVA, Dunnett test; $F_{(14, 45)} = 25.33$) estimated by the fluorescence emitted from a membrane potential probe. The inhibitory effect of DFX, ERM and SEL on membrane potential were similar to that induced by 1 μM DZP, and was sustained over time (Figures 10B, C and D, respectively). We also assessed whether this effect depends on GABA_A receptors. Thus, synaptosomes were treated with FMZ in order to block GABA_A/benzodiazepine-site before addition of 1-10 μM DZP, 1 μM DFX, 100 μM ERM or 1 μM SEL. The presence of FMZ in the medium prevented the hyperpolarization induced by DZP, DFX, ERM and SEL (Figure 10E; * $p < 0.0001$, two-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(5, 36)} = 9.48$). Since GABA_A-mediated hyperpolarization is chloride dependent, we measured the fluctuations in membrane potential after the addition of 1-10 μM DZP, 1 μM DFX, 100 μM ERM or 1 μM SEL in a low-[Cl⁻] medium. DFX, ERM and SEL did not facilitate hyperpolarization in a low-[Cl⁻] medium, further indicating a role for GABA_A mechanisms in the currently reported effects of these compounds (Figure 10F; * $p < 0.0001$, two-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(5, 36)} = 16.61$). Accordingly, the positive control DZP did not induce significant changes in membrane potential in a low-[Cl⁻] medium.

We next evaluated the downstream depolarization-evoked calcium influx in the presence of the compounds DFX, ERM and SEL. The incubation with 0.1, 1 and 100 μM DFX, 0.1-100 μM ERM and 100 μM SEL blunted KCl-evoked synaptosomal calcium influx (Figure 10G; * $p < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnett test; $F_{(14, 60)} = 4.97$) and this effect was sustained overtime (Figure 10H). It is worth to highlight that 0.1 μM DFX, 0.1 μM ERM and 100 μM SEL decreased around 47%, 83% and 69%, respectively, of the calcium influx upon depolarization, while 10 μM DZP induced a decrease of 32% of calcium influx. Moreover, we investigated the GABA_A receptors role in the DFX, ERM and SEL effect on calcium influx. As performed in the membrane potential assay, we treated the synaptosomes with 1 μM FMZ before incubation with the compounds. The incubation with the GABA_A/benzodiazepine

antagonist did not alter the effect of the compounds DFX, ERM and SEL on calcium influx (Figure 10I; * $p < 0.05$ two-way ANOVA, Bonferroni's test, $F_{(5, 48)} = 4.24$).

4 Discussion

In the current study we assessed the anxiolytic-like effect of the *N. grandiflora* EO and its four isolated sesquiterpenoids in mice using the OF and EPM paradigms. This work provides converging evidence that the EO induces anxiolytic-like effects and acknowledged the compounds that were most likely responsible for such action. We also devised the most likely mechanism by which the EO and the isolated compounds exert their anxiolytic action using behavioral and *in vitro* approaches. Main concerns regarding the use of natural products are the stability of plant extract yield and compound content (Garg et al., 2012; Kumari and Kotecha, 2016). Accordingly, the extraction yield (data not shown) and the sesquiterpenoids DHF, DFX, ERM and SEL content in the *N. grandiflora* EO were consistent with previous reports (Garlet et al., 2016; Garlet et al., 2017; Heinzmann et al., 2014; Silva, 2016).

Preclinical tests, such as the OF and the EPM, are simple, standardized, efficient and reliable tools to screen potential anxiolytic agents (Robinson et al., 2018; Seibenhener and Wooten, 2015). The evaluation of rodent spontaneous activity is one of the most frequently used methods in behavioral neuroscience to characterize anxiolytic drugs (Berlyne, 1966; Tanaka et al., 2012) because they also assess neurological side effects, such as sedation, ataxia and stereotypical behavior (Grundmann et al., 2007). The OF and EPM assays exploit the innate fear of rodent from open, elevated and light environments and, therefore, the conflict between the investigation of these novel places and the fear of exposure to potential threat (Pawlak et al., 2008). In this study, EO and all tested compounds induced anxiolytic-like effect in the OF

and EPM paradigms. In fact, PCA analysis revealed that EO modifies six out of seven components extracted. DHF altered four components while DFX, ERM and SEL changed five out of seven principal components. It is worth to point out that ERM and SEL induced an anxiolytic-like effect in the EPM test at the lowest doses tested (ERM: 6 mg/kg and SEL: 4 mg/kg), which correspond to the proportional content of these compounds in 100 mg/kg EO. These findings constituted unexpected evidence that, even at low concentrations in the EO, ERM and SEL contribute to the EO-induced anxiolytic-like effect. Although the four isolated sesquiterpenoids are derived from the same basic skeleton (Figure 1), only ERM and SEL have hydroxyl groups in their structures. The effect observed for these two compounds at low doses suggests that alcohol function is an important structural feature for the anxiolytic effect. Our data suggest that all isolated compounds contributed to the final effects of the EO on mice behavior in the OF and EPM tests. It is worth remarking that we did not observe a dose-response relationship for EO in the majority of the analyzed parameters. Such a lack of dose-effect response agrees with the analytical findings that increasing systemic doses of DHF, DFX and EO cause similar tissue levels in the cerebral cortex.

In the OF test, anxiety-like behavior is triggered by two factors: individual testing (animal is isolated from its social group) and agoraphobia, since the arena is a large and new environment (Prut and Belzung, 2003). Mice movement towards the OF arena periphery is a primary anxiety-related behavior. Benzodiazepines increase OF center entries and increase the time spent in this area (Prut and Belzung, 2003; Thompson et al., 2015). Therefore, increased time spent in the center without modification of total locomotion/main speed has been interpreted as an anxiolytic-like effect (Liu et al., 2007; Robinson et al., 2018). We observed that EO, at all tested doses in both acute and subchronic treatments, DHF, DFX and SEL increased the time spent in the center and the number of center entries. Accordingly, these compounds also decreased the time spent in the periphery. Although the compound ERM did

not increase center time or entries, it did increase middle-center time and decreased periphery time, which is consistent with a reduction in anxiety-like behavior. An increase in time spent in the central part of the OF can be interpreted as an anxiolytic-like effect. The positive control, 1mg/kg DZP, did not alter the PCA-extracted component PC3, which includes time spent in the arena center, middle-center and periphery. These results confirm the efficacy of the *N. grandiflora* EO and isolated compounds as anxiolytic agents.

Ethological assessment of mice behavior showed that EO and isolated compounds (at specific doses) induced an increase in grooming behavior similar to DZP. Compound doses that did not alter grooming, for instance 22-30 mg/kg DHF and 10 mg/kg ERM, increased rearing. This fact raises the possibility of behaviors competition between grooming and vertical exploration with consequently reduction of opportunities to groom. Grooming is an innate behavior that may appear or intensify in low-stress situations as well as result of anxiolytic treatment, particularly with GABAergic drugs (Kalueff and Tuohimaa, 2005). Moreover, the EO and all tested compounds increased time spent sniffing and, at some level, vertical exploration, including unprotected rearing where the animal had no contact with the walls. Increasing in sniffing, which is an information-gathering behavior, is linked with lower anxiety levels (Kalueff et al., 2006) while decreased vertical activity are related to sedation (Prut and Belzung, 2003). However, when all parameters of vertical exploration were grouped by the PCA approach (PC5), we observed that only ERM and SEL compounds induced significant change in all aspects of this behavior (Figure 2 E). The rodent's natural behavior of horizontal and vertical exploration is employed to assess novel environments (Kalueff et al., 2006). Vertical exploration is more sensitive to anxiety than horizontal locomotion and both are related with cognitive functions such as spatial memory (Kalueff et al., 2007; Lapin et al., 1995). The OF exploration in mice is a conservative behavior (Kalueff et al., 2006) and it is believed that anxiolytic drugs decrease the stress-induced inhibition of exploration behavior (Prut and

Belzung, 2003). By any means, the final result of an exploration-boost treatment is perceived as an anxiolytic-like effect. Conversely, the treatment with DZP fail in increase environment exploration, which is in agreement with a previous study that reports the DZP-induced decrease in the number of rearings (Chaves et al., 2017). In general, anxiolytic drugs with GABAergic mechanism and SSRIs decrease the number of rearings mostly due to sedation (Brookshire and Jones, 2009; Figueredo et al., 2013).

The EPM is a simple tool for rodent's anxiety evaluation that not requires the induction of a noxious stimuli (Handley and Mithani, 1984). This test relies on the animal tendency toward dark, enclosed spaces and its unconditioned fear of heights/open spaces. Moreover, the EPM test is a model that efficiently detect GABAergic-mediated anxiolytic effects of compounds (Walf and Frye, 2007). All treatments that increased the time spent in the OF center also increased the time spent by the animal in the open arms in the EPM, which is in agreement with the literature (Frye et al., 2000). The EO (acute and subchronic treatments) and all compounds increased open arms time and decrease closed arms time, highlighting its anxiolytic-like effect (de Sousa et al., 2015; Jiménez-Ferrer et al., 2017; Saiyudthong et al., 2015; Tian et al., 2017). There is evidence that open arm exposure induces an increase in plasma corticosterone and this phenomenon is positively correlated with risk assessment behavior in EPM (Macri et al., 2002; Rodgers et al., 1999). Risk assessment is a very significant aspect of the anxiety response since it guides the decision-making in an anxiety-inducing environment. We measure the mice risk assessment as SAP and closed arms returns, which are cautious explorations performed to facilitate information gathering in potentially dangerous environments (Blanchard et al., 1986; Brandao et al., 2008; Jacinto et al., 2016; Rodgers and Johnson, 1995). Thus, SAP is a "conflict" behavior that allows the detection of "conflict reducing properties" of drugs (Brinks et al., 2007; Kaesermann, 1986), while the closed arms returns elicits the avoidance generated as response to the open arm threatening environment

(Jacinto et al., 2016). The subchronic control animals presented a lower SAP number than the acute control group, which is expected since both novelty and conflict tend to diminish when animals are repeatedly exposed to a novel test situation, as proposed by Kaesermann (1986). In our study we demonstrated that the *N. grandiflora* EO (acute and subchronic) and all isolated compounds reduced the SAP and the number of closed arms returns in all doses tested. These treatments not only increase the time that mice spent in the “danger zone” but also decrease the conflict generated by the potential threats that this zone may offer. Another risk assessment behavior observed in the EPM test is the head dipping, which in turn, is a primary index of exploratory behavior and is positively related with an anxiolytic effect (File, 1983; Takeda et al., 1998; Walf and Frye, 2007). Benzodiazepine typically increase the number of head-dips without induce sedation (Dalvi and Rodgers, 1999; Takeda et al., 1998), which was also observed for the mice treated with EO and the compounds. Moreover, enhanced head-dipping activity associated with reductions in SAP is considered a marker for benzodiazepine-like behavioral activity (Rodgers et al., 1997). Conversely, EO- and the compounds-induced anxiolytic-like effects differ from DZP in several aspects, such as in the amount time that mice remain immobile. In both OF and EPM tests, DZP treatment induced immobility similar to the control group, while the EO and compounds treatments reduced this behavior. Immobility is a defensive behavior expressed in response to unavoidable fear stimuli (Blanchard et al., 2001; Bolles and Collier, 1976; Brandao et al., 2008). An acknowledged fact is that benzodiazepines such as diazepam, chlordiazepoxide and alprazolam induce an increase in immobility; however, no such changes were observed with partial agonists (Pollard and Howard, 1988; Rodgers et al., 1997). Furthermore, in general, GABA_A-mediated anxiolytic effects of natural compounds are accompanied by increase in immobility and a decrease in locomotory parameters due sedation (Cicek, 2018; de Sousa et al., 2015; Oliveira Junior et al., 2018). Our results demonstrated that the EO and compounds reduced immobility time, decreased defensive-

related behaviors, but did not alter ambulation. Thus, EO and isolated compounds induce an anxiolytic-like effects without sedation in both OF and EPM tests. Additionally, each isolated compound induced similar or larger (anxiolytic-like) effects than its natural combination in the EO. These results indicate a nonadditive interaction among the constituents of the EO on OF parameters. Therefore, further studies are necessary to clarify whether these nonadditive antagonist effects are due to pharmacodynamic or pharmacokinetic interactions among the currently studied constituents of the EO or another compound.

Furthermore, we aimed to assess the main mechanism of action of these drugs. Previous studies of our lab already detected that the anticonvulsant effect DHF in mice is likely a result of its interaction with GABA_A receptors (Garlet et al., 2017). Furthermore, we hypothesize whether the anxiolytic properties of the isolated compounds and the EO are also mediated by the GABA_A receptors based on: (1) the similarity among the chemical structures of the four isolated sesquiterpenoids and (2) that DHF, as the EO major constituent, is likely to be responsible for the EO main pharmacological effects. The injection of FMZ inhibited the anxiolytic-like effect of all treatments on specific behaviors. Moreover, the final effect of the EO on each principal component appears to be mediated by different compounds. For instance, the EO effect on PC5 was not affected by FMZ and followed the same pattern of the compound SEL. On the other hand, the EO effect on PC1, which explain the majority of data variance and includes the anxiolytic effect on the EPM, is better associated with the compounds DHF and DFX. These two compounds have a greater number of double bonds and, therefore, a more planar structure (Figure 1). Besides this aspect, they present a carbonyl group, which, together with the greater planarity, may be positively influencing their interference with the effects detected in the EPM. Nevertheless, all compounds are associated with the EO effect on PC2 and the effect of all treatments on this component were blocked by FMZ. These results lead us to believe that the GABA_A receptors/benzodiazepine site play a role in several aspects of the

anxiolytic-like effect induced by the EO and compounds. Accordingly, some benzodiazepines-induced effects are not blocked by the FMZ (Dalvi and Rodgers, 1999). Besides the high-affinity site for benzodiazepines, these molecules have been shown to interact with multiple noncanonical sites at subunit interfaces and in the transmembrane part of the receptor (Sieghart, 2015; Sigel and Ernst, 2018). These noncanonical sites, when lacking a γ subunit at recombinant GABA_A receptors, are insensitive to FMZ (Burt and Kamatchi, 1991; Hall et al., 2014). Furthermore, ligands of benzodiazepine high-affinity site could also interact with noncanonical sites (Sieghart, 2015) and therefore, its effects only can be partially blocked by FMZ. Additionally, the natural compounds spectrum includes molecules that may interact with distinct types of receptors and anxiolytic drugs that often share a GABAergic-serotonergic mechanism (Cicek, 2018; Liu et al., 2015).

Moreover, we analyzed the effect of the compounds DFX, ERM and SEL on synaptosomal membrane potential and downstream calcium influx dynamics. Synaptosomes are a standardized *in vitro* model of neuronal terminal endings widely applied to detect the actions of drugs on neuronal signaling pathways (Chang et al., 2015; Dunkley et al., 2008; Evans, 2015; Kamat et al., 2014; Kammerer et al., 2011; Lin et al., 2014). The compound DHF is already acknowledged by its effects on GABAergic currents and its FMZ-sensitive inhibition of calcium influx in the same synaptosome model. Although DHF showed direct effect on membrane potential, the presence of GABA in the incubation medium potentialized its effects (Garlet et al., 2017). We found that the compounds DFX, ERM and SEL had no direct effect on membrane potential (data not shown) but enhance GABA_A currents in presence of 1 μ M GABA (Figure 10A-D), which characterizes these molecules as allosteric modulators and not agonists *per se* (Sigel and Ernst, 2018). In the same way, it was demonstrated that topiramate and flunitrazepam effect on GABAergic currents is dependent on the concentration of GABA in the medium (Sieghart, 2015; White et al., 1997). We found that the DFX, ERM and SEL-

induced changes in membrane potential is sensitive to FMZ and also dependent of the presence of chloride in the medium, which support the interaction of this compounds with the GABA_A receptors. Substances that act by strengthening GABAergic neurotransmission induce a sustained cell hyperpolarization, which consequently inhibits voltage-dependent Ca²⁺ influx in nerve terminals (Long et al., 2009). In this study we observed that the compounds DFX, ERM and SEL did blunt the calcium influx upon depolarization in synaptosomes. However, this effect was not blocked by FMZ and appears in lower concentrations than those that altered membrane potential. This was an unexpected result since the DHF-induced calcium influx inhibition was reported as FMZ-sensitive (Garlet et al., 2017). This fact could explain the differences observed between DHF and the other compounds on the behavioral performance of mice exposed to these molecules. Moreover, the FMZ-independent DFX-, ERM- and SEL- effect on calcium influx may be the reason why these compounds induced several behavior changes that were not affected by the FMZ treatment in the *in vivo* assays. Anyway, the outcome of the treatment with all four sesquiterpenoids is the inhibition of calcium influx, which has a very important role in the anxiolytic-like effect of these substances. A recent study demonstrates that an increase in Ca²⁺ activity in the ventral hippocampus (area involved with stress/anxiety/fear processing) is positively linked with the anxious stimulus of the EPM open arms (Jimenez et al., 2018). Therefore, molecules that potentially decrease calcium influx, such as those reported in this study, may attenuate neuron activity in areas in charge of the activation of anxiety response.

Anxiety resulted from an evolutionary process that provides an alert signal that triggers behavioral, physiological, and cognitive changes that lead to the adaptive avoidance necessary to safely scan and explore an environment (Hayes and Hofmann, 2018; Weinberger, 2001). On the other hand, anxiety disorders result from a deregulation of physiological and behavioral responses to fear originated from the misinterpretation of a potential danger (Gelfuso et al., 2014; Kessler et al., 2011). Anxiety disorders are characterized by chronicity potential, high

burden and prevalence, affecting around 10% of the population (Baric et al., 2018). The World Health Organization estimated that between 1990 and 2013, the number of people suffering from anxiety increased by nearly 50% (WHO, 2018). The pharmacological treatment of this condition includes the SSRIs (first line treatment, well tolerated, but linked to sexual dysfunction); the benzodiazepines that induce sedation, abuse/dependence; buspirone, which have delayed clinical effect; the tricyclic antidepressants and monoamine oxidase inhibitors, which are linked to poor tolerability by the patients; and the anticonvulsant pregabalin that also induce sedation (Koen and Stein, 2011; Ravindran and Stein, 2010). Treatment adherence is impaired due to undesirable effects and patients often make use of herbal medicine, including the EOs, as complementary treatment in order to avoid or minimize side effects from conventional anxiolytic drugs (Dehkordi et al., 2017; Ernst, 2006; Kwon et al., 2018; Ni et al., 2013; Santosh et al., 2011). Despite of the large arsenal of anxiolytic treatments, there is still a need for research on drugs with a rapid onset of action that are better tolerated and with limited abuse potential. Here, we detected a clear effect of the *N. grandiflora* EO and its isolated compounds on anxiety-related behaviors. Therefore, we added to the anxiety research a potential source of alternative molecules able to reduce anxiety-like responses at low doses (4-10 mg/kg), which correspond to dosages given in humans (~100 mg/day) (Koen and Stein, 2011; Ravindran and Stein, 2010).

5 Conclusions

Our findings demonstrate that the *N. grandiflora* EO and the compounds isolated in this study have anxiolytic-like effect in mice. Each compound modifies distinct types of anxiety-related behaviors and all four sesquiterpenoids collaborate to the final anxiolytic effect of the

EO. The results suggest that the EO and compounds decrease anxiety-induced behaviors due to positive modulation of GABA_A receptors. Besides the interaction with the benzodiazepine-site, neither the EO or the isolated compounds induced sedation at anxiolytic doses. Moreover, the compounds DFX, ERM and SEL anxiolytic effects may involve a GABA_A/benzodiazepine site-independent modulation of neuronal calcium influx. Therefore, we move a step forward in the enlightenment of the pharmacological profile of this native Brazilian species. Furthermore, studies involving other behavioral and molecular models would help to dissect the individual constituent contributions to the EO overall anxiolytic-like effect and to explore additional mechanisms by which these molecules act.

Authorship contributions

Participated in research design: QIG, BMH and CFM.

Conducted experiments: QIG, PR, LBB, ALL.

Performed data analysis: QIG and CFM.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: QIG, BMH and CFM.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) scholarship. BMH and CFM are recipients of productivity fellowships of CNPq (grant numbers 454447/2014-0, 307812/2014-6, respectively). PR and LBB received grants for technological initiation from CNPq and the FIPE-UFSM program, respectively. The authors would like to thank the Professor Dr. Denis Broock Rosemberg for his kindly assistance with the PCA statistics.

Supplementary data

Supplementary data related to this article is available.

References

- Azanchi, T., Shafaroodi, H., Asgarpanah, J., 2014. Anticonvulsant activity of *Citrus aurantium* blossom essential oil (Neroli): Involvement of the GABAergic system. *Natural Product Communications* 9, 1615-1618.
- Baric, H., Dordevic, V., Cerovecki, I., Trkulja, V., 2018. Complementary and Alternative Medicine Treatments for Generalized Anxiety Disorder: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv Ther* 35, 261-288.
- Berlyne, D. E., 1966. Curiosity and exploration. *Science* 153, 25-33.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J., 2001. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 205-218.
- Blanchard, R. J., Flannelly, K. J., Blanchard, D. C., 1986. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 100, 101-107.
- Bolles, R. C., Collier, A. C., 1976. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Animal Learning & Behavior* 4, 6-8.
- Brandao, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., Landeira-Fernandez, J., 2008. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behav Brain Res* 188, 1-13.
- Brinks, V., van der Mark, M., de Kloet, R., Oitzl, M., 2007. Emotion and cognition in high and low stress sensitive mouse strains: a combined neuroendocrine and behavioral study in BALB/c and C57BL/6J mice. *Front Behav Neurosci* 1, 8.
- Brookshire, B. R., Jones, S. R., 2009. Direct and indirect 5-HT receptor agonists produce gender-specific effects on locomotor and vertical activities in C57 BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 94, 194-203.
- Burt, D. R., Kamatchi, G. L., 1991. GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J* 5, 2916-2923.
- Calhoon, G. G., Tye, K. M., 2015. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience* 18, 1394.
- Chang, Y., Chang, C. Y., Wang, S. J., Huang, S. K., 2015. Myricetin inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals. *J Med Food* 18, 516-523.
- Chaves, E. M. C., Honório-Júnior, J. E. R., Sousa, C. N. S., Monteiro, V. S., Nonato, D. T. T., Dantas, L. P., Lúcio, A. S. S. C., Barbosa-Filho, J. M., Patrocínio, M. C. A., Viana, G. S. B., Vasconcelos, S. M. M., 2017. The anxiolytic-like effect of 6-styryl-2-pyrone in mice involves GABAergic mechanism of action. *Metabolic Brain Disease*, 1-11.
- Chioca, L. R., Ferro, M. M., Baretta, I. P., Oliveira, S. M., Silva, C. R., Ferreira, J., Losso, E. M., Andreatini, R., 2013. Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology* 147, 412-418.
- Cicek, S. S., 2018. Structure-Dependent Activity of Natural GABA(A) Receptor Modulators. *Molecules* 23.
- Costa, C. A., Kohn, D. O., de Lima, V. M., Gargano, A. C., Florio, J. C., Costa, M., 2011. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *J Ethnopharmacol* 137, 828-836.
- Costa, C. A. R. A., Cury, T. C., Cassettari, B. O., Takahira, R. K., Flório, J. C., Costa, M., 2013. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13.

- Dalvi, A., Rodgers, R. J., 1999. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. *Pharmacol Biochem Behav* 62, 727-734.
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., Grillon, C., 2010. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35, 105-135.
- de Sousa, D. P., de Almeida Soares Hocayen, P., Andrade, L. N., Andreatini, R., 2015. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. *Molecules* 20, 18620-18660.
- Dehkordi, A. K., Tayebi, A., Ebadi, A., Sahraei, H., Einollahi, B., 2017. Effects of aromatherapy using the damask rose essential oil on depression, anxiety, and stress in hemodialysis patients: A clinical trial. *Nephro-Urology Monthly* 9.
- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., Robinson, P. J., 2008. A rapid percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols* 3, 1718-1728.
- Ernst, E., 2006. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine* 13, 205-208.
- European Pharmacopoeia, 2010. European Directorate for the Quality of Medicines. In: *Pharmacopoeia*, E., (Ed), Strassbourg.
- Evans, G. J., 2015. The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. *Cold Spring Harb Protoc* 2015, 421-424.
- Fajemiroye, J. O., Galdino, P. M., De Paula, J. A., Rocha, F. F., Akanmu, M. A., Vanderlinde, F. A., Zjawiony, J. K., Costa, E. A., 2014. Anxiolytic and antidepressant like effects of natural food flavour (E)-methyl isoeugenol. *Food Funct* 5, 1819-1828.
- Figueredo, Y. N., Rodriguez, E. O., Reyes, Y. V., Dominguez, C. C., Parra, A. L., Sanchez, J. R., Hernandez, R. D., Verdecia, M. P., Pardo Andreu, G. L., 2013. Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20: a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule. *Neurol Res* 35, 804-812.
- File, S. E., 1983. Tolerance to the anti-pentylentetrazole effects of diazepam in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 79, 284-286.
- Frye, C. A., Petralia, S. M., Rhodes, M. E., 2000. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 587-596.
- Garg, V., Dhar, V. J., Sharma, A., Dutt, R., 2012. Facts about standardization of herbal medicine: a review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 10, 1077-1083.
- Garlet, Q. I., Pires, L. C., Silva, D. T., Spall, S., Gressler, L. T., Bürger, M. E., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. *Braz J Med Biol Res* 49, e4872.
- Garlet, Q. I., Pires, L. D. C., Milanese, L. H., Marafiga, J. R., Baldisserotto, B., Mello, C. F., Heinzmann, B. M., 2017. (+)-Dehydrofukinone modulates membrane potential and delays seizure onset by GABA_A receptor-mediated mechanism in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 332, 52-63.
- Gelfuso, E. A., Rosa, D. S., Fachin, A. L., Mortari, M. R., Cunha, A. O., Belebony, R. O., 2014. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13, 150-165.
- Grundmann, O., Nakajima, J., Seo, S., Butterweck, V., 2007. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol* 110, 406-411.
- Hall, B. J., Karim, N., Chebib, M., Johnston, G. A., Hanrahan, J. R., 2014. Modulation of ionotropic GABA receptors by 6-methoxyflavanone and 6-methoxyflavone. *Neurochem Res* 39, 1068-1078.

- Handley, S. L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327, 1-5.
- Hayes, S. C., Hofmann, S. G., 2018. Survival circuits and therapy: from automaticity to the conscious experience of fear and anxiety. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 24, 21-25.
- Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Longhi, S. J., Silva, D. T., Silva, L. L., Bianchini, N. H., Garlet, Q. I., 2014. Método de sedação e/ou anestesia em animais aquáticos e o uso da deidrofuquinona. Sedation and/or anesthetic method on aquatic animals and dehydrofukinone utilization. BR1020140136304.
- Henson, R. K., Roberts, J. K., 2006. Use of Exploratory Factor Analysis in Published Research: Common Errors and Some Comment on Improved Practice. *Educational and Psychological Measurement* 66, 393-416.
- Jacinto, L. R., Cerqueira, J. J., Sousa, N., 2016. Patterns of Theta Activity in Limbic Anxiety Circuit Preceding Exploratory Behavior in Approach-Avoidance Conflict. *Front Behav Neurosci* 10, 171.
- Jiménez-Ferrer, E., Santillán-Urquiza, M. A., Alegría-Herrera, E., Zamilpa, A., Noguerón-Merino, C., Tortoriello, J., Navarro-García, V., Avilés-Flores, M., Fuentes-Mata, M., Herrera-Ruiz, M., 2017. Anxiolytic effect of fatty acids and terpenes fraction from *Aloysia triphylla*: Serotonergic, GABAergic and glutamatergic implications. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 96, 320-327.
- Jimenez, J. C., Su, K., Goldberg, A. R., Luna, V. M., Biane, J. S., Ordek, G., Zhou, P., Ong, S. K., Wright, M. A., Zweifel, L., Paninski, L., Hen, R., Kheirbek, M. A., 2018. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron* 97, 670-683 e676.
- Kaesermann, H. P., 1986. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. *Psychopharmacology (Berl)* 89, 31-37.
- Kalueff, A. V., Jensen, C. L., Murphy, D. L., 2007. Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain Res* 1169, 87-97.
- Kalueff, A. V., Keisala, T., Minasyan, A., Kuuslahti, M., Tuohimaa, P., 2006. Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests. *Behav Processes* 72, 104-112.
- Kalueff, A. V., Tuohimaa, P., 2005. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 508, 147-153.
- Kamat, P. K., Kalani, A., Tyagi, N., 2014. Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain. *MethodsX* 1, 102-107.
- Kammerer, M., Brawek, B., Freiman, T. M., Jackisch, R., Feuerstein, T. J., 2011. Effects of antiepileptic drugs on glutamate release from rat and human neocortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383, 531-542.
- Kessler, R. C., Ruscio, A. M., Shear, K., Wittchen, H. U., 2011. Epidemiology of anxiety disorders. *Curr Top Behav Neurosci* 2, 21-35.
- Koen, N., Stein, D. J., 2011. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. *Dialogues Clin Neurosci* 13, 423-437.
- Kumari, R., Kotecha, M., 2016. A review on the standardization of herbal medicines *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7, 97-106.
- Kwon, C. Y., Choi, E. J., Suh, H. W., Chung, S. Y., Kim, J. W., 2018. Oriental herbal medicine for generalized anxiety disorder: A systematic review of randomized controlled trials. *European Journal of Integrative Medicine* 20, 36-62.

- Lapin, I. P., Khaunina, R. A., Mirzaev, S. M., 1995. Vertical motor activity of mice is slowed by lower doses of psychotropic drugs than horizontal. *Biull Eksp Biol Med* 120, 385-387.
- Lee, Y. L., Wu, Y., Tsang, H. W. H., Leung, A. Y., Cheung, W. M., 2011. A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy in people with anxiety symptoms. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 17, 101-108.
- Leo, L. M., Almeida-Correa, S., Canetti, C. A., Amaral, O. B., Bozza, F. A., Pamplona, F. A., 2014. Age-dependent relevance of endogenous 5-lipoxygenase derivatives in anxiety-like behavior in mice. *PLOS ONE* 9, e85009.
- Lin, T. Y., Huang, W. J., Wu, C. C., Lu, C. W., Wang, S. J., 2014. Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats. *PLOS ONE* 9, e88644.
- Lister, R. G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180-185.
- Liu, G. X., Cai, G. Q., Cai, Y. Q., Sheng, Z. J., Jiang, J., Mei, Z., Wang, Z. G., Guo, L., Fei, J., 2007. Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology* 32, 1531-1539.
- Liu, J., Zhai, W. M., Yang, Y. X., Shi, J. L., Liu, Q. T., Liu, G. L., Fang, N., Li, J., Guo, J. Y., 2015. GABA and 5-HT systems are implicated in the anxiolytic-like effect of spinosin in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 128, 41-49.
- Long, P., Mercer, A., Begum, R., Stephens, G. J., Sihra, T. S., Jovanovic, J. N., 2009. Nerve terminal gabaa receptors activate Ca^{2+} /calmodulin-dependent signaling to inhibit voltage-gated Ca^{2+} influx and glutamate release. *J Biol Chem* 284, 8726-8737.
- Macri, S., Adriani, W., Chiarotti, F., Laviola, G., 2002. Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behaviour* 64, 541-546.
- Manayi, A., Nabavi, S. M., Daglia, M., Jafari, S., 2016. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. *Pharmacological Reports* 68, 671-679.
- Montgomery, K. C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 48, 254-260.
- Moreira, M. R., Salvadori, M. G., de Almeida, A. A., de Sousa, D. P., Jordan, J., Satyal, P., de Freitas, R. M., de Almeida, R. N., 2014. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: a monoterpene alcohol. *Neurosci Lett* 579, 119-124.
- Nagy, A., Delgado-Escueta, A. V., 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem* 43, 1114-1123.
- Ni, C. H., Hou, W. H., Kao, C. C., Chang, M. L., Yu, L. F., Wu, C. C., Chen, C., 2013. The anxiolytic effect of aromatherapy on patients awaiting ambulatory surgery: A randomized controlled trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 927419.
- Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Haque, M. E., 2016. beta-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Mol Cell Biochem* 418, 59-70.
- Oliveira Junior, R. G., Ferraz, C. A. A., Silva, J. C., de Andrade Teles, R. B., Silva, M. G., Diniz, T. C., Dos Santos, U. S., de Souza, A. V. V., Nunes, C. E. P., Salvador, M. J., Lorenzo, V. P., Quintans Junior, L. J., Almeida, J., 2018. Neuropharmacological effects of essential oil from the leaves of *Croton conduplicatus* Kunth and possible mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol* 221, 65-76.

- Pardon, M. C., Gould, G. G., Garcia, A., Phillips, L., Cook, M. C., Miller, S. A., Mason, P. A., Morilak, D. A., 2002. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. *Neuroscience* 115, 229-242.
- Pawlak, C. R., Ho, Y. J., Schwarting, R. K., 2008. Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1544-1568.
- Pollard, G. T., Howard, J. L., 1988. Effects of chlordiazepoxide, pentobarbital, buspirone, chlorpromazine, and morphine in the stretched attend posture (SAP) test. *Psychopharmacology (Berl)* 94, 433-434.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463, 3-33.
- PubChem, 2016. National Center for Biotechnology Information. Available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Raggi, L., 2008. Study of chemical composition and biological activities of essential oils from the Lauraceae family, in different seasons of the year. *Biochemistry dissertation*. São Paulo, IBT/Biodiversidade vegetal e meio ambiente, p. 343.
- Ramos, A., Correia, E. C., Izidio, G. S., Bruske, G. R., 2003. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behav Genet* 33, 657-668.
- Ravindran, L. N., Stein, M. B., 2010. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *J Clin Psychiatry* 71, 839-854.
- Robinson, L., Spruijt, B., Riedel, G., 2018. Between and within laboratory reliability of mouse behaviour recorded in home-cage and open-field. *J Neurosci Methods* 300, 10-19.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., Holmes, A., 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 30, 289-304.
- Rodgers, R. J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T. J., Brain, P. F., 1999. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 68, 47-53.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 297-303.
- Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G., 2016. Counting on natural products for drug design. *Nature Chemistry* 8, 531-541.
- Rombolà, L., Tridico, L., Scuteri, D., Sakurada, T., Sakurada, S., Mizoguchi, H., Avato, P., Corasaniti, M. T., Bagetta, G., Morrone, L. A., 2017. Bergamot essential oil attenuates anxiety-like behaviour in rats. *Molecules* 22.
- Saiyudthong, S., Pongmayteegul, S., Marsden, C. A., Phansuwan-Pujito, P., 2015. Anxiety-like behaviour and c-fos expression in rats that inhaled vetiver essential oil. *Nat Prod Res* 29, 2141-2144.
- Salat, K., Podkowa, A., Malikowska, N., Kern, F., Pabel, J., Wojcieszak, E., Kulig, K., Wanner, K. T., Strach, B., Wyska, E., 2017. Novel, highly potent and in vivo active inhibitor of GABA transporter subtype 1 with anticonvulsant, anxiolytic, antidepressant and antinociceptive properties. *Neuropharmacology* 113, 331-342.
- Santosh, D., Joseph, S., Jose, A., Satheendran, S., Ratnakar, U. P., Rao, S. P., Benegal, A., Shubha, H. V., Benegal, D., Vijayalakshmi, Udupa, A. L., Gupta, S., Ojeh, N., 2011. Anxiolytic and antiemetic effects of aromatherapy in cancer patients on anticancer chemotherapy. *Pharmacologyonline* 3, 736-744.
- Seibenhener, M. L., Wooten, M. C., 2015. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments* 6, e52434.

- Sieghart, W., 2015. Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol* 72, 53-96.
- Sigel, E., Ernst, M., 2018. The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 39, 659-671.
- Silva, D. T., 2016. Chemical characterization and biological activities of the extractives obtained from *Nectandra grandiflora* Nees and *Ocotea lancifolia* (Shott) Mez. Doctoral Thesis, Forest Engineering. Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil., p. 159.
- Sousa, N., Almeida, O. F., Wotjak, C. T., 2006. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav* 5 Suppl 2, 5-24.
- Takahashi, M., Satou, T., Ohashi, M., Hayashi, S., Sadamoto, K., Koike, K., 2011. Interspecies comparison of chemical composition and anxiolytic-like effects of lavender oils upon inhalation. *Natural Product Communications* 6, 1769-1774.
- Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., 1998. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350, 21-29.
- Tanaka, S., Young, J. W., Halberstadt, A. L., Masten, V. L., Geyer, M. A., 2012. Four factors underlying mouse behavior in an open field. *Behavioural Brain Research* 233, 10.1016/j.bbr.2012.1004.1045.
- Thompson, T., Grabowski-Boase, L., Tarantino, L. M., 2015. Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 133, 7-17.
- Tian, J., Tian, Z., Qin, S. L., Zhao, P. Y., Jiang, X., Tian, Z., 2017. Anxiolytic-like effects of α -asarone in a mouse model of chronic pain. *Metabolic Brain Disease* 32, 2119-2129.
- Walf, A. A., Frye, C. A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2, 322-328.
- Wang, Z. J., Heinbockel, T., 2018. Essential oils and their constituents targeting the GABAergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. *Molecules* 23, E1061.
- Weinberger, D. R., 2001. Anxiety at the frontier of molecular medicine. *N Engl J Med* 344, 1247-1249.
- White, H. S., D., B. S., Woodhead, J. H., Skeen, G. A., Wolf, H. H., 1997. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res* 28, 167-179.
- WHO, 2018. World Health Organization: Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return.
- Zhao, H., Medema, M. H., 2016. Standardization for natural product synthetic biology. *Natural Product Reports* 33, 920-924.

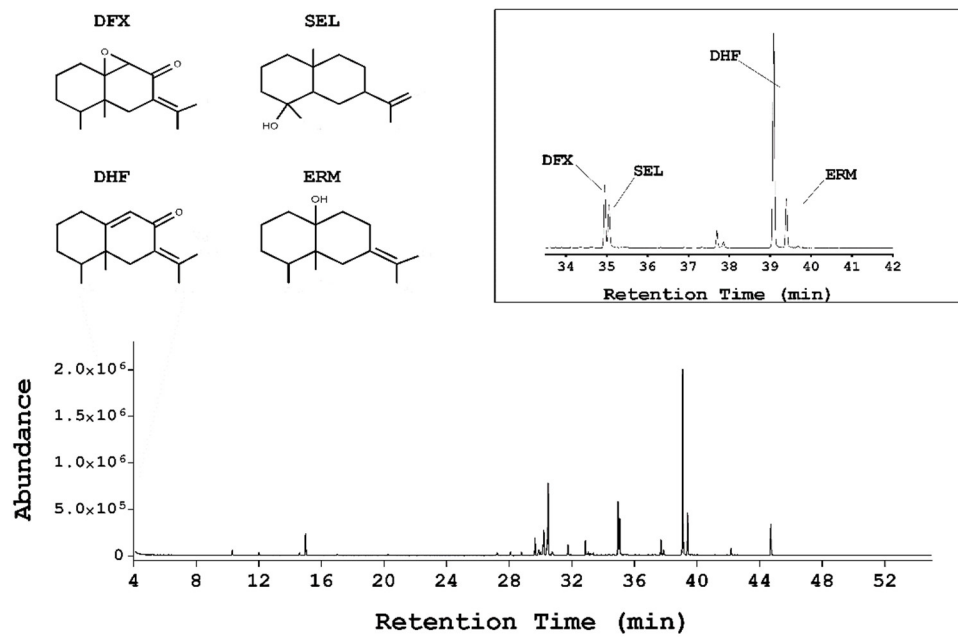


Figure 1. *N. grandiflora* EO mass chromatogram showing the (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophil-11-en-10-ol (ERM) and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) peaks (zoom). Compounds chemical structures were previously reported by Silva (2016).

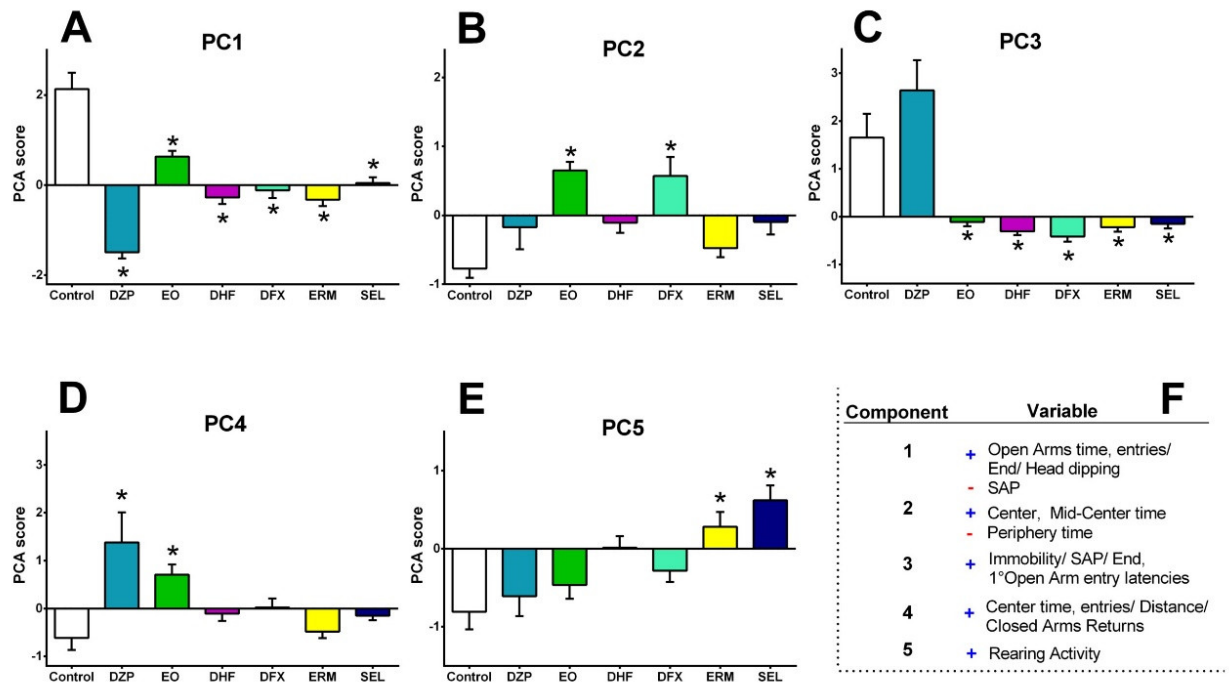


Figure 2. Principal component analysis (PCA) for behavioral measures of mice treated with *N. grandiflora* essential oil (EO), diazepam (DZP) and isolated compounds dehydrofukinone (DHF), dehydrofukinone epoxide (DFX), eremophilan-11-en-10-ol (ERM) or selin-11-en-4- α -ol (SEL) in the OF and EPM tests. The first five PCs with eigenvalues > 1 are shown. (A) PC1. (B) PC2. (C) PC3. (D) PC4. (E) PC5. (F) Description of the principal components. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.0001$ from the control group, one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test.

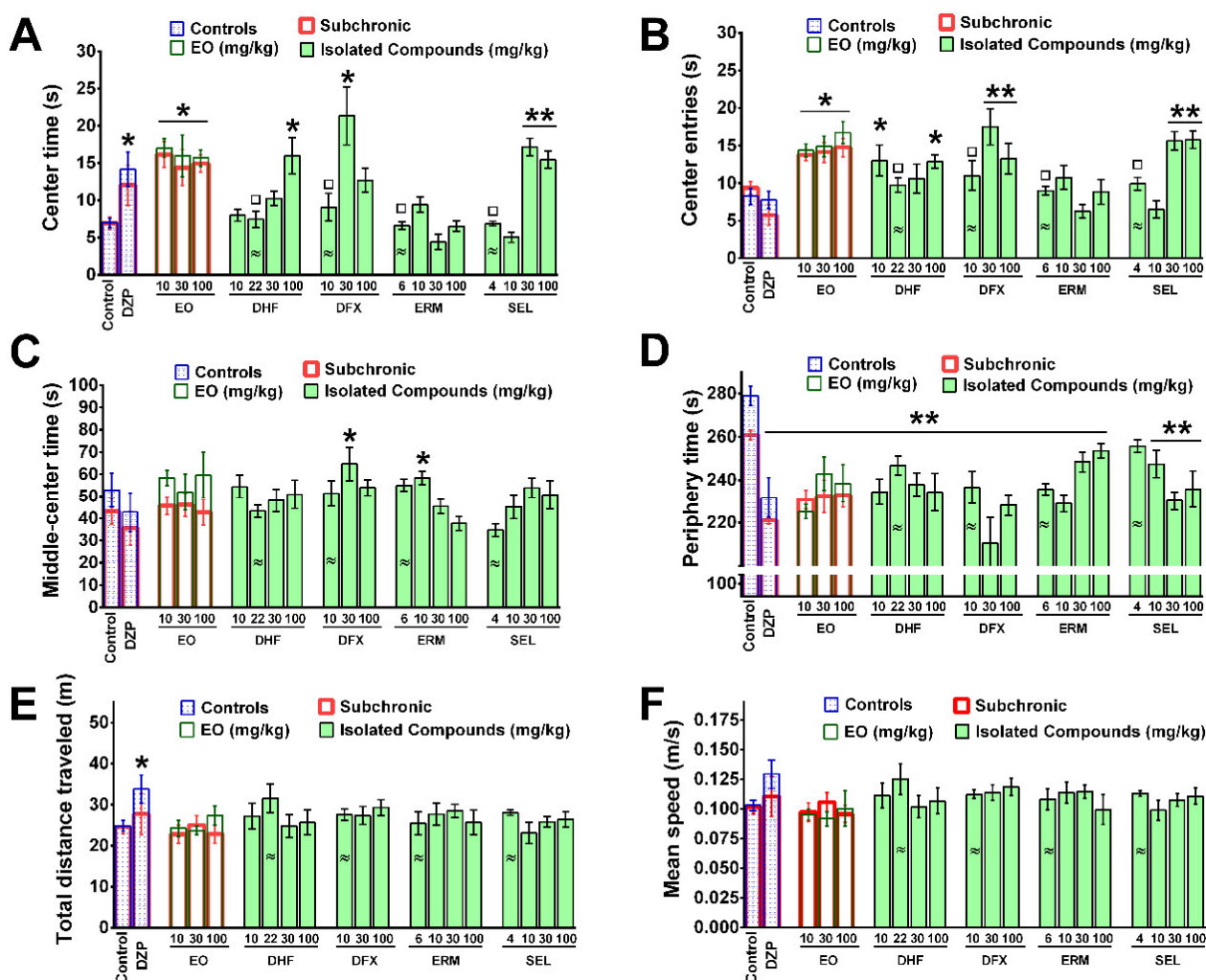


Figure 3. *N. grandiflora* EO and isolated compounds altered mice locomotor behavior in the open field (OF) paradigm. Animals were administered with vehicle, diazepam (DZP) or essential oil (EO) in both acute and subchronic treatments, while the isolated compounds dehydrofukinone (DHF), dehydrofukinone epoxide (DFX), eremophil-11-en-10-ol (ERM) and selin-11-en-4- α -ol (SEL) were administered acutely. Time spend in OF arena was divided by the sub-areas (A) center, (C), middle-center and (D) periphery. (B) total entries in the arena center, (E) total distance traveled and (F) mean speed. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ from acute treatment control group, Dunnett's test. $\square p < 0.05$ from 100 mg/kg EO, unpaired two-tailed t-test. # $p < 0.05$ from the respective subchronic treatment, Bonferroni's multiple comparisons test.

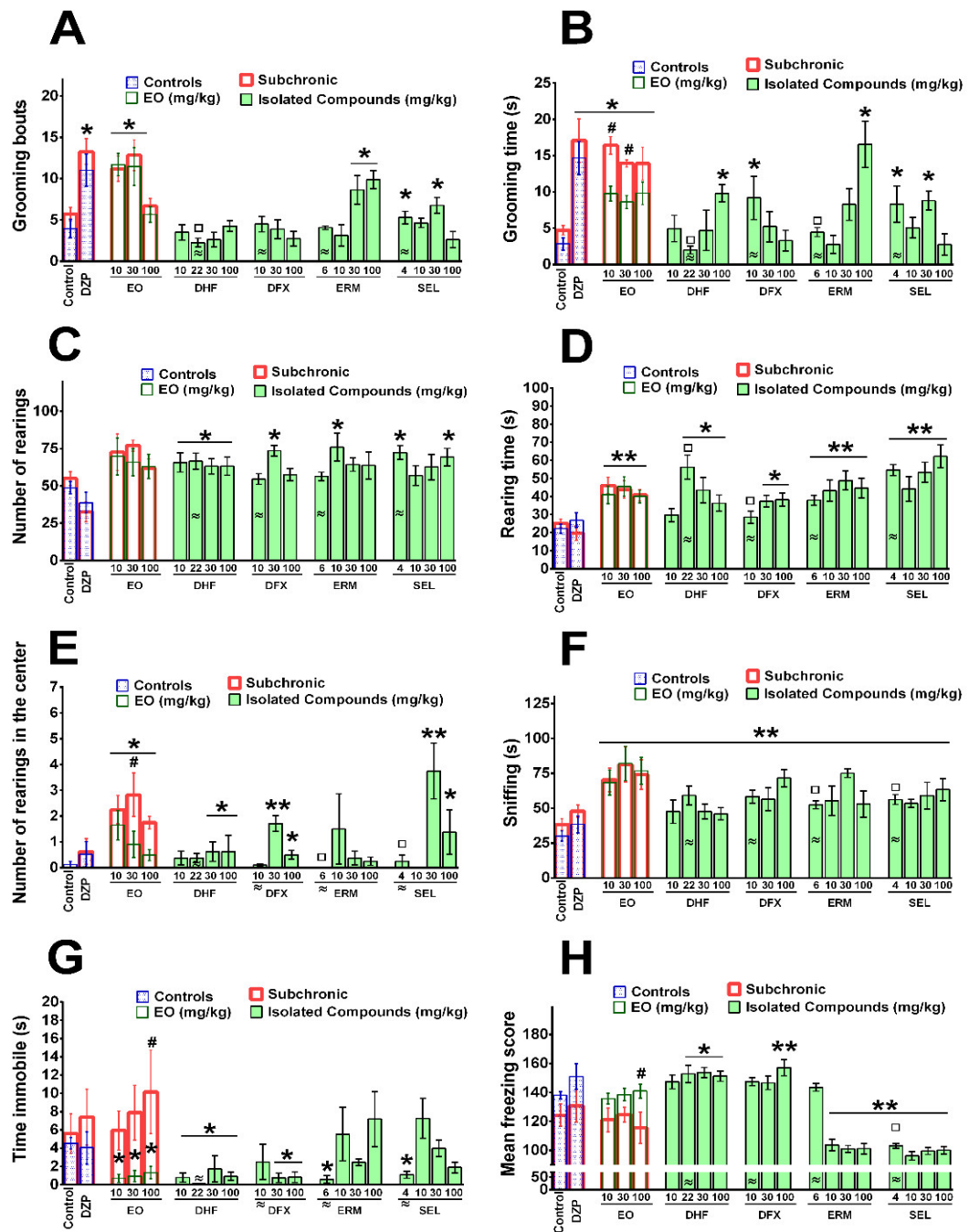


Figure 4. Ethological approach of mice behavior in the Open Field (OF) arena. Animals were administered with vehicle, diazepam (DZP) or essential oil (EO) in both acute and subchronic treatments, while the isolated compounds dehydrofukinone (DHF), dehydrofukinone epoxide (DFX), eremophil-11-en-10-ol (ERM) and selin-11-en-4- α -ol (SEL) were administered acutely. (A) Grooming bouts, (B) Time spent in grooming, (C) number of rearings, (D) time spent in rearing, (E) rearing behavior in the center of OF arena, (F) sniffing behavior, (G) time in freezing behavior and (H) mean freezing score. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ from acute treatment control group, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test (number of rearing in the center, time immobile, data are median \pm interquartil interval), Dunnet's test. $\square p < 0.05$ from 100 mg/kg EO and # $p < 0.05$ from the respective subchronic treatment, Bonferroni's multiple comparisons test.

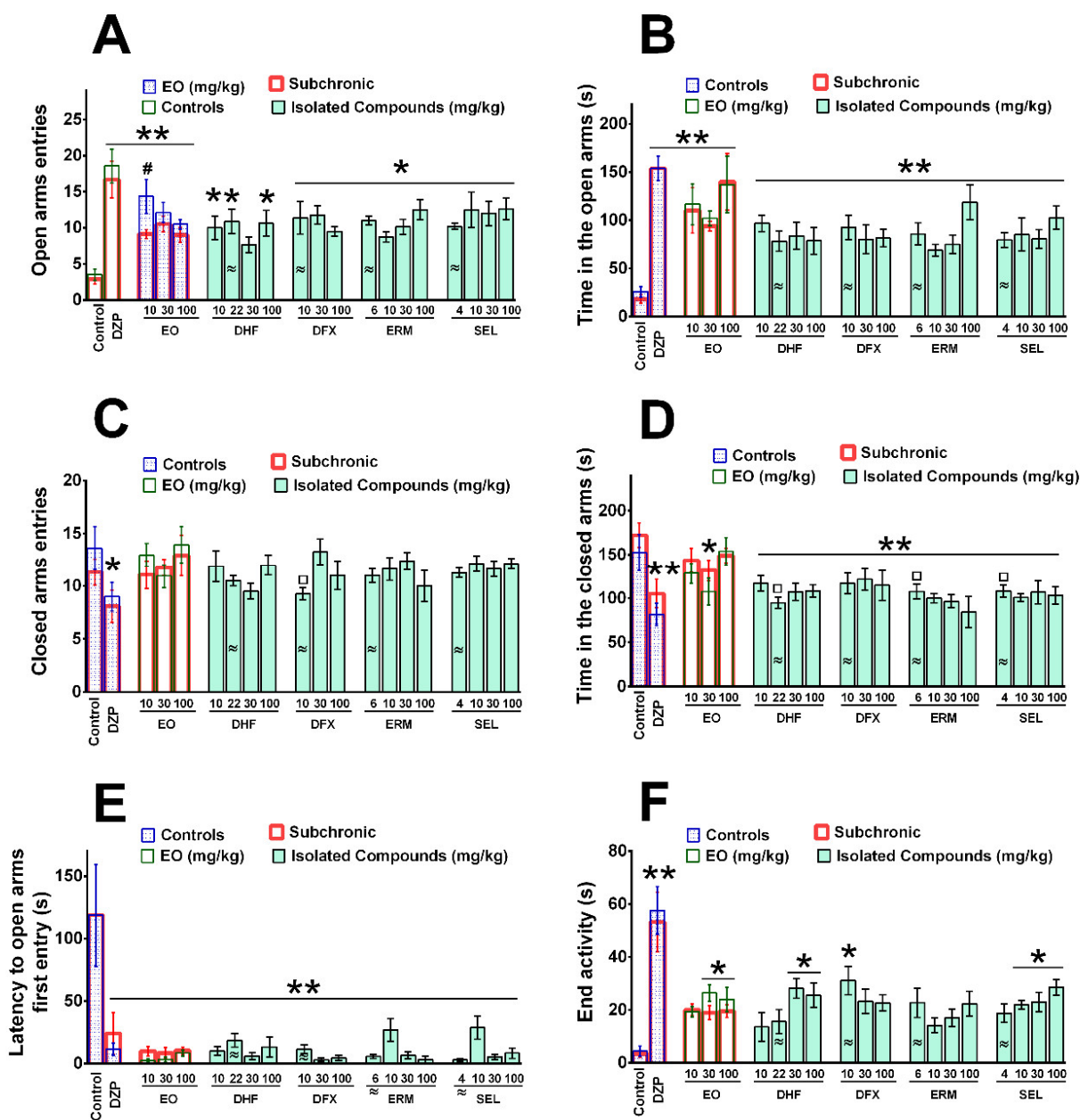


Figure 5. *N. grandiflora* EO and isolated compounds effect on anxiety-related parameters in the Elevated Plus Maze (EPM) test. Animals were administered with vehicle, diazepam (DZP) or essential oil (EO) in both acute and subchronic treatments, while the isolated compounds dehydrofukinone (DHF), dehydrofukinone epoxide (DFX), eremophil-11-en-10-ol (ERM) and selin-11-en-4- α -ol (SEL) were administered acutely. (A) open arms entries, (B) time spent in the open arms, (C) closed arms entries, (D) time spent in the closed arms, (E) latency to open arms first entry, (F) time spent in the open arms borders: end activity. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ from acute treatment control group, Dunnett's test. $\square p < 0.05$ from 100 mg/kg EO and # $p < 0.05$ from the respective subchronic treatment, Bonferroni's multiple comparisons test.

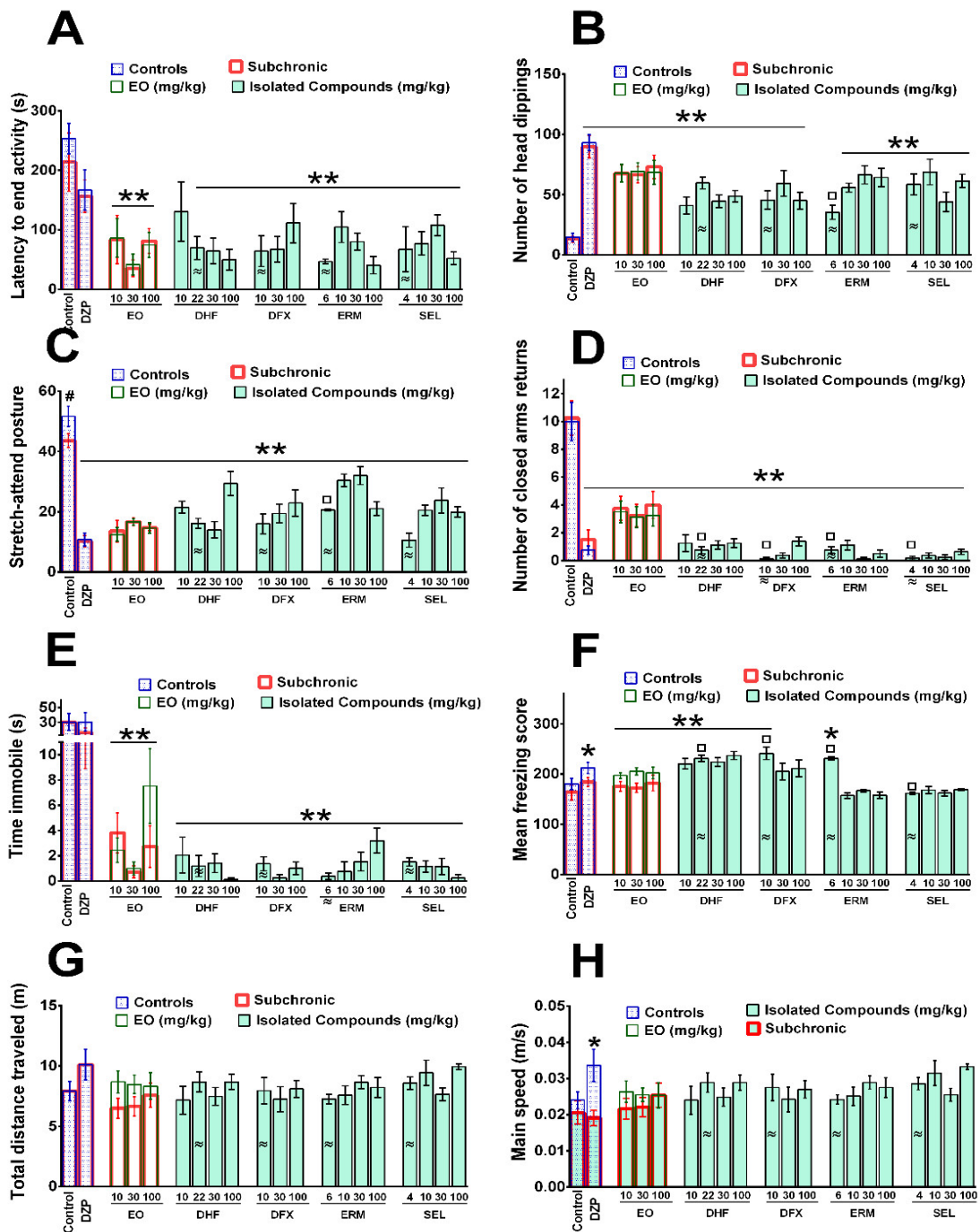


Figure 6. Ethological and locomotion parameters in the Elevated Plus Maze (EPM) test of mice administered with vehicle, diazepam (DZP) or essential oil (EO) in both acute and subchronic treatments, or only acutely with EO isolated compounds (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophil-11-en-10-ol (ERM) and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL). (A) latency to end activity, (B) number of head dipping, (C) stretch-attend posture, (D) number of closed arms returns, (E) immobility time, (F) mean freezing score, (G) total distance traveled and (H) mean speed. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ from acute treatment control group, Dunnett's test. $\square p < 0.05$ from 100 mg/kg EO, unpaired two-tailed t-test. # $p < 0.05$ from the respective subchronic treatment, Bonferroni's multiple comparisons test.

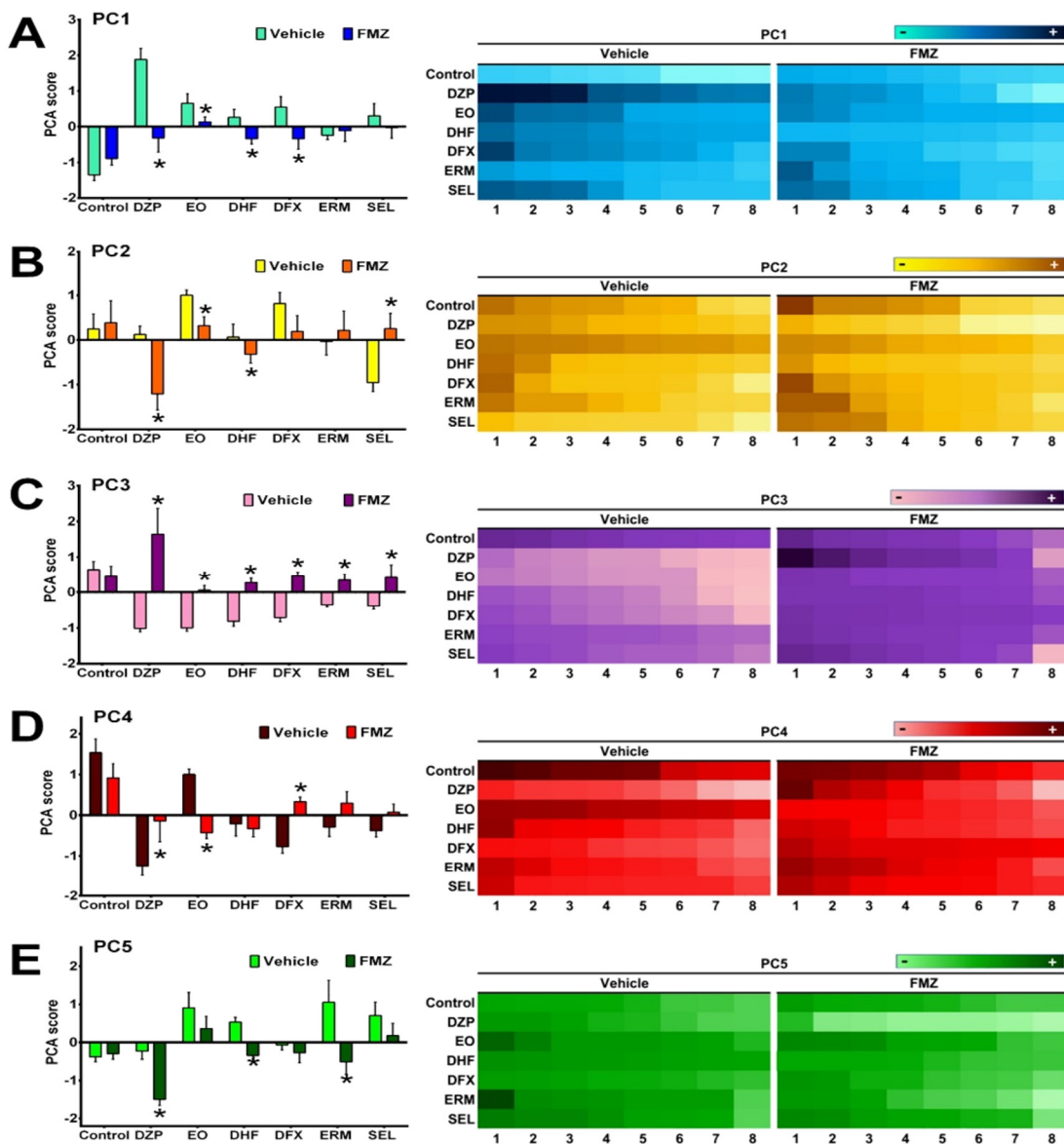


Figure 7. Flumazenil (FMZ) prevents *N. grandiflora* EO and isolated compounds effect on Open Field (OF) and Elevated Plus maze (EPM) parameters. Mice were pre-treated with vehicle or 2 mg/kg FMZ 15 min before the treatment with vehicle, diazepam (DZP), EO, (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophil-11-en-10-ol (ERM) or (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL). Principal component analysis (PCA) were performed and the four PC with eigenvalues > 1 are showed together with the representative PC values of each treatment group. The representative scores are displayed as a color map diagram (n= 8), where intense colors designate highest PC values and bright colors indicate lower PC values. (A) PC1: open arms time and entries, end activity and head dipping and SAP frequencies; (B) PC2: OF measures of center time and entries and middle center and periphery times; (C) PC3: immobility time, latencies to end activity and open arm first entry and SAP frequency in the EPM; (D) PC4: center time and entries and total distance traveled in the OF and number of closed arms returns in the EPM; (E) PC5: vertical exploration in the OF, including number of rearings, rearing time and rearing in the arena center. Data are presented as means \pm SEM. *p < 0.05 from the respective vehicle group under the same treatment, Bonferroni's multiple comparisons test.

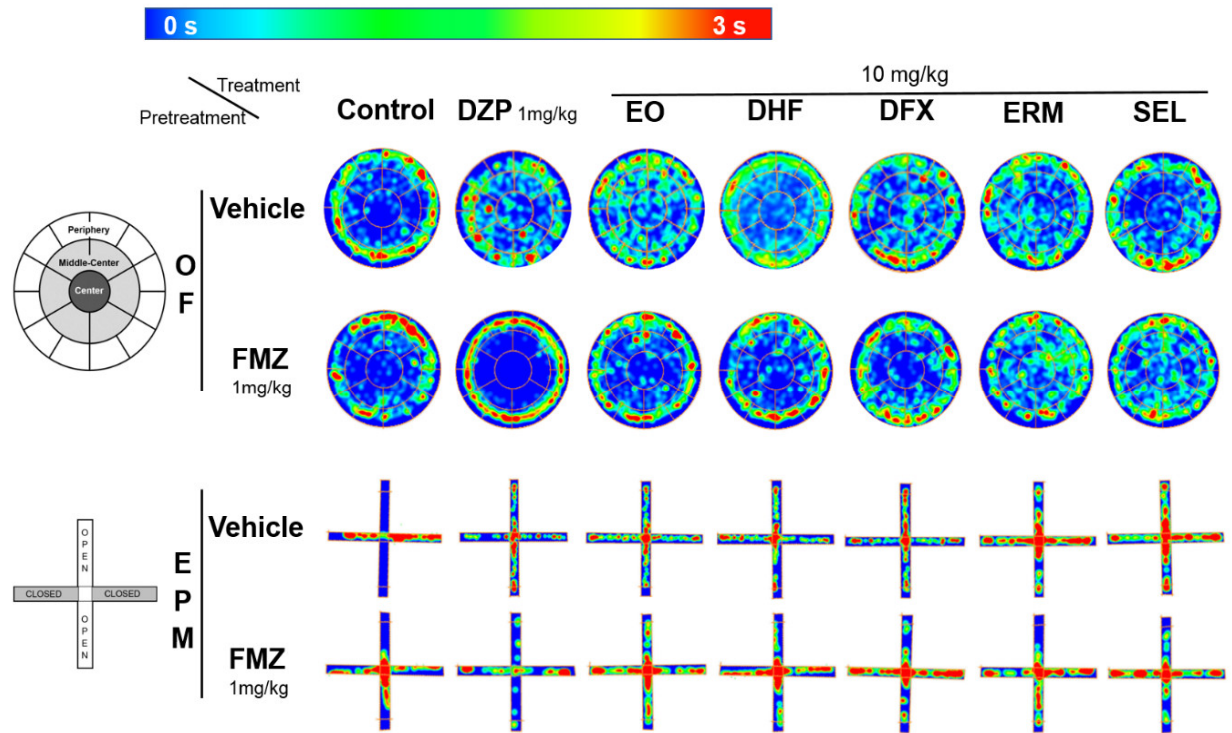


Figure 8. Heatmaps of the locomotor profile mice treated with *N. grandiflora* essential oil (EO), diazepam (DZP) and isolated compounds (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) or (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) in the Open Field (OF) arena and in the Elevated Plus Maze (EPM) apparatus. The color indicates the time spent by the animal in each area, where cold (blueish) colors represent a time near to zero seconds and hot (reddish) colors represents a time near to 3 seconds. The OF diagram indicates the division of the arena in three sub-areas: center, middle-center and periphery. The EPM diagram indicates the division of the apparatus between closed and open arms.

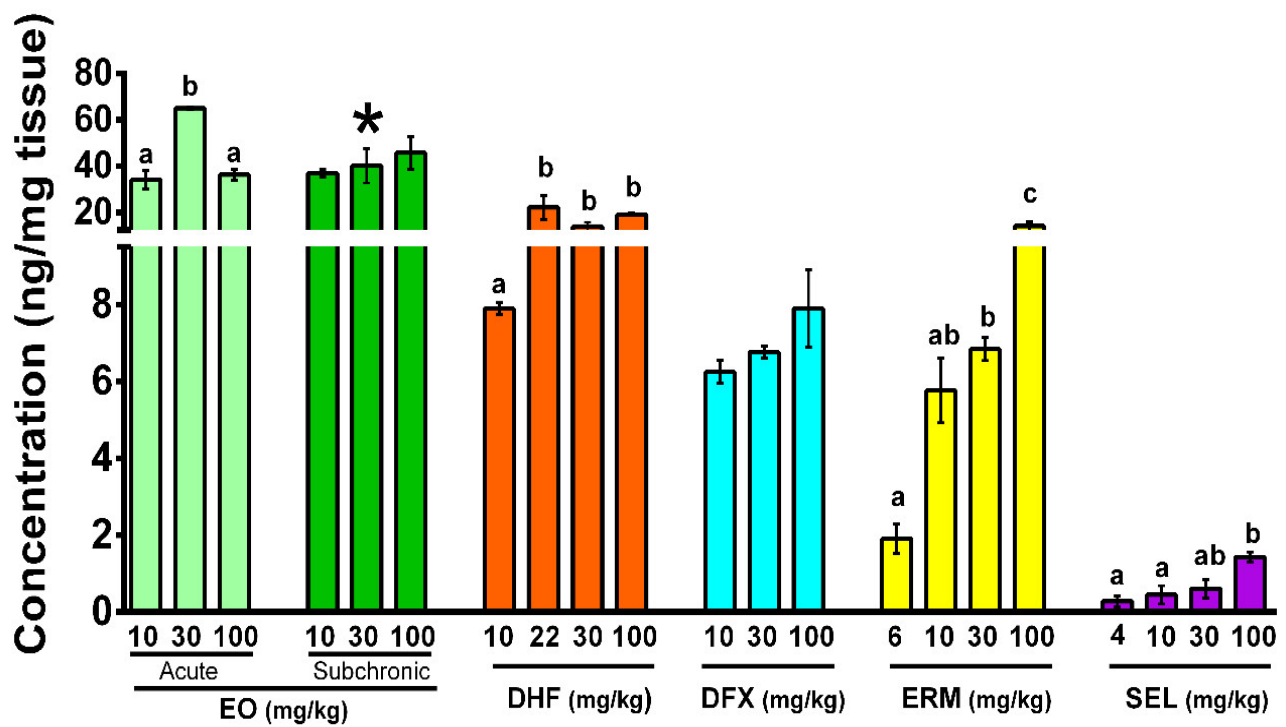


Figure 9. *N. grandiflora* EO and isolated compounds (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM), (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) concentration on cerebral cortex. Data are presented as means \pm SEM. Lowercase letters indicate statistical difference among the doses of each treatment, Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$. * $p < 0.001$ from the respective acute treatment, Bonferroni's multiple comparisons test.

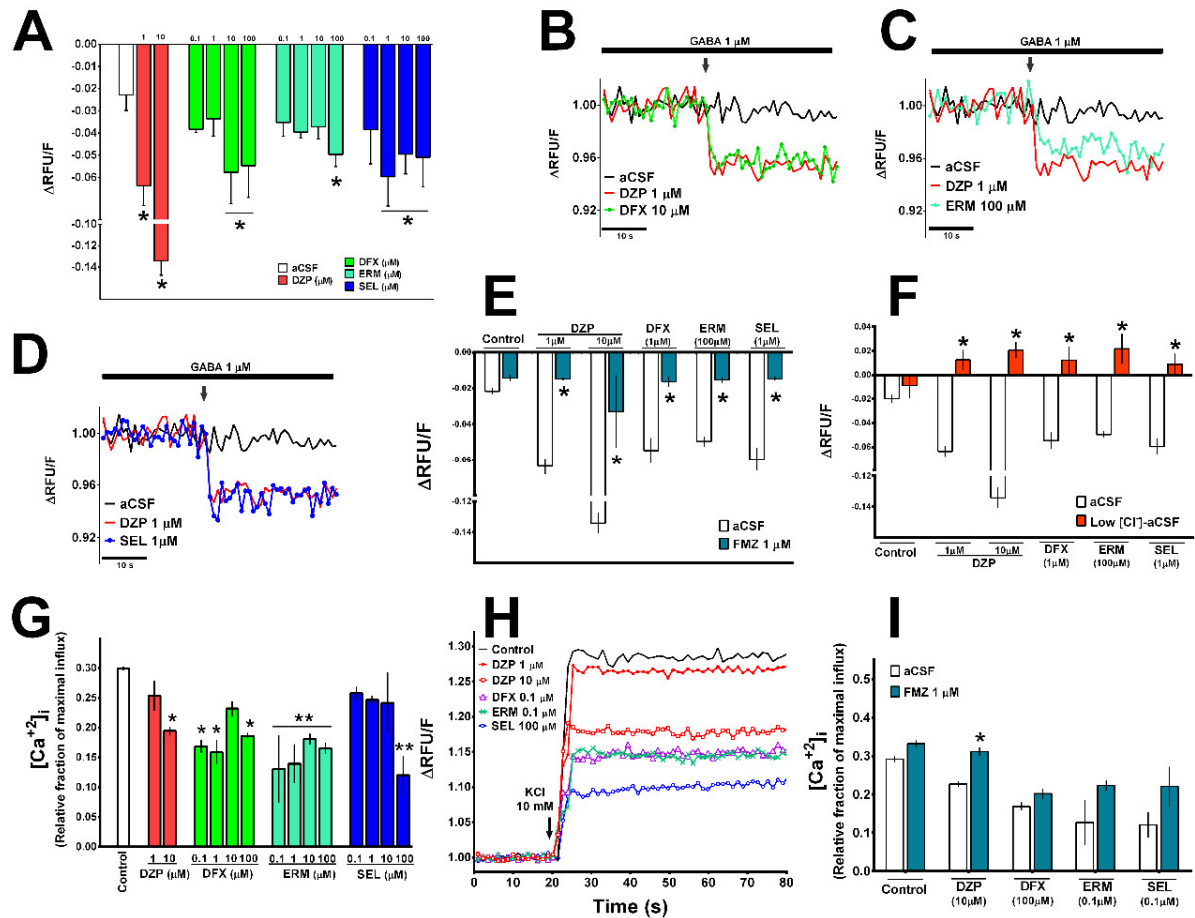


Figure 10. The sesquiterpenoids (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) and (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) altered membrane potential and calcium influx in synaptosomes through a GABA_A mechanism. (A) Alterations in the resting synaptosomal membrane potential after addition of vehicle, DZP, DFX, ERM or SEL. * $p < 0.001$ compared with aCSF-control group by Dunnett test. Data are presented as means \pm SEM ($n=4$). (B, C and D) Effect of sesquiterpenoids on membrane potential over time. Black arrow indicates drug addition to the medium and data are means ($n=4$). (E) Effect of DFX, ERM and SEL on synaptosomal membrane potential is flumazenil (FMZ)-sensitive and (F) chloride-dependent. * $p < 0.0001$ versus the respective aCSF group, Bonferroni's multiple comparison test. (G) DFX, ERM and SEL blunted KCl-induced (black arrow) calcium influx in synaptosomes and this effect is sustained over time (H). * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ versus control group, Dunnett test. (I) KCl-induced calcium influx modulation by DFX, ERM and SEL in presence of flumazenil (FMZ). * $p < 0.05$ versus the respective aCSF group, Bonferroni's multiple comparison test.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplemental material S1 - Chromatographic analysis

S1a. Nectandra grandiflora essential oil and isolated compounds identification and purity assessment

GC-MS was run in an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a 5975C mass selective detector using a non-polar DB5-MS fused silica capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness) and electron ionization mode at 70 eV. Helium was used as carrier gas in a flow rate of 1.0 ml min⁻¹, with injector, detector and interface temperature set at 250 °C and auxiliary temperature set at 280 °C. Oven temperature was kept at 40 °C for 4 min and raised to 320 °C at a rate of 4 °C min⁻¹. Sample solutions of 2 μL (2:1000 in hexane, v/v) were injected in split inlet mode (1:50 ratio). Kovats retention index was calculated using a homologous series of C7-C40 n-alkanes injected under the same conditions of the samples. *N. grandiflora* EO, DHF, DFX, ERM and SEL were identified by mass spectra and Kovats retention index comparison with data from the National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library (Nist, 2008), and with Adams, 2009. Compounds purity was estimated by under peak area integration obtained from TIC-chromatogram.

S1b. Nectandra grandiflora essential oil and isolated compounds measurement in cortical tissue

Detection and quantification of the compounds in the mice cortex was performed using a GC-FID method. The chromatographic method was run in an Agilent 7890A gas chromatograph using a non-polar DB5 fused silica capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness). Helium was used as carrier gas in a flow rate of 1.0 ml min⁻¹, with injector, detector and interface temperature set at 250 °C

and auxiliary temperature set at 280 °C. Oven temperature was kept at 40 °C for 2 min and raised to 210°C at a rate of 5°C min⁻¹ and total run time was set at 38 min. Sample solutions obtained by cortex extraction were injected (4 µL) in the column in splitless inlet mode by an automatic sampler. Standard compounds (DHF, RT: 31.63 min; DFX, RT: 28.83 min; ERM, RT: 32.56 min and SEL, RT: 28.80 min) were injected using this method at concentrations ranged from 9.454 ng/ml to 0.472 mg/ml.

References

Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Illinois, 2009.

National Institute of Standards and Technology: NIST 08. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH), Gaithersburg, USA, 2008.

Supplemental material S2

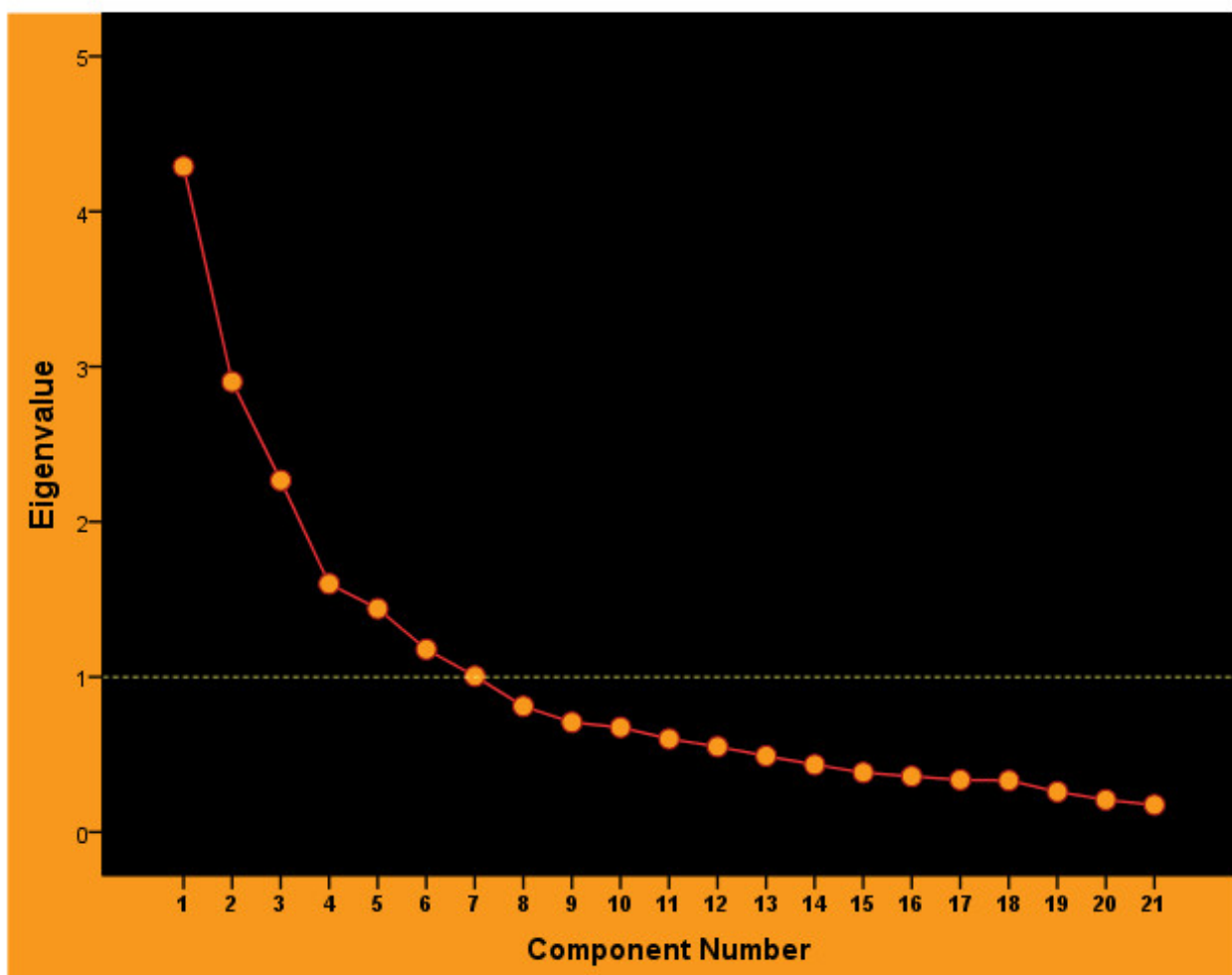
Table S2a. Multifactorial analysis using the method of Principal Components extraction for behavior measures of mice treated with *Nectandra grandiflora* essential oil and isolated compounds on the Open Field and Elevated Plus Maze tests. Eigenvalues higher than 1 were considered significant.

Total Variance Explained						
Component	Initial Eigenvalues			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% Variance	Cumulative %	Total	% Variance	Cumulative %
1	4.289	20.423	20.423	3.270	15.573	15.573
2	2.901	13.815	34.238	2.688	12.802	28.375
3	2.267	10.795	45.033	2.202	10.486	38.862
4	1.599	7.616	52.650	1.908	9.088	47.949
5	1.440	6.857	59.507	1.895	9.023	56.972
6	1.178	5.609	65.116	1.472	7.007	63.979
7	1.006	4.788	69.904	1.244	5.925	69.904
8	.811	3.860	73.764			
9	.708	3.369	77.133			
10	.674	3.210	80.343			
11	.601	2.862	83.206			
12	.551	2.622	85.828			
13	.490	2.333	88.160			
14	.434	2.068	90.228			
15	.383	1.825	92.053			
16	.359	1.708	93.762			
17	.336	1.600	95.362			
18	.333	1.584	96.946			
19	.259	1.233	98.180			
20	.208	.989	99.168			
21	.175	.832	100.000			

Table S2b. Rotated component matrix shows the correlation factor for each significant component extracted using the method of Principal Components Analysis for behavior measures of mice treated with *Nectandra grandiflora* essential oil and isolated compounds on the Open Field and Elevated Plus Maze tests. Factor loadings greater than 0.5 were considered significant. Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization.

Rotated Component Matrix							
Variable	Component						
	1	2	3	4	5	6	7
Distance traveled				.526			
Grooming time							.851
N° rearings					.806		
Sniffing time						.799	
Center time OF		.811					
Rearing time					.782		
Center entries OF		.735					
Periphery time OF		-.804					
Middle-center time OF		.706					
Immobile time EPM			.800				
N° rearings center OF					.548		
Head dipping	.714						
Open arms entries	.790						
Latency to 1° OA entry			.633				
Open arms time	.835						
SAP	-.581		.521				
Closed arms entries				.621			
Closed arms time				.717			
End activity	.777						
Latency to 1°end act.			.633				
N° CA returns				.543			

Figure S2c. Scree plot shows the eigenvalues from all extracted components for behavior measures of mice treated with *Nectandra grandiflora* essential oil and isolated compounds on the Open Field and Elevated Plus Maze tests. PC1: open arms time and entries, end activity and head dipping and SAP frequencies; PC2: OF measures of center time and entries and middle center and periphery times; PC3: immobility time, latencies to end activity and open arm first entry and SAP frequency in the EPM; PC4: center time and entries and total distance traveled in the OF and number of closed arms returns in the EPM; PC5: vertical exploration in the OF, including number of rearings, rearing time and rearing in the arena center. The dotted line shows the eigenvalue threshold for component significance.



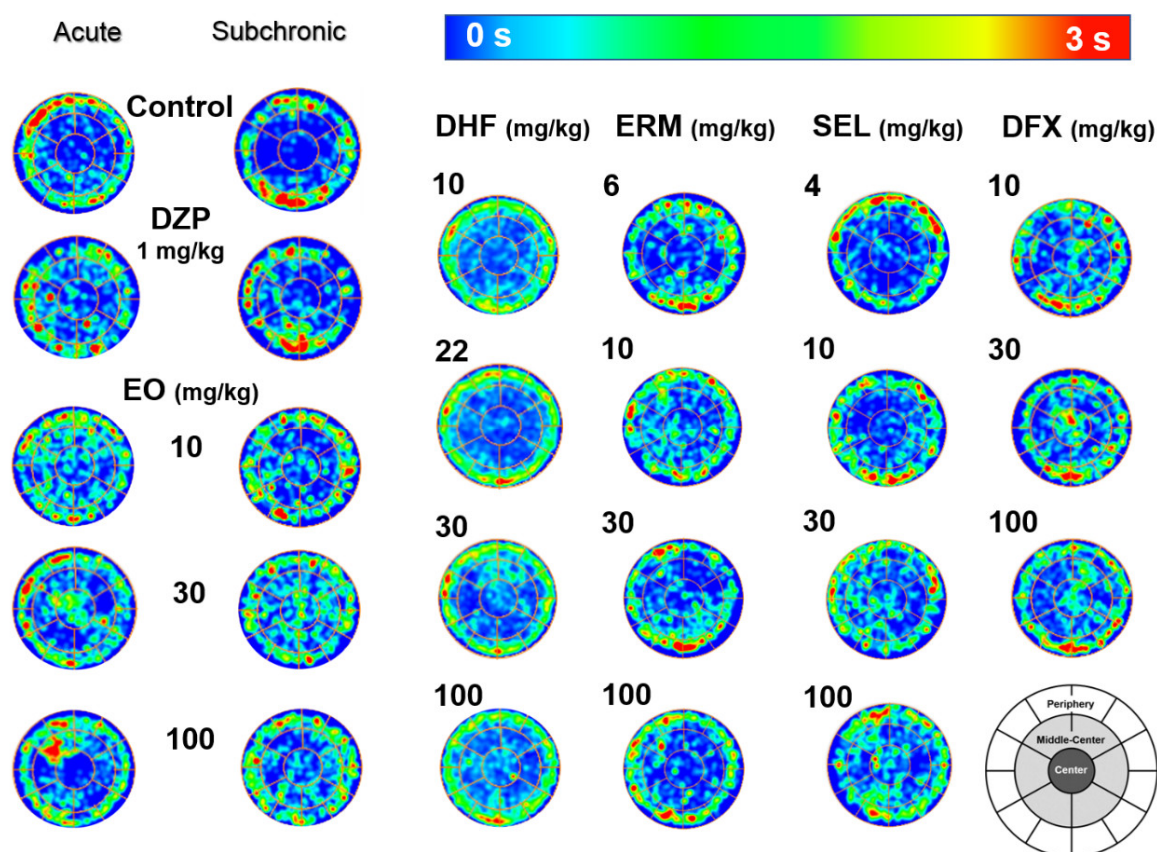


Figure S3. Heatmaps of the locomotory profile of mice treated with *Nectandra grandiflora* essential oil (EO), diazepam (DZP) and isolated compounds (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) or (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) in the Open Field (OF) arena. The color bar indicates the time spend by the animal in each area, where cold (blueish) colors represent a time near to zero seconds and hot (reddish) colors represents a time near to 3 seconds. The OF diagram (bottom right) indicates the division of the arena in three sub-areas: center, middle-center and periphery.

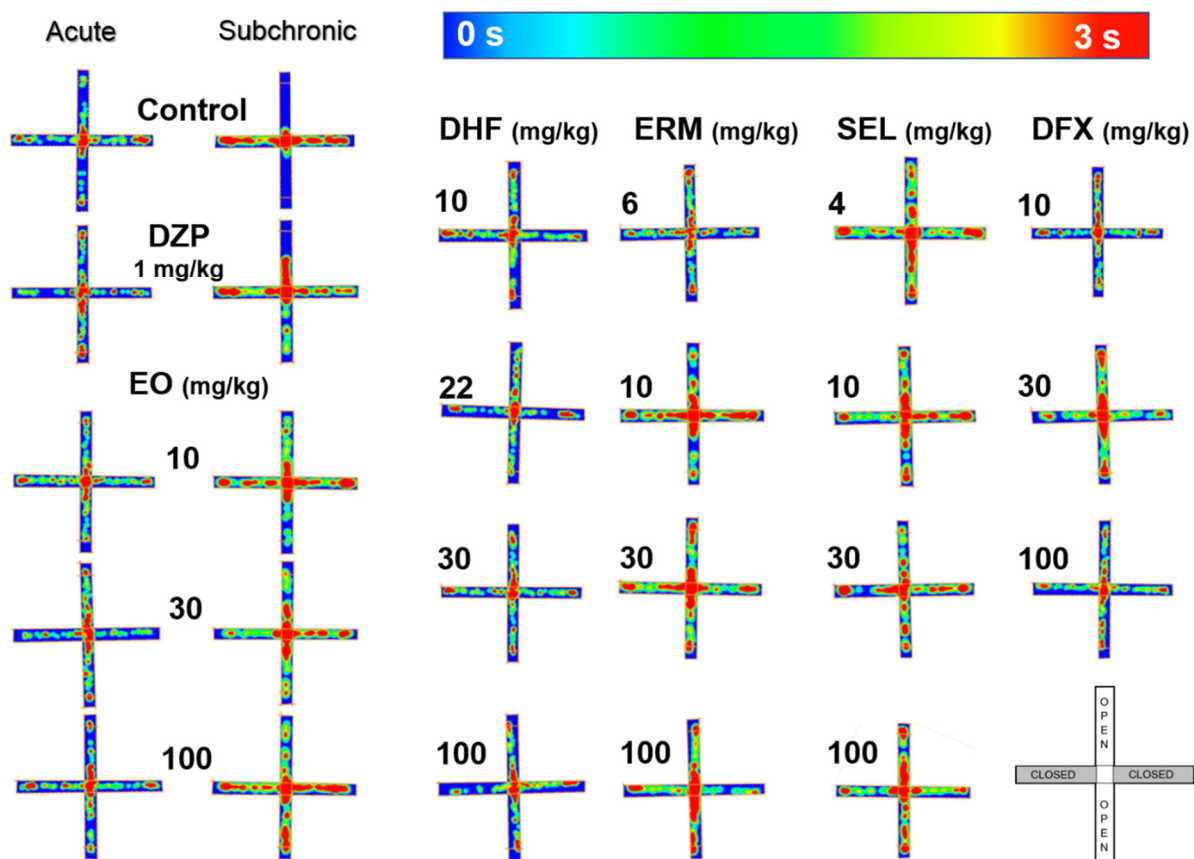


Figure S4. Heatmaps of the locomotory profile of mice treated with *Nectandra grandiflora* essential oil (EO), diazepam (DZP) and isolated compounds (+)-dehydrofukinone (DHF), (+)-dehydrofukinone epoxide (DFX), (+)-eremophilan-11-en-10-ol (ERM) or (-)-selin-11-en-4- α -ol (SEL) in the Elevated Plus Maze (EPM) apparatus. The color bar indicates the time spend by the animal in each area, where cold (blueish) colors represent a time near to zero seconds and hot (reddish) colors represents a time near to 3 seconds. The EPM diagram (bottom right) indicates the division of the apparatus between closed and open arms.

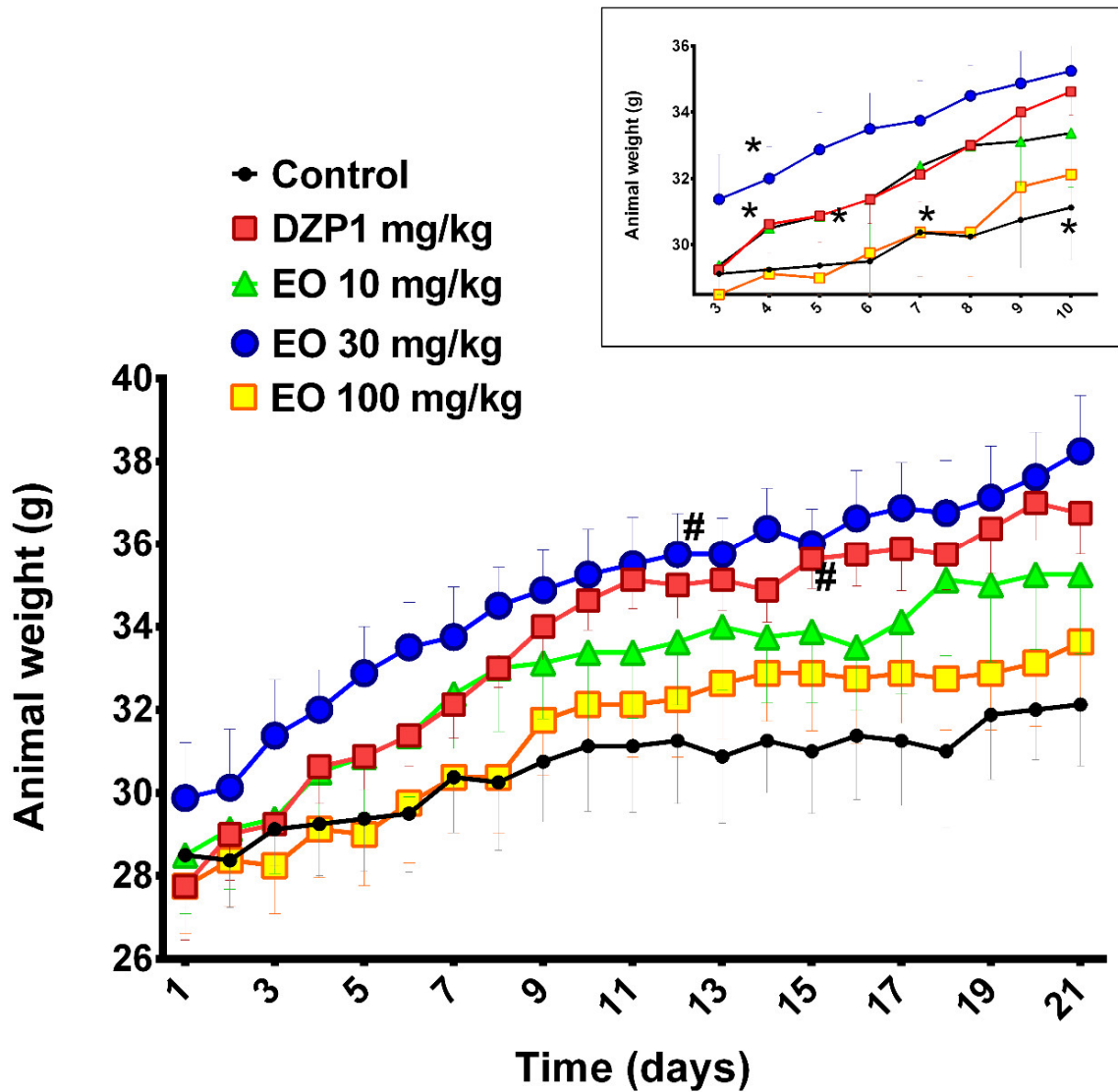


Figure S5. Subchronic effect of the *N. grandiflora* essential oil (EO) treatment on mice body weight. Animals were administered orally with EO or diazepam (DZP) during 21 days. # $p < 0.05$ from control group at the same day and * $p < 0.05$ from the day 1 within the same treatment, $F_{(80, 700)} = 1.882$; two-way ANOVA with repeated measures, Dunnett's test.

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliada a propriedade depressora do SNC dos sesquiterpenoides (+)- deidrofuquinona, (-)-selin-11-en-4- α -ol, (+)-eremofil-11-en-10-ol e (+)-epóxido de deidrofuquinona e sua interação com os receptores inibitórios GABA_A *in vitro* e em diferentes modelos de avaliação comportamental *in vivo*. Entre os anseios da pesquisa científica que se ocupam da descoberta de novas moléculas, com frequência o alvo principal dos estudos é buscar novas alternativas terapêuticas para as diferentes patologias que acometem humanos e animais. Os resultados do presente estudo, em consonância com este propósito, permitem afirmar que os efeitos encontrados até o momento para o OE de *N. grandiflora* e para os compostos DHF, DFX, ERM e SEL, permitem sugerir que estes tratamentos têm potencial para a aplicação efetiva como sedativos em piscicultura e como pretensos agentes ansiolíticos. Adicionalmente, estes compostos atendem às premissas propostas por Kuentz e Arnold (2009), as quais sugerem que um fármaco ideal deveria ter um valor de Log P < 5 e um peso molecular < 500 unidades. Desta forma, este trabalho propõe estratégias terapêuticas alternativas a partir de moléculas de origem natural. De um outro ponto de vista, merece destaque outro aspecto da pesquisa científica que incitou a investigação das atividades biológicas de compostos da espécie *N. grandiflora*: a caracterização farmacológica de compostos provenientes da flora nativa do país.

Neste cenário, se faz interessante mencionar as etapas do desenvolvimento desta tese, a qual foi motivada pelos resultados obtidos com o composto DHF em jundiás (GARLET et al., 2016). Assim como observado para este composto, os demais sesquiterpenoides avaliados neste trabalho deprimem o SNC de jundiás e foram candidatos promissores à continuidade dos testes, em roedores. Desta forma, o processo de 'screening' de substâncias sedativas utilizando o jundiá como modelo experimental se fez útil para prever potenciais agentes depressores do SNC em mamíferos. Inicialmente, devido ao composto DHF induzir intensa depressão do SNC (anestesia) em peixes, conjecturou-se a hipótese de que esta substância seria um agente anticonvulsivante em potencial. Os resultados do primeiro artigo desta tese e do manuscrito 1 sinalizaram para um possível efeito ansiolítico do OE e dos compostos isolados. No manuscrito 1 foi demonstrado que peixes sedados com o OE superexpressaram uma subunidade do receptor GABA_A necessária para o efeito ansiolítico produzido por agonistas deste receptor (RUDOLPH; MÖHLER, 2006). Consequentemente, surgiu a motivação de uma investigação mais aprofundada em torno dos efeitos tanto do composto DHF, como dos sesquiterpenoides SEL, ERM e DFX e do próprio OE de *N. grandiflora* em modelos específicos de avaliação de atividade ansiolítica. Desta forma, foram empregados modelos experimentais que utilizam

camundongos, cuja padronização e eficácia de predição de efeito clínico já estão bem descritos na literatura (LISTER, 1987; PRUT; BELZUNG, 2003; RODGERS et al., 1997; RODGERS; JOHNSON, 1995; STANFORD, 2007; TANAKA et al., 2012; WALF; FRYE, 2007). Para a avaliação do efeito ansiolítico optou-se por utilizar-se camundongos machos. Esta escolha foi feita baseada no fato de que, diferentemente do modelo de convulsões induzidas pelo PTZ (BRAULT et al., 2011), o sexo e a fase estral de camundongos fêmeas são fatores determinantes para a variabilidade dos modelos de atividade ansiolítica utilizados nesta tese (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000).

Os resultados aqui apresentados estão em consonância com a literatura, que frequentemente reporta compostos de esqueleto terpênico, encontrados nos OEs de plantas, como detentores de atividade depressora do SNC (ADAMS et al., 2011; ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011). Um dos principais mecanismos farmacológicos pelo qual estes compostos terpenoides exercem atividades sedativa, hipnótica, ansiolítica ou anticonvulsivante é a modulação alostérica positiva da atividade do receptor GABA_A. Entretanto, dentre os terpenoides há distinções quanto à afinidade pelos respectivos sítios de ligação ao receptor. Isso se deve às diferenças de estrutura química, como a presença de grupos funcionais distintos, maior ou menor rigidez e /ou planaridade da molécula, bem como à composição heterogênea de subunidades do receptor GABA_A (MANAYI et al., 2016). Uma característica estrutural que favorece a interação com receptor GABA_A é a presença de uma estrutura bicíclica na molécula (KESSLER et al., 2014), pressuposto contemplado na estrutura química dos sesquiterpenoides alvos deste estudo (DHF: Figura 2; SEL: Figura 3; ERM: Figura 4 e DFX: Figura 5). Já os diferentes grupos funcionais (aldeído, álcool, cetona) presentes na molécula irão definir o grau de afinidade pelas diferentes subunidades do receptor GABA_A (KESSLER et al., 2014). Estudos de elucidação estrutural sugerem uma configuração diferente entre os anéis de SEL comparado aos outros três constituintes (dados não publicados). Neste sentido, pode se atribuir os diferentes perfis de ação farmacológica às diferenças estruturais das moléculas em questão.

Os resultados obtidos nesta tese apontam que o principal mecanismo de ação das atividades: anticonvulsivante do composto DHF, sedativas (em peixes) dos compostos SEL, ERM e DFX e ansiolíticas do OE de *N. grandiflora* e dos quatro sesquiterpenoides, é a intensificação das correntes GABAérgicas através da interação destas moléculas com o receptor GABA_A. Entretanto, algumas ressalvas devem ser feitas quanto à possível interação destes compostos com outros sítios e/ou receptores. Enquanto que a ação anticonvulsivante e tipo-ansiolítica de DHF foi prevenida pelo tratamento com FMZ (artigo 1), o mesmo não ocorreu:

com o efeito sedativo (em peixes) do composto SEL (manuscrito 1); em alguns aspectos da atividade tipo-ansiolítica de SEL, ERM e DFX em camundongos, bem como com a inibição do influxo de cálcio induzido por estes três compostos em sinaptossomas; e, por fim, no aumento da atividade exploratória vertical induzida pelo OE em camundongos (manuscrito 2). Estes dados levantam algumas hipóteses, entre elas: 1) o composto SEL promove sedação por outro mecanismo que não a interação com o receptor GABA_A; 2) os compostos SEL, ERM e DFX também interagem com outros receptores para promover o efeito tipo ansiolítico (5-HT_{1A}?); (3) os compostos SEL, ERM e DFX diminuem o influxo de cálcio induzido por despolarização por interação direta com canais de cálcio voltagem-dependente, o que já foi descrito para compostos terpenoides (ASAKURA et al., 2000; PINHO-DA-SILVA et al., 2012; SCHUWALD et al., 2013; YOU et al., 2013); (4) o efeito do OE sobre a atividade exploratória se deve à presença do composto SEL, cujo efeito sobre estes parâmetros foi detectado desde a menor dose (4 mg/kg) e não prevenido pelo FMZ; (5) os compostos SEL, ERM e DFX interagem com o receptor GABA_A, porém em um sítio insensível ao FMZ. A literatura mostra que álcoois terpênicos podem modular positivamente o receptor GABA_A em diferentes sítios. Por exemplo, os compostos verbenol, isopulegol e mirtenol interagem com o sítio do etanol e dos anestésicos voláteis (KESSLER et al., 2014). Outro aspecto a ser destacado é a existência de dois sítios de ligação para os benzodiazepínicos, referidos como: um sítio de alta-afinidade e o outro de baixa afinidade (SPURNY et al., 2012). O sítio de ligação de baixa afinidade é insensível a presença de FMZ, independentemente do tipo de subunidade que o receptor é formado (WALTERS et al., 2000). Ainda, é relatado que moléculas que modulam receptores GABA_A (faixa de concentração em μM) que não contém a subunidade γ , não tem seu efeito alterado pelo FMZ, como demonstrado para ação do composto natural, 6-metilflavona (HALL et al., 2004). Em consonância com estas proposições, nossos resultados confirmam que o composto SEL modula a subunidade δ do receptor GABA_A em peixes (manuscrito 1). Este dado experimental sugere que a atividades do composto SEL sobre o SNC são em parte mediadas pelo receptor GABA_A e não são totalmente prevenidas pelo FMZ, devido à ação deste composto em receptores extrassinápticos. Estes receptores, que não contém a subunidade γ , participam da ação de diversos compostos hipnóticos, sedativos, anestésicos e anticonvulsivantes (FARRANT; NUSSER, 2005; SAARI et al., 2011; SCHIPPER et al., 2015). Adicionalmente, foi detectado que o OE aumenta a expressão da subunidade $\alpha 2$ do receptor GABA_A em cérebro de jundiá (manuscrito 1). A modulação seletiva desta subunidade provoca efeito ansiolítico sem causar sedação (RUDOLPH; MÖHLER, 2006), o que foi visto com o tratamento do OE em camundongos nos experimentos em modelo de ansiedade (manuscrito 2). Esses dados ratificam

o alto valor preditivo dos testes em modelo utilizando a espécie de peixe *R. quelen*, bem como confirmam o potencial farmacológico do OE de *N. grandiflora* como um agente ansiolítico.

Como mencionado acima, existem dois sítios de ligação para os benzodiazepínicos no receptor GABA_A que diferem entre si quanto a afinidade por essas moléculas. Esse fato faz com que os benzodiazepínicos produzam um efeito bifásico e dependente da concentração na potencialização dos efeitos do neurotransmissor GABA. Isso foi demonstrado *in vitro* para o flurazepam, onde o pico de potencialização se encontrou na faixa de nanomolar e acima de 10 μ M este efeito se perdeu (WALTERS et al., 2000). Este fenômeno poderia explicar o padrão de efeito bifásico nas ações do composto DHF (*in vitro* e *in vivo*) (artigo 1) e dos compostos SEL, ERM e DFX em certos parâmetros de atividade comportamental *in vivo* (manuscrito 1).

Além da interação em diferentes sítios do receptor GABA_A, outro fator poderia estar culminando em um efeito não linear do composto DHF: seu caráter hidrofóbico. Mesmo que de fato uma substância tenha um receptor alvo, moléculas lipofílicas produzem resposta não linear em sistemas biológicos devido sua interação com a membrana plasmática, como sugerido por TURINA et al. (2006). Todos os sesquiterpenoides avaliados neste estudo possuem alta lipofilicidade, o que vai ao encontro da literatura, que reporta um valor alto de LogP para os compostos terpênicos em geral. Além da interação com a membrana plasmática, este caráter hidrofóbico pode implicar em acumulação em tecidos lipofílicos (TURINA et al., 2006). Peixes expostos ao composto DFX (25 mg/L) por 24h tiveram uma progressão no grau de depressão do SNC de sedação leve (estágios S2 a S3a) de para estágio pré-anestésico (estágio S3b) e anestésico (estágio S4). Na mesma concentração, os compostos SEL e ERM mantiveram níveis menores de sedação (estágio S3a) (manuscrito 1) e este efeito foi desprovido de sinais aparentes de toxicidade, enquanto que o composto DFX levou à morte de um animal (manuscrito 1). De fato, quando em contato prolongado com um agente anestésico, o jundiá pode entrar para o próximo estágio de depressão do SNC, que seria colapso da atividade nervosa seguido de morte (GOMES et al., 2011). Desta forma seria interessante, do ponto de vista farmacocinético, avaliar a acumulação tecidual destes compostos em estudos futuros. O composto DFX, apesar de seu grande potencial sedativo, anestésico e ansiolítico deve ser melhor avaliado quanto a sua toxicidade, principalmente em modelos de exposição crônica. Portanto, seria cientificamente convidativo o investimento em mais estudos para avaliar a segurança destes compostos a nível comportamental e molecular.

Nesta tese, foi realizada a quantificação dos quatro sesquiterpenoides no encéfalo de camundongos, de forma que foi detectada a presença destas moléculas na faixa de ng/mg (ppm) de tecido (manuscrito 2). Os compostos ERM e SEL foram detectados de forma proporcional

ao aumento da dose por via oral, enquanto que os compostos DHF e DFX não apresentaram uma relação dose-resposta consistente quanto a sua presença no tecido cerebral. Isso corrobora com a hipótese de acumulação destas moléculas em outros tecidos lipofílicos. Ainda, o OE apresentou um platô de concentração tecidual e isso pode ser explicado pelo fato de que sua quantificação foi calculada em equivalentes de DHF. Este platô na relação dose-resposta se repetiu no efeito comportamental de camundongos que receberam OE tanto em regime agudo como subcrônico no teste de avaliação de atividade ansiolítica. Todos os quatro compostos avaliados apresentaram efeito tipo-ansiolítico em camundongos. Entretanto, nas doses de OE menores que 100 mg/kg, as proporções dos compostos DFX, ERM e SEL no OE são de 3 a 10 vezes menores que a menor dose testada de cada composto. Portanto, sugere-se que o efeito tipo-ansiolítico encontrado para as doses de 10 e 30 mg/kg de OE deve-se majoritariamente à presença de DHF. Contraditoriamente, quando se aumenta a dose de OE para 100 mg/kg e consequentemente os compostos DFX, ERM e SEL alcançam teores comprovadamente com efeito ansiolítico (10, 6 e 4%, respectivamente), não houve aumento no tamanho de efeito induzido. Algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar o fato de não ter sido observado um efeito aditivo/ potencializador entre os compostos do OE nesta dose: (1) uma competição entre os quatro compostos pelo mesmo sítio de ação; (2) efeito teto do próprio teste comportamental; (3) possível efeito antagônico de outros constituintes presentes no OE, uma vez que constituintes ainda não identificados somam cerca de 20% da composição do OE (Anexo A).

Em relação à segurança da aplicabilidade do composto DHF como agente terapêutico, algumas evidências merecem ser mencionadas. Dois estudos trazem a avaliação de parâmetros toxicológicos do composto DHF. Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, foi constatada a ausência de efeitos adversos comportamentais em peixes submetidos por 24h a concentrações sedativas deste composto (GARLET et al., 2016). Outro estudo mostrou que macrófagos RAW 264.7 de camundongo não tiveram sua viabilidade afetada pelo composto DHF (forma enantiomérica não especificada) em concentrações de até 100 μ M. Ainda, foi detectada a ação protetora de DHF frente ao estresse oxidativo (produção de ROS) induzido por LPS em macrófagos RAW 264.7 (PONOMARENKO et al., 2016). Desta forma, este sesquiterpenoide se mostra como uma molécula bioativa com baixa probabilidade de apresentar efeitos tóxicos. Adicionalmente, após 4h de exposição de peixes ao composto DHF, não houve modificação na expressão das subunidades α 1, α 2, α 3, β 1, δ e γ 2 do receptor GABA_A (manuscrito 1), sugerindo que as ações deste composto possam ser desprovidas de uma alteração na expressão do seu receptor-alvo. Este fato pode ser interessante do ponto de vista

farmacodinâmico, pois estaria ligado a uma menor propensão deste composto em dessensibilizar o receptor, o que poderia refletir em uma menor tolerância a longo prazo (VINKERS; OLIVIER, 2012). Este efeito, ou falta dele, sobre a expressão de subunidades do receptor GABA_A, também foi visto para o composto DFX. Cabe destacar ainda, que não foi detectado o mesmo perfil de modulação da expressão de subunidades do receptor GABA_A em peixes para o OE e seu composto majoritário DHF. O OE induziu um aumento na expressão da subunidade $\alpha 2$, sugerindo que sua ação sobre os receptores GABA_A inclui a interação com esta subunidade. Como mencionado já nesta tese, moduladores seletivos para a subunidade $\alpha 2$ são promissores para o tratamento de transtornos de ansiedade, uma vez que tem menor probabilidade de induzir tolerância (ENGIN; LIU; RUDOLPH, 2012).

Um aspecto interessante dos resultados obtidos com o composto DHF nos ensaios de avaliação da sua atividade anticonvulsivante (artigo 1) e de atividade tipo-ansiolítica em camundongos (manuscrito 2), é a indução ou não, respectivamente, de efeito sedativo aparente (sugerido pelo efeito nos parâmetros comportamentais de locomoção e exploração). A diferença entre os protocolos foi a via de administração: por via intraperitoneal no ensaio de atividade anticonvulsivante e por via oral no ensaio de atividade tipo-ansiolítica. A administração por via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg induziu uma diminuição na locomoção, exploração vertical (número de *rearings*), comportamento de autolimpeza e defecação. Estes efeitos, quando interpretados conjuntamente sugerem efeito sedativo (KALUEFF et al., 2006; KULESSKAYA; VOIKAR, 2014; PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). No entanto, a mesma dose de 100 mg/kg DHF, quando administrada por via oral não afetou a locomoção de camundongos e contrariamente, induziu um aumento na atividade exploratória dos animais. Essas diferenças podem ser explicadas: (1) pelo fato de que alguns OEs, quando administrados via intraperitoneal podem causar irritação local, inflamação e dor, o que poderia induzir uma diminuição na locomoção (HÄNSEL; STICHER, 2015). Entretanto, evidências já discutidas acima suportam a hipótese de que o composto DHF não induza toxicidade significativa em animais (GARLET et al., 2016); (2) uma hipótese mais plausível seria a devido às distintas biodisponibilidades atreladas a cada uma das vias de administração dos respectivos estudos. A menor biodisponibilidade de substâncias administradas pela via oral quando comparada às vias intraperitoneal, intramuscular e intravenosa é uma informação consolidada na literatura (NEMES et al., 2000; ROWLAND, 1972). Para que uma substância administrada por via oral chegue ao seu sítio de ação no SNC ela deve ultrapassar uma série de processos, entre eles a solubilização no meio gástrico, seu transporte através da membrana intestinal e o efeito de primeira passagem, ou seja, a

metabolização hepática (KUENTZ; ARNOLD, 2009). Portanto, sugere-se que por via intraperitoneal o composto DHF esteja mais rapidamente disponível no SNC, o que maximizaria seu efeito neurodepressor. Esta proposição vai ao encontro do que já é afirmado na literatura: a rota de administração de uma substância é um fator determinante para seus efeitos farmacológicos (GERASIMOV et al., 2000). Da mesma forma que DHF, o OE e os demais compostos avaliados também foram desprovidos de efeito sedativo nos testes de avaliação de atividade ansiolítica. A partir dos resultados obtidos para o composto DHF discutidos acima, sugere-se que a ausência do efeito sedativo também seja devido ao tipo de via de administração.

Um desfecho positivo da investigação das atividades biológicas de compostos provenientes de plantas nativas é a contribuição para a caracterização química e farmacológica da flora brasileira e a valorização da biodiversidade do país. O Brasil é um importante exportador no mercado mundial de OEs e seus compostos, sendo considerado até a última década como quarto maior produtor mundial, depois da Índia, China e Indonésia (VIEIRA; BIZZO; DESCHAMPS, 2010). No entanto, o Brasil é um exportador de matérias primas de baixo valor agregado, enquanto que os produtos manufaturados, a exemplo dos fármacos, são adquiridos de países desenvolvidos a custos elevados (SPEZIALI, 2012). Os compostos derivados de OEs são amplamente empregados na indústria farmacêutica com aplicação na área de cosméticos e medicamentos de uso humano e veterinário (MAIA; ANDRADE, 2009). Para continuar fomentando este mercado, é necessário manter a investigação das propriedades farmacológicas de compostos extraídos de espécies nativas da flora brasileira.

Produtos obtidos a partir de fontes vegetais devem levar em consideração a manutenção da espécie, ou seja, o manejo sustentável das plantas nativas como fonte de novas moléculas. Quanto a este aspecto, a extração do OE de *N. grandiflora*, para a obtenção dos sesquiterpenoides alvos deste estudo, utiliza como matriz vegetal as folhas desta planta, cuja coleta, quando feita de forma criteriosa, não prejudica o crescimento e desenvolvimento da espécie. Em caso de necessidade de aplicação em larga escala de tais compostos, onde a utilização dos mesmos supera o montante obtido de fontes naturais, algumas alternativas poderiam ser adotadas (HOMMA, 2014). No que se trata de compostos provenientes de espécies nativas, têm-se aplicado a técnica da domesticação da espécie de interesse (plantio de espécie nativa em outro local visando a produção em larga escala), como no caso da candeia (*Eremanthus erythropappus*), que produz o α -bisabolol (antibacteriano e antimicótico). Ainda, pode se encontrar outras fontes vegetais com a mesma substância, como no caso do safrol inicialmente extraído da *Ocotea odorifera* (Sassafras) e posteriormente de *Piper hispidinervum*

e *Cinamomum canfora*. Outra alternativa seria a produção sintética da molécula, a exemplo do linalol, extraído inicialmente de *Aniba rosaeodora* (HOMMA, 2012) ou então através de processos biotecnológicos *in vitro*, com a obtenção das moléculas de interesse utilizando culturas de tecidos vegetais, microrganismos ou enzimas isoladas (GOUNARIS, 2010). Em suma, o estudo e caracterização do potencial farmacológico de substâncias oriundas da flora brasileira colabora para a geração de conhecimento científico sobre as espécies nativas do país, fomentando a implementação de projetos de impacto tecnológico (geração de novos fármacos) e possíveis divisas para a academia e indústria nacional. Adicionalmente, esta tese contribui para a expansão do acervo de substâncias derivadas da flora nativa local com atividade neuroativa, com potencial para a aplicação na promoção da saúde tanto humana quanto animal.

9 CONCLUSÃO

No presente estudo foram encontradas evidências de que os sesquiterpenoides (+)-deidrofuquinona, (-)-selin-11-en-4- α -ol, (+)-eremofil-11-en-10-ol e (+)-epóxido de deidrofuquinona induzem efeitos depressores do SNC em diferentes modelos experimentais. O óleo essencial de *N. grandiflora*, e os compostos deidrofuquinona, (-)-selin-11-en-4- α -ol, (+)-eremofil-11-en-10-ol e (+)-epóxido de deidrofuquinona induzem efeitos tipo-ansiolíticos em camundongos, facilitam a hiperpolarização da membrana e inibem o influxo de cálcio neuronal. Adicionalmente, o composto (+)-deidrofuquinona tem efeito anticonvulsivante em camundongos; os compostos (-)-selin-11-en-4- α -ol, (+)-eremofil-11-en-10-ol e (+)-epóxido de deidrofuquinona induzem efeito sedativo persistente em peixes; e o óleo essencial, epóxido de deidrofuquinona e (-)-selin-11-en-4- α -ol modulam diferentes subunidades do receptor GABA_A em córtex de peixes. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o mecanismo de ação principal destes compostos seja a modulação positiva dos receptores GABA_A. Os resultados desta tese propõem a aplicação do óleo essencial de *Nectandra grandiflora* na concentração de 40 mg/L e compostos isolados na concentração de 12,5 a 25 mg/L como agentes sedativos para a prática de piscicultura. Adicionalmente, os resultados obtidos neste estudo evidenciam o potencial desta espécie vegetal para o tratamento de patologias que envolvam o aumento da excitabilidade neuronal, como a epilepsia e os transtornos de ansiedade. Contudo, mais estudos devem ser realizados a fim de garantir a eficácia e a segurança do óleo essencial e de seus compostos isolados como estratégias terapêuticas na saúde humana e veterinária.

ANEXO A- Composição química do óleo essencial de folhas de *Nectandra grandiflora*

TR	Constituinte	IK _C	IK _L	%
<i>Hidrocarbonetos monoterpênicos</i>				
10,32	α -Pineno	931	937 ^N	2,14
12,01	β -Pineno	973	978 ^N	2,27
14,61	(Z)-Ocimeno	1039	1038 ^N	0,27
15,00	(E)-Ocimeno	1049	1048 ^N	0,63
<i>Monoterpenoides oxigenados</i>				
17,02	Linalol	1101	1101 ^N	4,42
20,27	(2E)-Hexenil-butirato	1188	1191 ^{N/A}	0,53
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>				
27,22	β -Elemeno	1393	1394 ^N	0,47
28,09	Aromadendreno	1421	1418 ^N	1,05
28,77	NI	1443	—	2,75
29,66	α -Muuroleno	1471	1472 ^N	1,04
29,89	Allo-Aromadendreno	1479	1478 ^N	1,30
30,02	Amorfa-4,7 (11)-Dieno	1483	1479 ^A	3,79
30,21	Valenceno	1489	1490 ^N	1,40
30,38	Eremofileno	1495	1489 ^N	0,90
30,49	Biciclogermacreno	1498	1500 ^A	5,93
30,75	NI	1507	—	7,52
30,81	NI	1509	—	2,59
31,76	NI	1542	—	0,75
<i>Sesquiterpenoides oxigenados</i>				
32,87	Espatuleno	1579	1578 ^{N/A}	3,48
33,05	NI	1586	—	0,75
33,19	NI	1590	—	0,57
33,36	NI	1596	—	0,58
34,96	Epóxido de deidrofuquinona	1653	1656^S	10,07
35,06	Selin-11-en-4-α-ol	1657	1659^A	4,09
37,70	NI	1755	—	3,66
37,86	NI	1761	—	1,32
39,08	Deidrofuquinona	1808	1813^S	22,21
39,40	Eremofil—11-en-10-ol	1821	1824^S	6,19
<i>Diterpenoides</i>				
42,18	Rumueno	1933	1930 ^N	1,62
44,72	(-)-Caureno	2040	2041 ^N	5,50

Onde: TR= tempo de retenção; IK_C=índice de Kovats calculado; IK_L=Índice de Kovats da literatura; N= NIST, 2008; A= ADAMS, 2009; S= SILVA, D. T.; 2017.

ANEXO B- Comitê ética: testes em camundongos



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado " Atividade central de substâncias isoladas de espécies de Lauraceae", protocolado sob o CEUA nº 3627041115, sob a responsabilidade de **Berta Maria Heinzmann e equipe; Luana da Costa Pires; Quelen Iane Garlet; Carlos Fernando de Mello** - 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 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) em reunião de 14/04/2016.

We certify that the proposal "Centras activity of isolate compounds from Lauraceae species", utilizing 8 Heterogenics mice (8 females), protocol number CEUA 3627041115, under the responsibility of **Berta Maria Heinzmann and team; Luana da Costa Pires; Quelen Iane Garlet; Carlos Fernando de Mello** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 04/14/2016.

Vigência da Proposta: de **06/2015** a **06/2017** Área: **Farmácia Industrial**

Procedência: **Biotério externo**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 2 meses**

N: **8**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Resumo: Transtornos ansiosos acometem grande parte da população, sendo considerado o mais comum dos transtornos psiquiátricos (KESSLER et al., 2010). O tratamento de primeira escolha atualmente para ansiedade são os fármacos da classe dos benzodiazepínicos, os quais apesar da eficácia terapêutica apresentam efeitos colaterais como sedação e amnésia anterógrada (CUNNINGHAM; HANLEY; MORGAN, 2010). Este contexto fomenta cada vez mais a busca por novas abordagens terapêuticas (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2009). Óleos essenciais de diferentes espécies apresentam atividade tipo ansiolítica relatada (CHEN et al., 2012; CHIOCA et al., 2013; CIOANCA et al., 2014; COSTA et al., 2011; MESFIN; ASRES; SHIBESHI, 2014). Substâncias isoladas de óleos essenciais, como o (E)-methyl isoeugenol, o (?) -myrtenol, o fitol, o isopulegol, vem demonstrando bons resultados de atividade ansiolítica em modelos comportamentais em roedores (FAJEMIROYE et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2007). O mecanismo descrito para a maioria dos óleos essenciais ou substâncias isoladas dos mesmos, envolvem o agonismo gabaérgico (GABAa) ou serotoninérgico (5-HT1A) (CHIOCA et al., 2013; MOREIRA et al., 2014; COSTA et al., 2014).

A epilepsia acomete certa de 50 milhões de indivíduos em todo o mundo. Esta patologia afeta pessoas de todas as faixas etárias e em diferentes intensidades (OMS, 2012). Estima-se que entre 6% a 69% dos pacientes não respondem a terapias médicas e cirúrgicas padrões e continuam a ter debilitantes crises refratárias (TELLEZ-ZENTENO et al., 2014). Estudos recentes mostram que a disponibilidade média de medicamentos antiepilépticos no setor público é menor que 50% (OMS, 2012). Neste contexto, incentiva-se a busca de novas abordagens terapêuticas para o tratamento desta doença. O ramo dos produtos naturais muitas vezes traz alternativas proveitosas para a procura por novas moléculas bioativas. Os óleos essenciais vêm sendo estudados como anticonvulsivantes, uma vez que muitos deles apresentam atividade depressora do SNC (ADAMS et al., 2012). São exemplos de óleos essenciais com bom desempenho em reduzir crises convulsivas no modelo do pentilenotetrazol, o óleo de *Zhumeria majdae*, *Cuminum cyminum*, *Ferula gumosa* e *Eucalyptus urophylla* (SAYYAH et al., 2001; JANAHMADI et al., 2006; MANDEGARY et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2008). Além disso, substâncias isoladas de óleos essenciais são intensivamente estudadas quanto ao seu potencial anticonvulsivo (ALMEIDA et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Na literatura, até o momento, não são contemplados estudos de atividade ansiolítica nem anticonvulsivante com óleos essenciais da espécie *Nectandra grandiflora*, o qual será investigada neste trabalho, bem como com as substâncias isoladas do seu OE. Devido aos resultados já encontrados de atividade depressora do SNC para a principal substância, aqui referida como DHF, e para outras 2 substâncias minoritárias (SS e SF) do OE de *N. grandiflora* torna-se oportuna a investigação de sua ação como ansiolítico e anticonvulsivante.

ADAMS, M. et al. Epilepsy in the Renaissance: A survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, n. 1, p. 1-13, 2012.

ALMEIDA, R. N. et al. Anticonvulsant activity of essential oils and their constituents. In: (Ed.). *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*, p. 141-158, 2012.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

- CHEN, C. J. et al. Neuropharmacological activities of fruit essential oil from *Litsea cubeba* Persoon. *Journal of Wood Science*, v. 58, n. 6, p. 538-543, 2012.
- CHEN, Q. X. et al. Anticonvulsant activity of acute and chronic treatment with α -asarone from *Acorus gramineus* in seizure models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, n. 1, p. 23-30, 2013.
- CHIOCA, L. R. et al. Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABA/benzodiazepine neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, n. 2, p. 412-418, 2013.
- COSTA, J. P. et al. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. *Brain Research*, v. 1547, p. 34-42, 2014.
- CUNNINGHAM, C. M.; HANLEY, G. E.; MORGAN, S. Patterns in the use of benzodiazepines in British Columbia: examining the impact of increasing research and guideline cautions against long-term use. *Health Policy*, v. 97, n. 2-3, p. 122-129, 2010.
- JANAHMADI, M. et al. Effects of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum* Linn. (Apiaceae) on pentylenetetrazol-induced epileptiform activity in F1 neurones of *Helix aspersa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, n. 1-2, p. 278-282, 2006.
- KESSLER, R. C. et al. Epidemiology of anxiety disorders. *Curr Top Behav Neurosci*, v. 2, p. 21-35, 2010.
- MANDEGARY, A. et al. Anticonvulsant activity and toxicity of essential oil and methanolic extract of *Zhumeria majdae* rech, a unique iranian plant in mice. *Neurochemical Research*, v. 37, n. 12, p. 2725-2730, 2012.
- MESFIN, M.; ASRES, K.; SHIBESHI, W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, 2014.
- MOREIRA, M. R. C. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: A monoterpene alcohol. *Neuroscience Letters*, v. 579, p. 119-124, 2014.
- NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. Anxiety Disorders. NIH Publication No. 09 3879: U.S. Department of Health and Human Services, 2009.
- OMS, O. M. D. S. Epilepsy: Fact sheet number 999, 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> >. Acesso em: 12/10/2014.
- SAYYAH, M. et al. Antiepileptic Potential and Composition of the Fruit Essential Oil of *Ferula Gummosa* boiss. *Iranian Biomedical Journal*, v. 5, n. 2, p. 69-72, 2001.
- TEIXEIRA G. F. D. et al. Sedative effect of *Eucalyptus urophylla* and *E. brassianain* mice. *Natural Products Communications*, v. 3, p. 1539-1542, 2008.
- TELLEZ-ZENTENO J. F. et al. A validation of the new definition of drug-resistant epilepsy by the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, v.55, p. 829-834, 2014.

Santa Maria, 16 de abril de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO C- Comitê ética: testes em peixes



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Óleos essenciais de diversas plantas na água e na ração como antimicrobianos, antiparasitários, anestésicos, promotores do crescimento e no transporte de peixes e camarões."

Número do Parecer: 074/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

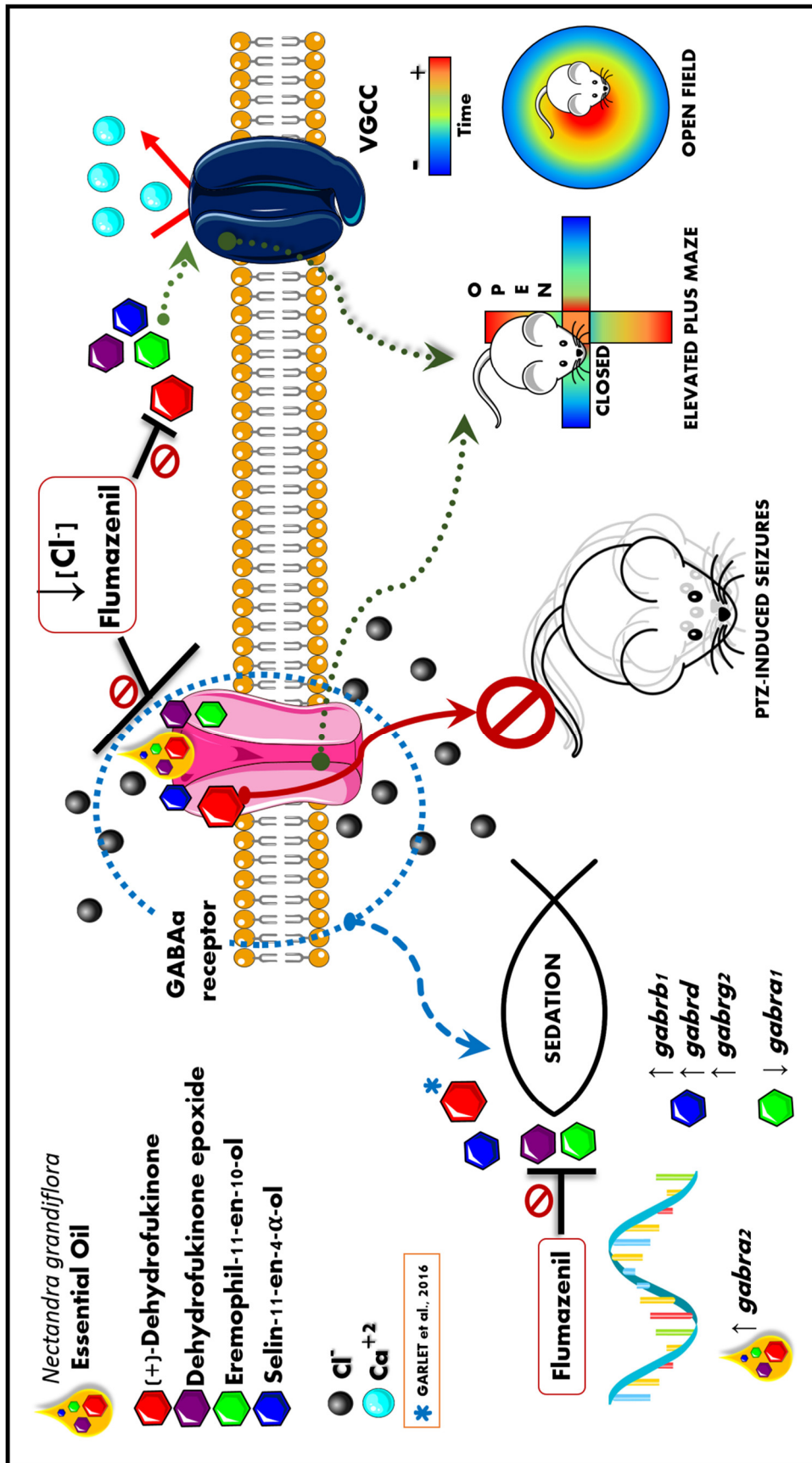
DATA DE APROVAÇÃO: 11/09/2014.

Santa Maria, 12 de setembro de 2014.

Sonia Lucia Loro

Prof.^a Dr.^a Vania Lucia Loro
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

ANEXO D – Resumo gráfico da Tese



10 REFERÊNCIAS

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, v.16, n.9, p.7672-7690, 2011.
- ABOUHOSSEINI TABARI, M. et al. Anxiolytic and antidepressant activities of *Pelargonium roseum* essential oil on Swiss albino mice: Possible involvement of serotonergic transmission. **Phytotherapy Research**, v.32, n.6, p.1014-1022, 2018.
- ADAM, F. et al. Aromatic plants of French Polynesia. V. Chemical composition of essential oils of leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Essential Oil Research**, v.23, n.1, p.98-101, 2011.
- ADAMEC, R.; SHALLOW, T.; BURTON, P. Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. **Behavioral Brain Research**, v.159, n.1, p.73-88, 2005.
- ADAMS, M. et al. Epilepsy in the Renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, n.1, p.1-13, 2012.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois, 2009.
- ADAMS, T. B. et al. The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.10, p.2471-2494, 2011.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, n.6, p.407-426, 2010.
- AHMAD, F. B. et al. A comparative study of the composition of the leaf oils of three *Litsea* species from Borneo. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.3, p.323-326, 2005.
- AHMED, A. A. Eremophila from *Senecio desfontainei*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.271-272, 1991.
- AKHONDIAN, J. et al. The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). **Epilepsy Research**, v.93, n.1, p.39-43, 2011.
- AKTER, K. et al. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterisation of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.185, p.171-181, 2016.
- ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.8, p.601-611, 2015.
- ALKHATHLAN, H. Z. et al. Three 2-(2-phenylethyl) chromones and two terpenes from agarwood. **Natural Products Research**, v.19, n.4, p.367-372, 2005.

ALVES, A. d. M. H. et al. Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. **Neuroscience Letters**, v.472, n.1, p.11-15, 2010.

ALVES, F. M. et al. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Botanica Brasiliense.**, v.23, n.1, p.119-129, 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5.** Washington, DC, 2013.

AMORIM, A. C. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v.16, n.10, p.923-928, 2009.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic Rain Forest. **Pharmacologyonline**, v.3, p.376-383, 2006.

APPUKUTTAN, D. P. Strategies to manage patients with dental anxiety and dental phobia: Literature review. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v.8, p.35-50, 2016.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, n.4-5, p.325-37, 2003.

ASAKURA, K. et al. Alpha-eudesmol, a P/Q-type Ca^{2+} channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion. **Brain Research**, v.873, n.1, p.94-101, 2000.

AZANCHI, T.; SHAFAROODI, H.; ASGARPANAH, J. Anticonvulsant activity of *Citrus aurantium* blossom essential oil (Neroli): Involvement of the GABAergic system. **Natural Product Communications**, v.9, n.11, p.1615-1618, 2014.

BAGCI, E. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Ferulago angulata* essential oil in the scopolamine rat model of Alzheimer's disease. **Flavour and Fragrance Journal**, v.31, n.1, p.70-80, 2016.

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. **Anxiety-Related Behaviors in Mice.** Boca Raton (FL), 2009.

BALDISSEROTTO, B. et al. **Farmacologia Aplicada à Aquicultura.** Santa Maria, RS, Brasil, 2017.

BALDISSEROTTO, B. et al. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. **Neotropical Ichthyology**, v.16, p. e170128, 2018.

BANNAI, H. et al. Bidirectional control of synaptic GABA(A)R clustering by glutamate and calcium. **Cell Reports**, v.13, n.12, p.2768-2780, 2015.

BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v.1267, p.65-76, 2009.

BARBAS, L. A. L. et al. Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v.469, p.79-87, 2017.

BARCELLOS, L. J. G. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v.32, n.2, p.121-123, 2001.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture** v.253, n. 1-4, p.317-321, 2006.

BARCELLOS, L. J. G. et al. The color of illumination affects the stress response of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, Heptapteridae). **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1249-1252, 2006.

BAULAC, S. et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. **Nature Genetics**, v.28, n.1, p.46-48, 2001.

BAXENDALE, S. et al. Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v.5, n.6, p.773-784, 2012.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthesia and transport of brazilian flounder, *paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.43, n.6, p.896-900, 2012.

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.

BHAT, M. A. et al. Association of GABAA receptor gene with epilepsy syndromes. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.65, n.2, p.141-153, 2018.

BOHLMANN, F. et al. A norsesquiterpene from *Senecio humillimus*. **Phytochemistry**, v.20, n.7, p.1739-1740, 1981.

BONYANI, A.; SAJJADI, S. E.; RABBANI, M. Anxiolytic effects of *Lippia citriodora* in a mouse model of anxiety. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.3, p.205-212, 2018.

BOWKER, J.; TRUSHENSKI, J. AFS policy statement regarding the need for an immediate-release anesthetic/sedative for use in the fisheries disciplines. **Fisheries**, v.36, n.3, p.132-135, 2011.

BOWKER, J. D. et al. Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm, cool, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.25, n.1, p.147–163, 2014.

BRAAT, S.; KOOY, R. F. The GABAA receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders. **Neuron**, v.86, n.5, p. 1119-1130, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAULT, V. et al. Characterization of PTZ-induced seizure susceptibility in a down syndrome mouse model that overexpresses CSTB. **Plos One**, v.6, n.11, p. e27845, 2011.

BREUKEL, A. I.; BESSELSSEN, E.; GHIJSEN, W. E. Synaptosomes. A model system to study release of multiple classes of neurotransmitters. **Methods in Molecular Biology**, v.72, p.33-47, 1997.

BREVARD, M. E. et al. Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, v.47, n.4, p.745–754, 2006.

BRITO, A. F. R.; MORENO, P. R. H. Analisis of seasonal variation and antifungal and antimicrobial activities in essential oils of *Ocotea porosa* (Nees) Barroso and *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. v., n., p., 2009.

BROOKS-KAYAL, A. R. et al. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. **Nature Medica**, v.4, n.10, p.1166-1172, 1998.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, n.3, p.475-516, 2008.

CANTRELL, C. L.; CARROLL, J. F.; KLUN, J. A. Plant compounds repel ticks. **Industrial Bioprocessing**, v.29, n.3, p.7-8, 2007.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia comportamental**. Editora Unifesp, São Paulo, 2011.

CAROFF, D. A.; SZUMITA, P. M.; KLOMPAS, M. The relationship between sedatives, sedative strategy, and healthcare-associated infection: A systematic review. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.37, n.10, p.1234-1242, 2016.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.12, p.1629-1633, 2002.

CHAGRAOUI, A. et al. To what extent is it possible to dissociate the anxiolytic and sedative/hypnotic properties of GABAA receptors modulators? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.71, p.189-202, 2016.

CHANDERBALI, A. S.; VAN DER WERFF, H.; RENNER, S. S. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear genomes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.88, n.1, p.104-134, 2001.

CHANOTIYA, C. S.; SAMMAL, S. S.; MATHELA, C. S. Composition of a new chemotype of *Tanacetum nubigenum*. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, v.44, n.9, p.1922-1926, 2005.

CHAPMAN, A. G.; HORTON, R. W.; MELDRUM, B. S. Anticonvulsant action of a 1,5-benzodiazepine, clobazam, in reflex epilepsy. **Epilepsia**, v.19, n.3, p.293-299, 1978.

CHAVES, E. M. C. et al. The anxiolytic-like effect of 6-styryl-2-pyrone in mice involves GABAergic mechanism of action. **Metabolic Brain Disease**, v.33, n.1, p.1-11, 2017.

CHAVES, J. S. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene alpha-humulene in mice. **Planta Medica**, v.74, n.14, p.1678-1683, 2008.

CHEN, Q. X. et al. Anticonvulsant activity of acute and chronic treatment with a-asarone from *Acorus gramineus* in seizure models. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.1, p.23-30, 2013.

CHEN, S. W. et al. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.79, n.2, p.377-382, 2004.

CHEN, W.-Y. et al. Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, n.5, p.380-382, 1994.

CHETTY, G. L.; ZALKOW, V. B.; ZALKOW, L. H. The synthesis and absolute configuration of *Juniper camphor* and selin-11-en-4 α -ol. The structure of intermedeol. **Tetrahedron Letters**, v.9, n.28, p.3223-3225, 1968.

CHIKHALE, H. U. et al. GABA receptor - A well established old target. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.suppl.1, p.61-66, 2012.

CHIOCA, L. R. et al. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. **Life Sciences**, v.92, n.20-21, p.971-975, 2013a.

CHIOCA, L. R. et al. Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, v.147, n.2, p.412-418, 2013b.

CHOI, Y.-J. et al. Polymorphism rs4263535 in GABRA1 intron 4 was related to deeper sedation by intravenous midazolam. **Journal of International Medical Research**, v.43, n.5, p.686-698, 2015.

CHONG, D. J.; LERMAN, A. M. Practice update: review of anticonvulsant therapy. **Current Neurology Neuroscience Reports**, v.16, n.4, p.39, 2016.

CICCIÓ, J. F. et al. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. **Química Nova**, v.32, n.2, p.417-420, 2009.

CLINE, M. et al. Investigation of the anxiolytic effects of linalool, a lavender extract, in the male Sprague-Dawley rat. **AANA Journal**, v.76, n.1, p.47-52, 2008.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v.21, n.18, p.3674-3676, 2005.

COOKE, B.; ERNST, E. Aromatherapy: A systematic review. **British Journal of General Practice**, v.50, n.455, p.493-496, 2000.

CORCUERA-FLORES, J. R. et al. Current methods of sedation in dental patients - A systematic review of the literature. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.21, n.5, p.579-586, 2016.

COSTA, C. A. R. A. et al. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.42, p.1-10, 2013.

COSTA, C. A. R. D. A. et al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p.828-836, 2011.

COSTA, E. et al. GABA_A receptors and benzodiazepines: a role for dendritic resident subunit mRNAs. **Neuropharmacology**, v.43, n.6, p.925-937, 2002.

COSTA, J. P. et al. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v.1547, p.34-42, 2013.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v.163, n.1, p.490-499, 2009.

CRESTANI, F. et al. Decreased GABA_A-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. **Nature Neuroscience**, v.2, n.9, p.833-839, 1999.

CROCQ, M. A. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.17, n.3, p.319-325, 2015.

CUNHA, M. A. d. et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.306, n.1-4, p.403-406, 2010a.

CUNHA, M. A. d. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Cienc. Rural**, v.40, n.10, p.2107-2114, 2010b.

CUNICO, M. M. et al. Estudo preliminar antimicrobiano e fitoquímico do óleo essencial foliar da *Nectandra grandiflora* Nees (canela-amarela). - **Portal Embrapa**, 2016.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.62, n.4, p.727-734, 1999.

DANIEL, A. P. et al. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. **Journal of Food Science**, v.79, n.6, p.S1205-S1211, 2014.

DE BARROS, M. et al. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of *Solidago chilensis* (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.389, n.4, p.403-417, 2016.

DE SOUSA, D. P. et al. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. **Molecules**, v.20, n.10, p.18620-18660, 2015.

DEHKORDI, A. K. et al. Effects of aromatherapy using the damask rose essential oil on depression, anxiety, and stress in hemodialysis patients: A clinical trial. **Nephro-Urology Monthly**, v.9, n.6, p. e60280, 2017.

DEVAUD, L. L. et al. Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. **Journal of Neurochemistry**, v.69, n.1, p.126-130, 1997.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v.19, n.2, p.181-222, 2002.

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.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-316, 2000.

DUH, C. Y. et al. Cytotoxic terpenoids from the formosan soft coral *Nephthea brassica*. **Journal of Natural Products**, v.62, n.11, p.1518-1521, 1999.

DUNKLEY, P. R.; JARVIE, P. E.; ROBINSON, P. J. A rapid percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. **Nature Protocols**, v.3, n.11, p.1718-1728, 2008.

ENGEL, J. et al. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Journal of the American Medical Association, 2008.

ENGIN, E.; LIU, J.; RUDOLPH, U. α 2-containing GABA(A) receptors: A target for the development of novel treatment strategies for CNS disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v.136, n.2, p.142-152, 2012.

EREĆIŃSKA, M.; NELSON, D.; SILVER, I. A. Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes). **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1277, n.1-2, p.13-34, 1996.

ETKIN, A.; WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **American Journal of Psychiatry**, v.164, n.10, p.1476-1488, 2007.

EVANS, G. J. The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. **Cold Spring Harb Protocols**, v.2015, n.5, p.421-424, 2015.

EVANS, G. J. O. Subcellular fractionation of the brain: Preparation of synaptosomes and synaptic vesicles. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.2015, n.5, p.462-466, 2015.

EVERETT, G. M.; RICHARDS, R. K. Comparative anticonvulsive action of 3,5,5-trimethyloxazolidine-2,4-dione (tridione), dilantin and phenobarbital. **Anesthesiology**, v.6, n.4, p.448-448, 1945.

FAHEEM, M. et al. Interaction of different proteins with GABAA receptor and their modulatory effect on inhibitory neural transmission leads to epilepsy. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, v.13, n.7, p.1148-1159, 2014.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Anxiolytic and antidepressant like effects of natural food flavour (E)-methyl isoeugenol. **Food Function**, v.5, n.8, p.1819-1828, 2014.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Ministério da Saúde**, 2010.

FARRANT, M.; NUSSER, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, n.3, p.215-229, 2005.

FEDOCE, A. D. G. et al. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? **Free Radical Research**, v.52, n.7, p.737-750, 2018.

FENG, T. et al. Antimicrobially active isoquinoline alkaloids from *Litsea cubeba*. **Planta Medica**, v.75, n.1, p.76-79, 2009.

FIGUEIREDO, L. S. et al. Effect of harvesting time on phytomass production and essential oil yield in "alecrim-pimenta" (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.154-158, 2009.

FISHER, R. S., et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v.58, n.4, p.522-530, 2017.

FONSÊCA, D. V. et al. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: Involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.30, n.1, p.14-22, 2016.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. JBRJ, Brazil, 2010.

FRACALOSSO, D. M.; ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S. No rastro das espécies nativas. **Panorama da Aqüicultura**, v.12, p.43-49, 2002.

FRACALOSSO, D. M. et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum (Animal Sciences)**, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

FROLUND, B. et al. GABA-A receptor ligands and their therapeutic potentials. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, n.8, p.817-832, 2002.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α ,5 α -THP. **Pharmacology and Biochemistry Behavior**, v.67, n.3, p.587-596, 2000.

FULTON, J. J. et al. Psychotherapy targeting depression and anxiety for use in palliative care: A meta-analysis. **Journal of Palliative Medicine**, v.21, n.7, p.1024-1037, 2018.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications**. Garnder's, UK, 2002.

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.

GAO, L.; LI, S. Emerging drugs for partial-onset epilepsy: a review of brivaracetam. **Therapeutical and Clinical Risk Management**, v.12, p.719-734, 2016.

GAO, X. F., et al. G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in dorsal root ganglion neurons. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.28, n.2, p.185-190, 2007.

GARCEZ, F. R. et al. Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v.32, n.2, p.407-411, 2009.

GARCEZ, F. R. et al. Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. **Química Nova**, v.33, n.8, p.1739-1742, 2010.

GARCIA, P. S.; KOLESKY, S. E.; JENKINS, A. General anesthetic actions on GABA(A) receptors. **Current Neuropharmacology**, v.8, n.1, p.2-9, 2010.

GARLET, Q. I. et al. Antimicrobial activity of (+)- Dehydrofukinone isolated from *Nectandra grandiflora* essential oil. **47th Annual Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE)**, 2015.

GARLET, Q. I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.49, n.1, p.e4872, 2016.

GASTAUT, H. et al. Treatment of status epilepticus with diazepam (valium). **Epilepsia**, v.6, n.2, p.167-182, 1965.

GASTÓN, M. S. et al. Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.10, p.1954-1961, 2016.

GELFUSO, E. A. et al. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, v.13, n.1, p.150-165, 2014.

GERASIMOV, M. R. et al. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: a microdialysis and locomotor activity study. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.295, n.1, p.51, 2000.

GERSNER, R. et al. Huperzine A prophylaxis against pentylenetetrazole-induced seizures in rats is associated with increased cortical inhibition. **Epilepsy Research**, v.117, p.97-103, 2015.

GOLDBERG, E. M.; COULTER, D. A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, v.14, n.5, p.337-349, 2013.

GOMES, D. P. et al. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, n.6, p.878-886, 2011.

GONCALVES, J. C. et al. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.5, p.1017-1020, 2008.

GONZALEZ-SABIN, J. Natural Products: back to the future in drug discovery. **Biochemistry & Pharmacology: Open Access**, v.1, n.2, p. e112, 2012.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v.11, n.5, p.1537-1570, 1972.

GOUNARIS, Y. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, v.25, n.5, p. 367-386, 2010.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. **Advances in Biochemistry and Engineer Biotechnology**, v.64, p.101-154, 1999.

GRECCO, S. S. et al. Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). **Tetrahedron Asymmetry**, v.27, n.17-18, p.793-810, 2016.

GREENFIELD, L. J., Jr. Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. **Seizure**, v.22, n.8, p.589-600, 2013.

GRESSLER, L. T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v.45, n.6, p. 1061-1072, 2012.

GRESSLER, L. T. et al. Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.41, n.2, p. 463-472, 2014.

GRUNDMANN, O. et al. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.3, p.406-411, 2007.

GRUPE, D. W.; NITSCHKE, J. B. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v.14, n.7, p.488-501, 2013.

GUO, J. et al. Determination of ligustilide in rat brain after nasal administration of essential oil from *Rhizoma chuanxiong*. **Fitoterapia**, v.80, n.3, p.168-172, 2009.

HAJHASHEMI, V. et al. Evaluation of antianxiety and sedative effects of essential oil of *Ducrosia anethifolia* in mice. **Clinics**, v.65, n.10, p.1037-1042, 2010.

HAJJAJ, G. B. A. T. M. C. Y. Z. A. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of *Ormenis mixta* L. from Morocco. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.5, p.49-52, 2016.

HALL, B. J. et al. Flumazenil-independent positive modulation of γ -aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ and $\alpha 1\beta 2$ GABAA receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.491, n.1, p.1-8, 2004.

HALL, B. J. et al. Modulation of ionotropic GABA receptors by 6-methoxyflavanone and 6-methoxyflavone. **Neurochemistry Research**, v.39, n.6, p.1068-1078, 2014.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v.18, n.3, p.385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.327, n.1, p.1-5, 1984.

HÄNSEL; STICHER. **Pharmakognosie Phytopharmazie**. Wissenschaftliche; ed. 10. 1014p., 2015.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SANCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Progress in Neuropsychopharmacology Biology and Psychiatry**, v.28, n.1, p.105-113, 2003.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19-20, p.894-901, 2008.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n.3, p.238-243, 2012.

HAYASHI, K.; NAKAMURA, H.; MITSUHASHI, H. Sesquiterpenes from *Cacalia hastata*. **Phytochemistry**, v.12, p.2931-2933, 1973

HEINZMANN, B. M. et al. Método de sedação e/ou anestesia em animais aquáticos e o uso da deidrofouquinona. Sedation and/or anesthetic method on aquatic animals and dehydrofukinone utilization. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, BR1020140136304. 2016.

HELDT, S. A.; MOU, L.; RESSLER, K. J. *In vivo* knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. **Translational Psychiatry**, v.2, n.11, p.e181, 2012.

HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n.5, p.436-443, 2012.

HELDWEIN, C. G. et al. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.41, n.6, p.621-629, 2014.

HENRY, B. A systematic literature review on the ethics of palliative sedation: An update (2016). **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v.10, n.3, p.201-207, 2016.

HENSON, R. K.; ROBERTS, J. K. Use of exploratory factor analysis in published research: common errors and some comment on improved practice. **Educational and Psychological Measurement**, v.66, n.3, p.393-416, 2006.

HINTERSTEINER, J. et al. Esters of valerenic acid as potential prodrugs. **European Journal of Pharmacology**, v.735, n.1, p.123-131, 2014.

HOHLENWERGER, J. C. et al. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciencia Rural**, v.47, n.3, p.e20160040, 2017.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: Qual a opção para a Amazônia? **Estudos Avancados**, v.26, n.74, p.167-186, 2012.

HOMMA, A. K. O. **Extrativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação**. EMBRAPA, Brasília, Brasil, 2014.

HOOPER, A.; PARACHA, R.; MAGUIRE, J. Seizure-induced activation of the HPA axis increases seizure frequency and comorbid depression-like behaviors. **Epilepsy and Behavior**, v.78, p.124-133, 2018.

HOSSEINZADEH, H.; PARVARDEH, S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. **Phytomedicine**, v.11, n.1, p.56-64, 2004.

ITO, K.; ITO, M. The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure-activity relationships. **Journal of Natural Medicine**, v.67, n.4, p.833-837, 2013.

ITO, K. et al. Sedative effects of inhaled essential oil components of traditional fragrance *Pogostemon cablin* leaves and their structure-activity relationships. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.6, n.2, p.140-145, 2016.

JANVE, V. S. et al. Epileptic encephalopathy de novo GABRB mutations impair gamma-aminobutyric acid type A receptor function. **Annals in Neurology**, v.79, n.5, p.806-825, 2016.

JAVED, H. et al. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. **BMC Neuroscience**, v.17, n.1, p.1-12, 2016.

JEMBREK, M. J.; VLAINIC, J. GABA receptors: pharmacological potential and pitfalls. **Current Pharmaceutical Design**, v.21, n.34, p. 4943 - 4959, 2015.

JIMENEZ, J. C. et al. Anxiety cells in a hippocampal-hypothalamic circuit. **Neuron**, v.97, n.3, p.670-683, 2018.

JOHANNESSEN, K. et al. Phenotypic spectrum of GABRA1. **Neurology**, v.87, n.11, p.1140-1151, 2016.

JOHN, A. J. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the leaf, bark and fruit oils of *Neolitsea fischeri* gamble. **Journal of Essential Oil Research**, v.20, n.3, p.279-282, 2008.

JOHNSTON, G. A. GABAA receptor pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v.69, n.3, p.173-198, 1996.

JOHNSTON, G. A. R. GABAA receptor channel pharmacology. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, n.15, p.1867-1885, 2005.

JOHNSTON, G. A. R. et al. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. **Advances in Pharmacology**, v.54, p.285-316, 2006.

JULIANTI, E. et al. Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. **Phytochemistry**, v.80, p.70-76, 2012.

JUNIOR, G. B. et al. *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. **Aquaculture**, v.482, p.49-56, 2018.

KAILA, K. et al. Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. **Journal of Physiology**, v.416, p.161-181, 1989.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; ŚWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research**, v.16, n.3, p.288-291, 2002.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European Journal of Pharmacology**, v.508, n.1-3, p.147-153, 2005.

KALUEFF, A. V. et al. Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests. **Behavioral Processes**, v.72, n.1, p.104-112, 2006.

KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v.17, n.1, p.45-59, 2016.

KAMAT, P. K.; KALANI, A.; TYAGI, N. Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain. **MethodsX**, v.1, n.1, p.102-107, 2014.

KAMATOU, G. P. P. V. Z. R. L. D. H. V. V. S. F. V. A. M. Synergistic and antagonistic interactions of essential oils on the biological activities of the solvent extracts from three *Salvia* species. **Natural Product Communications**, v.3, n.7, p.1111-1115, 2008.

KAMINSKI, R. M.; ROGAWSKI, M. A.; KLITGAARD, H. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments. **Neurotherapeutics**, v.11, n.2, p.385-400, 2014.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatry Disorders and Treatments**, v.10, p.1693-1705, 2014.

KANNER, A. M. Anxiety disorders in epilepsy: the forgotten psychiatric comorbidity. **Epilepsy currents**, v.11, n.3, p.90-91, 2011.

KESSELMANS, R. P. W. et al. Synthesis of all stereoisomers of eudesm-11-en-4-ol. 2. Total synthesis of selin-11-en-4 α -ol, intermedeol, neointermedeol, and paradisiol. First total synthesis of amiteol. **Journal of Organic Chemistry**, v.56, n.26, p.7237-7244, 1991.

KESSLER, A. et al. GABAA receptor modulation by the volatile fractions of *Sideritis* species used as 'Greek' or 'Turkish' mountain tea. **Flavour and Fragrance Journal**, v.27, p.297-303, 2012.

KESSLER, A. et al. GABA α receptor modulation by terpenoids from *Sideritis* extracts. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.58, n.4, p.851-862, 2014.

KNOFLACH, F.; HERNANDEZ, M. C.; BERTRAND, D. GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. v.115, p.10-17, 2016.

KRAMER, D. R. et al. Cortical spreading depolarization: Pathophysiology, implications, and future directions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.24, n., p.22-27, 2016.

KUENTZ, M. T.; ARNOLD, Y. Influence of molecular properties on oral bioavailability of lipophilic drugs - mapping of bulkiness and different measures of polarity. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.14, n.3, p.312-320, 2009.

KULAK, W. et al. Calcium modulation in epilepsy. **Polish Journal of Pharmacology**, v.56, n.1, p.29-41, 2004.

KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology and Behavior**, v.133, p.30-38, 2014.

KUMAR, D. et al. Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. **European Journal of Integrative Medicine**, v.4, n.2, p.e169-e176, 2012.

KUMAR, M. S.; KUPPAST, I. J. A review on gamma-aminobutyric acid (GABA) and its receptors. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.3, n.3, p.60-69, 2012.

KUMAR, R. et al. Chemical composition, antioxidant and myorelaxant activity of essential oils of *Globba sessiliflora* Sims. **Journal of Essential Oil Research**, v.24, n.4, p.385-391, 2012.

KUNTZ, A. et al. Effects of secretin on extracellular amino acid concentrations in rat hippocampus. **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, v.111, n.7, p.931-939, 2004.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review. v., n.0013-9580 (Print), p., 2004.

KWON, O.-Y. ;PARK, S.-P. Depression and anxiety in people with epilepsy. **Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)**, v.10, n.3, p.175-188, 2014.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n.6, p.279-289, 2007.

LEAL, M. C. et al. Natural products discovery needs improved taxonomic and geographic information. **Natural Products Reports**, v.33, n.6, p.747-750, 2016.

LEO, L. M.; PAMPLONA, F. A. Elevated Plus Maze Test to assess anxiety-like behavior in the mouse. **Bio-protocol**, v.4, n.16, p.e1211, 2014.

LI, W. et al. Quercitrin ameliorates the development of systemic lupus erythematosus-like disease in a chronic graft-versus-host murine model. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.311, n.1, p.F217, 2016.

LIAPI, C. et al. Antinociceptive properties of 1,8-Cineole and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. **Planta Medica**, v.73, n.12, p.1247-1254, 2007.

LIM, H. S. et al. Alantolactone from *Saussurea lappa* exerts antiinflammatory effects by inhibiting chemokine production and STAT1 phosphorylation in TNF- α and IFN- γ -induced in HaCaT cells. **Phytother Res**, v.29, n.7, p.1088-1096, 2015.

LIMA, A. B. et al. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**, v.16, n.6-7, p.555-559, 2009.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.965-987, 2016.

LINCK, V. M. et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v.16, n.4, p.303-307, 2009.

LINCK, V. M. et al. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v.17, n.8-9, p.679-683, 2010.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v.92, n.2, p.180-185, 1987.

- LIU, G. X. et al. Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. **Neuropsychopharmacology**, v.32, n.7, p.1531-1539, 2007.
- LIU, X.; TESTA, B.; FAHR, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. **Pharmaceutical Research**, v.26, n.5, p.962-977, 2011.
- LIZARRAGA, E. et al. A structural and vibrational study of dehydrofukinone combining FTIR, FTRaman, UV-visible and NMR spectroscopies with DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**, v.1048, p.331-338, 2013.
- LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v.52, n., p.657-678, 2011.
- LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v.20, n.5, p.359-368, 2011.
- LÖSCHER, W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v.12, n.10, p.757-776, 2013.
- LOW, K. et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v.290, n.5489, p.131-134, 2000.
- LUND, I. V. et al. BDNF Selectively regulates GABA_A receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. **Science Signaling**, v.1, n.41, p.ra9, 2008.
- LUONI, C. et al. Determinants of health-related quality of life in pharmaco-resistant epilepsy: results from a large multicenter study of consecutively enrolled patients using validated quantitative assessments. **Epilepsia**, v.52, n.12, p.2181-2191, 2011.
- LÜTTJOHANN, A.; FABENE, P. F.; VAN LUIJTELAAR, G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. **Physiology & Behavior**, v.98, n.5, p.579-586, 2009.
- MACDONALD, R. L.; BARKER, J. L. Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a common mode of convulsant action. **Neurology**, v.28, n.4, p.325-330, 1978.
- MACHIN, D.; CHEUNG, Y. B.; PARMAR, M. **Survival Analysis: A Practical Approach**. Wiley, 2006.
- MAIA, O. G. S.; ANDRADE, L. H. A. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Quimica Nova**, v.32, n.3, p.595-622, 2009.
- MAJNOONI, M. B. et al. Chemical composition and anxiolytic evaluation of *Achillea Wilhelmsii* C. Koch essential oil in rat. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.4, p.269-275, 2013.
- MALIZIA, A. L. et al. Decreased brain GABA(A)-benzodiazepine receptor binding in panic disorder: preliminary results from a quantitative PET study. **Archives of General Psychiatry**, v.55, n.8, p.715-720, 1998.

MANAYI, A. et al. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, v.68, n.4, p.671-679, 2016.

MANDER, L. N.; WILLIAMS, C. M. Chromatography with silver nitrate: part 2. **Tetrahedron**, v.72, n.9, p.1133-1150, 2016.

MANDHANE, S. N.; AAVULA, K.; RAJAMANNAR, T. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. **Seizure**, v.16, n.7, p.636-644, 2007.

MAY, P. et al. Rare coding variants in genes encoding GABAA receptors in genetic generalised epilepsies: an exome-based case-control study. **Lancet Neurology**, v.17, n.8, p.699-708, 2018.

MCNAMARA, J. O.; HUANG, Y. Z.; LEONARD, A. S. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. v.356, p.re12, 2006.

MCNAUGHTON, N. What do you mean 'anxiety'? Developing the first anxiety syndrome biomarker. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, v.48, n.2-3, p.177-190, 2018.

MESFIN, M.; ASRES, K.; SHIBESHI, W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.310, p.1-7, 2014.

MICELI, F. et al. Molecular pathophysiology and pharmacology of the voltage-sensing module of neuronal ion channels. **Frontiers in Cell Neuroscience**, v.9, p.1-21, 2015.

MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. GABA and the GABA_A receptor. **Journal of Neurochemistry**, v.21, n.2, p.127-131, 1997.

MILLER, S. L.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of the leaf essential oil of *Casimiroa edulis* La Llave & Lex. (Rutaceae) from Monteverde, Costa Rica. v.4, n.3, p.425-431, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria N° 1.319, de 25 de novembro de 2013. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Epilepsia. Secretaria de Atenção à saúde, 2013.

MOHLER, H. GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v.26, n.5-6, p.731-740, 2006.

MOLLATAGHI, A. et al. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia species*. **Fitoterapia**, v.83, n.2, p.298-302, 2012.

MONAGHAN, E. P.; MCAULEY, J. W. F. A. U.; DATA, J. L. Ganaxolone: a novel positive allosteric modulator of the GABA(A) receptor complex for the treatment of epilepsy. v.8, n.10, p. 1663-1671, 1999.

- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.48, n.4, p.254-260, 1955.
- MOREIRA, M. R. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: a monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, v.579, p.119-124, 2014.
- MOREIRA, M. R. C. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: A monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, v.579, p.119-124, 2014.
- MORENO-RIUS, J. The cerebellum in fear and anxiety-related disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.85, p.23-32, 2018.
- MORENO, P. R. H. et al. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, p.189-92, 1993.
- MORGAN, I. G. Synaptosomes and cell separation. **Neuroscience**, v.1, n.3, p.159-165, 1976.
- MURAKAMI, S. et al. Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice. **Natural Product Communications**, v.4, n.1, p.129-132, 2009.
- MURROUGH, J. W. et al. Emerging drugs for the treatment of anxiety. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v.20, n.3, p.393-406, 2015.
- NACHMAN, R. J. Tetrahydroligularenolide and related eremophilanes from *Senecio aureus*. **Phytochemistry**, v.22, n.3, p.780-782, 1983.
- NAGY, A.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). **Journal of Neurochemistry**, v.43, n.4, p.1114-1123, 1984.
- NAYA, K. et al. The structure of fukinone, a constituent of *Petasites japonicus* Maxim. **Tetrahedron**, v.24, p.5871-5879, 1968.
- NAYA, K.; TSUJI, K.; HAKU, U. The constituents of *Articum lappa* L. **Chemistry Letters**, v.1, n.3, p.235-236, 1972.
- NEMES, K. B. et al. Oral, intraperitoneal and intravenous pharmacokinetics of deramciclone and its N-desmethyl metabolite in the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.1, p.47-51, 2000.
- NIEMEYER, H. M. Composition of essential oils from five aromatic species of Asteraceae. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.4, p.350-353, 2009.
- NIST. National Institute of Standards and Technology. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH). **Gaithersburg, USA**, v., n., p., 2008.
- NITURAD, C. E. et al. Rare GABRA3 variants are associated with epileptic seizures, encephalopathy and dysmorphic features. **Brain**, v.140, n.11, p.2879-2894, 2017.

NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.11, p.165-175, 2015.

OCHOA, J. G.; KILGO, W. A. The role of benzodiazepines in the treatment of epilepsy. **Current Treatment Options in Neurology**, v.18, n.4, p.1-11, 2016.

OGAWA, K. et al. Locomotor-reducing effects and structural characteristics of inhaled zerumbone and tetrahydrozerumbone derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, n.9, p.1559-1563, 2014.

OHASHI, M. A new isoxazole annelation; application to the synthesis of dehydrofukinone. **Chemical Communications**, n.15, p.893b-894, 1969.

OJHA, S. et al. beta-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular Cell Biochemistry**, v.418, n.1-2, p.59-70, 2016.

OLFSON, M. et al. Barriers to the treatment of social anxiety. **American Journal Psychiatry**, v.157, n.4, p.521-527, 2000.

OLIVEIRA, C. C. et al. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Behavior**, v.56, p.26-31, 2016.

OLIVEIRA DE MELO, J. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.11, p.2241-2245, 2006.

OLIVEIRA, J. S. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant property of *Ocimum basilicum* leaf essential oil. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v.8, p.195, 2009.

OLIVEIRA JUNIOR, R. G. et al. Neuropharmacological effects of essential oil from the leaves of *Croton conduplicatus* Kunth and possible mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v.221, p.65-76, 2018.

OLSEN, R. W.; TOBIN, A. J. Molecular biology of GABAA receptors. **FASEB Journal**, v.4, n.5, p.1469-1480, 1990.

ORENSTEIN, N. et al. A de novo GABRA2 missense mutation in severe early-onset epileptic encephalopathy with a choreiform movement disorder. **European Journal of Paediatric Neurology**, v.22, n.3, p.516-524, 2018.

ÖZMERT, S.; SEVER, F.; TIRYAKI, H. T. Evaluation of the effects of sedation administered via three different routes on the procedure, child and parent satisfaction during cystometry. **SpringerPlus**, v.5, n.1, p.1496, 2016.

PARDON, M. C. et al. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. **Neuroscience**, v.115, n.1, p.229-242, 2002.

PAVLOV, I.; WALKER, M. C. Tonic GABAA receptor-mediated signalling in temporal lobe epilepsy. *v.69*, p.55–61, 2013.

PAWLAK, C. R.; HO, Y. J.; SCHWARTING, R. K. Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. **Neuroscience & Biobehavior Reviews**, *v.32*, n.8, p.1544-1568, 2008.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, *v.14*, n.3, p.149-167, 1985.

PERRY, R. et al. Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. **Phytomedicine**, *v.19*, n.8-9, p.825-835, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, *v.29*, n.9, p.e45, 2001.

PHILLIPS, G. R. et al. The presynaptic particle web: Ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. **Neuron**, *v.32*, n.1, p.63-77, 2001.

PINHO-DA-SILVA, L. et al. trans-Caryophyllene, a natural sesquiterpene, causes tracheal smooth muscle relaxation through blockade of voltage-dependent Ca²⁺ channels. **Molecules**, *v.17*, n.10, p.11965-11977, 2012.

PITKANEN, A. et al. Epileptogenesis in experimental models. **Epilepsia**, *v.48* suppl 2, p.13-20, 2007.

PONOMARENKO, L. P. et al. Chemical constituents of *Ligularia alticola* Worosch. leaves and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, *v.15*, p.46-52, 2016.

POOTER, H. L.; BUYCK, L. F.; SCHAMP, N. M. The volatile fraction of *Senecio glaucus subsp. coronopifolius*. **Flavour and fragrance Journal**, *v.1*, p.159-163, 1986.

PRINCE, D. A. et al. Epilepsy following cortical injury: cellular and molecular mechanisms as targets for potential prophylaxis. **Epilepsia**, *v.50* suppl 2, p.30-40, 2009.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, *v.463*, n.1-3, p.3-33, 2003.

PUBCHEM. **National Center for Biotechnology Information**, 2016.

PULTRINI ADE, M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Science**, *v.78*, n.15, p.1720-1725, 2006.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; VAEZI, A. Evaluation of anxiolytic and sedative effect of essential oil and hydroalcoholic extract of *Ocimum basilicum* L. and chemical composition of its essential oil. **Research in Pharmaceutical Sciences**, *v.10*, n.6, p.535-543, 2015.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v.32, n.3, p.281-294, 1972.

RAJKUMAR, R. et al. Evaluation of anxiolytic potential of *Celastrus* oil in rat models of behaviour. **Fitoterapia**, v.78, n.2, p.120-124, 2007.

RAMOS, A. et al. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics**, v.33, n.6, p.657-668, 2003.

RAPAPORT, M. H. et al. Quality-of-life impairment in depressive and anxiety disorders. **American Journal of Psychiatry**, v.162, n.6, p.1171-1178, 2005.

RASOANAIVO, P. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Athanasia brownii* Hochr. (Asteraceae) endemic to Madagascar. **Chemistry and Biodiversity**, v.10, n.10, p.1876-1886, 2013.

RAVINDRAN, L. N.; STEIN, M. B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.71, n.7, p.839-854, 2010.

REHAVI, M.; SKOLNICK, P.; PAUL, S. M. Effects of tetrazole derivatives on [3H]diazepam binding in vitro: Correlation with convulsant potency. **European Journal of Pharmacology**, v.78, n.3, p.353-356, 1982.

RENAME. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. **Ministério da Saúde**, 2014.

RIBEIRO, A. B. et al. Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). **Eclética Química**, v.27, n.spe, p.35-44, 2002.

RIBEIRO, A. B. et al. A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.16, n.3B, p.526-530, 2005.

RICCOBONO, L. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Ballota hispanica* (L.) Benth. growing wild in Sicily. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v.150, n.5, p.1065-1071, 2016.

RISHTON, G. M. Natural Products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v.101, n.10 suppl., p.S43-S49, 2008.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. 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.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.3, p.289-304, 1997.

RODGERS, R. J. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, v.68, n.1-2, p.47-53, 1999.

RODRIGUES, P. et al. Antimicrobial activity of Selin-11-en-4 α -ol isolated from *Nectandra grandiflora* essential oil. **48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2016.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v.8, n.6, p.531-541, 2016.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, n.7, p.553-564, 2004.

ROGER N. WALSH; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v.83, n.3, p.482-504, 1976.

ROHWER, J. G. et al. Ecogeographical Differentiation in *Nectandra* (Lauraceae), and its historical implications. **Plant Biology**, v.106, n.1, p.88-99, 1992.

ROWLAND, M. Influence of route of administration on drug availability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.61, n.1, p.70-74, 1972.

ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: A review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.27, n.1, p.51-63, 2013.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, n.1, p.18-23, 2006.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v.10, n.9, p.685-697, 2011.

SAARI, T. I. et al. Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology. **Pharmacology Reviews**, v.63, n.1, p.243-267, 2011.

SALGADO, P. R. et al. Comparative anticonvulsant study of epoxycarvone stereoisomers. **Molecules**, v.20, n.11, p.19660-19673, 2015.

SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. **Pharmacol Biochem Behav**, v.52, n.4, p.701-706, 1995.

SASAKI, K. et al. Anticonvulsant activity of bilobalide, a sesquiterpene in *Ginkgo biloba* L. leaves, against chemical-induced and electroshock-induced convulsions in mice. **Research Communications in Biological Psychology and Psychiatry**, v.20, n.3-4, p.145-156, 1996.

SATOU, T. et al. Differences in the effects of essential oil from *Citrus junos* and (+)-limonene on emotional behavior in mice. **Journal of Essential Oil Research**, v.24, n.5, p.493-500, 2012.

SATOU, T.; OGAWA, Y.; KOIKE, K. Relationship between emotional behavior in mice and the concentration of (+)- α -santalol in the brain. **Phytotherapy Research**, v.29, n.8, p.1246-1250, 2015.

SATOU, T. et al. Anxiolytic-like effects of essential oil from *Thymus vulgaris* was increased during stress. **Flavour and Fragrance Journal**, v.33, n.2, p.191-195, 2018.

SAVAGE, K.; FIRTH, J. GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. v.32, n.1, p.3-18, 2018.

SAYYAH, M. et al. Antiepileptic potential and composition of the fruit essential oil of *Ferula gummosa* boiss. **Iranian Biomedical Journal**, v.5, p.69-72, 2001.

SAYYAH, M.; VALIZADEH, J.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. **Phytomedicine**, v.9, n.3, p.212-216, 2002.

SCHARFMAN, H. E.; BROOKS-KAYAL, A. R. Is plasticity of GABAergic mechanisms relevant to epileptogenesis? **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.813, p.133-150, 2014.

SCHENATO, R. A. et al. A practical and efficient preparation of (-)-(4a*S*,5*R*)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a,5-dimethyl-2(3*H*)-naphthalenone: a key intermediate in the synthesis of (-)-dehydrofukinone. **Tetrahedron Asymmetry**, v.12, n.4, p.579-584, 2001.

SCHIPPER, S. et al. Tonic GABA Receptors as potential target for the treatment of temporal lobe epilepsy. **Molecular Neurobiology**, v.53, p.5252–5265, 2015.

SCHOFIELD, P. R. et al. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. **Nature**, v.328, n.6127, p.221-227, 1987.

SCHUWALD, A. M. et al. Lavender oil-potent anxiolytic properties via modulating voltage dependent calcium channels. **Plos One**, v.8, n.4, p.e59998, 2013.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v.6, n.96, p. e52434, 2015.

SEO, Y. J. et al. Isocyperol, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced inflammatory responses via suppression of the NF- κ B and STAT3 pathways and ROS stress in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **International Immunopharmacology**, v.38, p.61-69, 2016.

SESTAKOVA, N. et al. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary Toxicology**, v.6, n.3, p.126-135, 2013.

SETZER, W. N. Essential oils and anxiolytic aromatherapy. **Natural Product Communications**, v.4, n.9, p.1305-1316, 2009.

SHANNON, M. et al. Safety and efficacy of flumazenil in the reversal of benzodiazepine-induced conscious sedation. **The Flumazenil Pediatric Study Group**. v.131, n.4, p.582-586, 1997.

SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, v.22, n.1, p. E70, 2017.

SHI, M. M. et al. Chinese medicines with sedative-hypnotic effects and their active components. **Sleep Medicine Reviews**, v.29, p.108-118, 2016.

SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, n.8, p.795-816, 2002.

SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, n.48, p.40224-40231, 2012.

Silva, D. T. **Caracterização química e atividades biológicas de extrativos obtidos de *Nectandra grandiflora* Nees E *Ocotea lancifolia* (Shott) Mez** Tese de doutorado, Engenharia Florestal. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil., p. 159, 2016.

SILVA, J. K. R. et al. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v.58, p.55-60, 2014.

SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.350–353, p.91–97, 2012.

SILVA, L. L. et al. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.46, n.9, p.771-779, 2013b.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v.11, n., p.443-451, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed, Porto Alegre, 2017.

SORENSEN, A. T.; KOKAIA, M. Novel approaches to epilepsy treatment. **Epilepsia**, v.54, n.1, p.1-10, 2012.

SORREGOTTI, T. et al. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behavior Brain Research**, v.246, p.76-85, 2013.

SOUSA, D. P.; OLIVEIRA, F. S.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of the central activity of hydroxydihydrocarvone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.4, p.811-812, 2006.

SOUSA, D. P. d. Anxiolytic Essential Oils. **Natural Products Chemistry & Research**, v.1, n., p.e102, 2013.

SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60, n.6, p.771-777, 2008.

SOUSA, P. J. C. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n.7, p.655-659, 2009.

SPEZIALI, M. G. From aromas and perfumes, the market of the "smell" industry. **Química Nova**, v.35, n.4, p.861-864, 2012.

SPURNY, R. et al. Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n.44, p. E3028-3034, 2012.

SQUIRES, R. S. et al. Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. **Life Sciences**, v.35, n.14, p.1439-1444, 1984.

STALEY, K. Molecular mechanisms of epilepsy. **Nature Neuroscience**, v.18, n.3, p.367-372, 2015.

STANFORD, S. C. The Open Field Test: reinventing the wheel. **Journal of Psychopharmacology**, v.21, n.2, p.134-135, 2007.

STEIN, D. J.; HOLLANDER, E.; ROTHBAUM, B. O. **Textbook of Anxiety Disorders**. American Psychiatric Publishing, Washington, DC, 2010.

STEIN, M. B.; STECKLER, T. Behavioral neurobiology of anxiety and its treatment. **Current Topics in Behavior Neuroscience**, v.2, 546 p., 2010.

STEINLEIN, O. K. Calcium signaling and epilepsy. **Cell Tissue Research**, v.357, n.2, p.385-393, 2014.

SWAMY, M. K.; SINNIHA, U. R. Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Botany, agrotechnology and biotechnological aspects. **Industrial Crops and Products**, v.87, p.161-176, 2016.

TAKAKI, I. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.4, 2008.

TAKEMOTO, H.; YAGURA, T.; ITO, M. Evaluation of volatile components from spikenard: valerena-4,7(11)-diene is a highly active sedative compound. **Journal of Natural Medicine**, v.63, n.4, p.380-385, 2009.

TAKEMOTO, H. et al. Inhalation administration of valerena-4,7(11)-diene from *Nardostachys chinensis* roots ameliorates restraint stress-induced changes in murine behavior and stress-related factors. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, n.6, p.1050-1055, 2014.

TAKEMOTO, H. et al. Inhalation administration of the sesquiterpenoid aristolen-1(10)-en-9-ol from *Nardostachys chinensis* has a sedative effect via the GABAergic system. **Planta Medica**, v.81, n.5, p.343-347, 2015.

TANAKA, S. et al. Four factors underlying mouse behavior in an open field. **Behavioural Brain Research**, v.233, n.1, p.10.1016/j.bbr.2012.1004.1045, 2012.

TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. A validation of the new definition of drug-resistant epilepsy by the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v.55, n.6, p.829-834, 2014.

TIAN, J. et al. Anxiolytic-like effects of α -asarone in a mouse model of chronic pain. **Metabolic Brain Disease**, v.32, n.6, p.2119-2129, 2017.

TOMŠÍK, P. et al. Boldine inhibits mouse mammary carcinoma in vivo and human MCF-7 breast cancer cells *in vitro*. **Planta Medica**, v., n., p., 2016.

TONDOLO, J. S. M. et al. Anesthesia and transport of fat snook centropomus parallelus with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.3, p.667-674, 2013.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v., n., p.1-14, 2013.

TOWLE, A. C.; SZE, P. Y. Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.18, n.2, p.135-143, 1982.

TRIPATHI, S. J. et al. Basolateral amygdalar inactivation blocks chronic stress-induced lamina-specific reduction in prefrontal cortex volume and associated anxiety-like behavior. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.88, n., p.194-207, 2019.

TRITSCH, N. X.; GRANGER, A. J.; SABATINI, B. L. Mechanisms and functions of GABA co-release. **Nature Reviews Neuroscience**, v.17, n.3, p.139-145, 2016.

TRUITI, M. C. et al. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.12, p.1873-1878, 2005.

TRUONG, V.-L. et al. Quercitrin from *Toona sinensis* (Juss.) M.Roem. attenuates acetaminophen-induced acute liver toxicity in Hepg2 cells and mice through induction of antioxidant machinery and inhibition of inflammation. **Nutrients**, v.8, n.7, p.431, 2016.

TURINA, A. d. V. et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, n.2, p.101-113, 2006.

ULLAH, I. et al. Thymoquinone and vitamin C attenuates pentylenetetrazole-induced seizures via activation of GABAB1 receptor in adult rats cortex and hippocampus. **NeuroMolecular Medicine**, v.17, n.1, p.35-46, 2015.

UMEZU, T. Behavioral effects of plant-derived essential oils in the Geller type conflict test in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.83, n.2, p.150-153, 2000.

UMEZU, T. et al. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.85, n.4, p.713-721, 2006.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.83, n., p.409-418, 1996.

VERHAGE, M. et al. Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. **Neuron**, v.6, n.4, p.517-524, 1991.

VEZZANI, A. et al. Infections, inflammation and epilepsy. **Acta Neuropathology**, v.131, n.2, p.211-234, 2016.

VIANA, M. D. M. et al. Anxiolytic-like effect of *Citrus limon* (L.) Burm f. essential oil inhalation on mice. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.96-104, 2016.

VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; DESCHAMPS, C. Genetic resources of aromatic plants from Brazil. **Israel Journal of Plant Sciences**, v.58, n.3-4, p.263-271, 2010.

VINKERS, C. H.; OLIVIER, B. Mechanisms underlying tolerance after long-term benzodiazepine use: a future for subtype-selective GABA(A) receptor modulators? **Advances in Pharmacological Sciences**, v.2012, n., p.416864, 2012.

WAHAB, A. et al. Anticonvulsant activities of nutmeg oil of *Myristica fragrans*. **Phytotherapy Research**, v.23, n.2, p.153-158, 2009.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v.2, n.2, p.322-328, 2007.

WALTERS, R. J. et al. Benzodiazepines act on GABA(A) receptors via two distinct and separable mechanisms. **Nature Neuroscience**, v.3, n.12, p.1274-1281, 2000.

WANG, Z. J.; HEINBOCKEL, T. Essential oils and their constituents targeting the GABAergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. **Molecules**, v.23, n.5, p. E1061, 2018.

WATT, E. E. et al. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA_A receptor with the intravenous agent, propofol. **European Journal of Pharmacology**, v.590, n.1-3, p.120-126, 2008.

WEI, F. et al. Ion channel genes and epilepsy: functional alteration, pathogenic potential, and mechanism of epilepsy. **Neuroscience Bulletin**, v.33, n.4, p.455-477, 2017.

WHITE, H. S. et al. The early identification of anticonvulsant activity: role of the maximal electroshock and subcutaneous pentylenetetrazol seizure models. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v.16, n.1-2, p.73-77, 1995.

WHITTAKER, V. P. The isolation and characterization of acetylcholine-containing particles from brain. **Biochemistry Journal**, v.72, n., p.694-706, 1959.

WHITTAKER, V. P. Thirty years of synaptosome research. **Journal of Neurocytology**, v.22, n.9, p.735-742, 1993.

WITTCHEN, H. U.; JACOBI, F. Size and burden of mental disorders in Europe: a critical review and appraisal of 27 studies. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, n.4, p.357-376, 2005.

WU, J. et al. A caryophyllane-type sesquiterpene, caryophyllenol A from *Valeriana amurensis*. **Fitoterapia**, v.96, n., p.18-24, 2014.

WU, J. K.; HUO, J. H.; DU, X. W. Pharmacological effects of volatile oil of *Valeriana amurensis* on CNS. **Zhong Yao Cai**, v.30, n.8, p.977-980, 2007.

YANG, D. et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v.148, n.2, p.79-82, 1999.

YANOVSKY, Y. et al. GABA_A receptors involved in sleep and anaesthesia: β 1- versus β 3-containing assemblies. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.463, n.1, p.187-199, 2012.

YOU, J. H. et al. Bergamot essential oil differentially modulates intracellular Ca²⁺ levels in vascular endothelial and smooth muscle cells: a new finding seen with fura-2. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.61, n.4, p.324-328, 2013.

ZAMPONI, G. W. et al. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacology Reviews**, v.67, n.4, p.821-870, 2015.

ZDERO, C. et al. Co-occurrence of pyrrolizidine alkaloids and acylpyrrols in *Senecio magnificus* and constituents of other australian *Senecio* species. **Phytochemistry**, v.29, n.2, p.509-511, 1990.

ZHANG, K.; YAO, L. The anxiolytic effect of *Juniperus virginiana* L. essential oil and determination of its active constituents. **Physiology and Behavior**, v.189, n., p.50-58, 2018.

ZHANG, N. et al. *Cananga odorata* essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.219, n., p.23-30, 2018.

ZHANG, W. H. et al. δ Subunit-containing GABA_A receptor prevents overgeneralization of fear in adult mice. **Learning and Memory**, v.24, n.8, p.381-384, 2017.

ZHANG, X. B. et al. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. **Plos One**, v.3, n.10, p., 2008.

ZHAO, Z. Y. et al. A comparison of midazolam, lorazepam, and diazepam for the treatment of status epilepticus in children: a network meta-analysis. **Journal of Child Neurology**, v.31, n.9, p.1093-1107, 2016.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Essential oils from three *Myrcia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, n.5, p.421-424, 2003.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.39, n.4-6, p.660-665, 2011.