UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MAIARA SMANIOTTO DE MEDEIROS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGA) NO MODELO ANIMAL PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

PONTA GROSSA
2026

MAIARA SMANIOTTO DE MEDEIROS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGA) NO MODELO ANIMAL PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro
Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

PONTA GROSSA
2026

Medeiros, Maiara Smaniotto de
M488 Avaliação do potencial ansiolílitico do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) no modelo animal peixe-zebra (*Danio rerio*) / Maiara Smaniotto de Medeiros. Ponta Grossa, 2026.
60 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro.
Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.

1. Teste claro-escuro. 2. Transtornos de ansiedade. 3. Fitoterapia. I. Ferro, Marcelo Machado. II. Miyoshi, Edmar. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. IV.T.

CDD: 616

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia Fernandes Bertholino dos Santos- CRB9/986

MAIARA SMANIOTTO DE MEDEIROS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGA) NO MODELO ANIMAL PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Fisiologia e Fisiopatologia.

Ponta Grossa, 28 de Agosto de 2026.

gov.br
Documento assinado digitalmente
MARCELO MACHADO FERRO
Data: 26/10/2026 16:17:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro – Orientador
Doutor em Ciências – Bioquímica
Universidade Estadual de Ponta Grossa

gov.br
Documento assinado digitalmente
CARLA CRISTINE KANUNFRE
Data: 26/10/2026 11:02:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre
Doutora em Ciências – Fisiologia Humana
Universidade Estadual de Ponta Grossa

gov.br
Documento assinado digitalmente
JULIANE NADAL DIAS SWIECH
Data: 26/10/2026 14:18:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Juliane Nadal Dias Swiech
Doutora em Ciências Farmacêuticas
UNICESUMAR

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, ao meu irmão e ao meu noivo. Dedico em especial à minha avó Leoni (*in memoriam*) que não vivenciou comigo essa etapa, mas sempre me apoiou nos meus sonhos e projetos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua presença constante em minha vida, por me conceder força, sabedoria e serenidade para enfrentar os desafios encontrados ao longo desta trajetória.

Aos meus pais, Márcia e Josoel, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, pelo incentivo permanente e por sempre acreditarem nos meus sonhos. Tudo o que conquistei até aqui também é resultado dos valores que me transmitiram.

Aos meus avós, Adão e Lindair, pelo carinho, pela presença constante e por todo o apoio oferecido ao longo da minha caminhada.

Aos meus avós, Leoni e Francisco, que deixaram saudades, mas permanecem vivos em minhas lembranças e na pessoa que me tornei. Seu amor e seus ensinamentos continuam me acompanhando todos os dias.

Ao meu irmão, Juliano, por estar ao meu lado, compartilhando experiências e incentivando meu crescimento.

Ao meu noivo, Luiz Guilherme, pelo companheirismo, pela paciência e pelo apoio durante todos os momentos desta jornada. Sua presença tornou os desafios mais leves e as conquistas ainda mais especiais. Obrigada por caminhar ao meu lado e acreditar em mim.

Aos meus orientadores, Dr. Marcelo Machado Ferro e Dr. Edmar Miyoshi, pela orientação dedicada e pelos conhecimentos compartilhados ao longo deste período. A contribuição de vocês foi fundamental para a concretização desta pesquisa.

À professora Dra. Cássia Gonçalves Magalhães e aos integrantes de seu grupo de pesquisa, pela parceria e pela oportunidade de aprendizado proporcionada durante as atividades desenvolvidas em seu laboratório.

Aos professores Dr. Leandro Cavalcante Lipinski e Dra. Carla Cristine Kanunfre, pelas importantes contribuições durante a banca de qualificação, cujas sugestões enriqueceram significativamente este trabalho.

Aos colegas da pós-graduação e aos alunos de iniciação científica, pela convivência, pelas trocas de conhecimento, pelo incentivo e pelos momentos compartilhados ao longo desta trajetória acadêmica. Cada contribuição teve grande importância para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho, deixo meu sincero agradecimento.

RESUMO

Extratos de *Eugenia uniflora* (pitanga) são amplamente usados na medicina tradicional para tratar hipertensão, febre, gripe e cólicas. Estudos em camundongos já demonstraram efeitos antidepressivos de extratos de seus frutos. Diante das limitações dos tratamentos convencionais para transtornos de ansiedade, como efeitos colaterais e variação na eficácia, cresce o interesse por estratégias terapêuticas baseadas em produtos vegetais. Assim, este estudo avaliou as propriedades ansiolíticas do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* utilizando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo experimental, com um n=12 de animais por grupo. O extrato aquoso e o óleo essencial foram obtidos a partir de folhas colhidas no câmpus da UEPG durante o mês de agosto de 2024. Os animais foram submersos em recipientes com água de aquário contendo diferentes concentrações do extrato aquoso (1 e 5 g/L) ou do óleo essencial (5, 10 e 15 mg/L), solução de Tween 80 (controle veículo), além dos controles positivos clonazepam e fluoxetina, e então submetidos ao teste claro-escuro. Na primeira etapa, o óleo essencial das folhas causou aumento no tempo de permanência no lado claro, sugerindo potencial ansiolítico. Por outro lado, o extrato aquoso não alterou o comportamento dos peixes no teste. Na segunda etapa, foram utilizados os antagonistas farmacológicos flumazenil, granisetrona e pizotifeno para investigar o possível envolvimento dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico. Entretanto, o efeito observado do óleo essencial na primeira etapa não foi reproduzido, impossibilitando a investigação da participação dessas vias e da reprodutibilidade do efeito ansiolítico nas condições experimentais empregadas. Dessa forma, é necessário novos estudos para confirmar esse efeito e esclarecer os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Teste claro-escuro; Transtornos de ansiedade; Fitoterapia.

ABSTRACT

Extracts of *Eugenia uniflora* (pitanga) are widely used in traditional medicine to treat hypertension, fever, flu, and cramps. Studies in mice have demonstrated antidepressant effects of extracts obtained from its fruits. Given the limitations of conventional treatments for anxiety disorders, such as adverse effects and variability in efficacy, there is growing interest in therapeutic strategies based on plant-derived products. Thus, this study evaluated the anxiolytic properties of the aqueous extract and essential oil from the leaves of *E. uniflora* using zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model, with n = 12 animals per group. The aqueous extract and essential oil were obtained from leaves collected at the UEPG campus in August 2024. The animals were immersed in aquarium water containing different concentrations of the aqueous extract (1 and 5 g/L) or essential oil (5, 10 and 15 mg/L), Tween 80 solution (vehicle control), along with the positive controls clonazepam and fluoxetine, and were subsequently subjected to the light-dark test. In the first stage, the essential oil from the leaves increased the time spent in the light compartment, suggesting anxiolytic potential. In contrast, the aqueous extract did not alter the fish behavior in the test. In the second stage, the pharmacological antagonists flumazenil, granisetron, and pizotifen were used to investigate the possible involvement of GABAergic and serotonergic systems. However, the effect of the essential oil observed in the first stage was not reproduced, precluding the investigation of the involvement of these pathways and the reproducibility of the anxiolytic effect under the experimental conditions employed. Therefore, further studies are needed to confirm this effect and elucidate the underlying mechanisms.

Keywords: Light-dark test; Anxiety disorders; Phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema de hidrodestilação por aparelho de Clevenger utilizado para extração do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*..... 26
Figura 2 – Óleo essencial de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação 27
Figura 3 – Filtração do extrato aquoso de folhas de *E. uniflora* em sistema de filtração a vácuo 28
Figura 4 – Aquário utilizado para manutenção dos peixes-zebra durante o experimento 29
Figura 5 – Fluxograma representativo das etapas experimentais da triagem farmacológica (Etapa 1) 35
Figura 6 – Fluxograma representativo das etapas experimentais da investigação do mecanismo de ação (Etapa 2) 36
Figura 7 – Aparato utilizado no teste claro-escuro para avaliação do comportamento tipo ansioso em zebrafish adulto 37
Figura 8 – Aparato utilizado para realização do teste claro-escuro em peixes-zebra ..... .37
Figura 9 - Tempo de permanência no compartimento claro dos peixes-zebra tratados com extrato aquoso de *E. uniflora*. 41
Figura 10 - Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro em peixes-zebra tratados com extrato aquoso de *E. uniflora*. 42
Figura 11 - Número de cruzamentos entre compartimentos no teste claro-escuro em peixes-zebra tratados com extrato aquoso de *E. uniflora*. 43
Figura 12 - Tempo de permanência no compartimento claro dos peixes-zebra tratados com óleo essencial de *E. uniflora*. 44
Figura 13 - Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro em peixes-zebra tratados com óleo essencial de *E. uniflora*. 45
Figura 14 - Número de cruzamentos entre compartimentos no teste claro-escuro em peixes-zebra tratados com óleo essencial de *E. uniflora*. 46
Figura 15 - Tempo de permanência no compartimento claro dos peixes-zebra submetidos aos tratamentos utilizados na investigação do mecanismo de ação do óleo essencial de *E. uniflora*. 47
Figura 16 - Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro em peixes-zebra submetidos aos tratamentos utilizados na investigação do óleo essencial

de *E. uniflora*. 48
Figura 17 - Número de cruzamentos entre compartimentos no teste claro-escuro em peixes-zebra submetidos aos tratamentos utilizados na investigação do mecanismo de ação do óleo essencial de *E. uniflora*. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos extratos de *E. uniflora*.....52
Tabela 2 - Caracterização dos óleos essenciais *E. uniflora*.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLON	Clonazepam
FLUM	Flumazenil
FLUO	Fluoxetina
GRANIS	Granisetrona
OMS	Organização Mundial da Saúde
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
IRSN	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
SNC	Sistema Nervoso Central
NE	Noradrenalina
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu	Glutamato
IL-1β	Interleucina-1 beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IL-6	Interleucina-6
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
AchE	Acetilcolinesterase
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
DEQUIM	Departamento de Química (UEPG)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
SEI	Sistema Eletrônico de Informações
EPM	Erro Padrão da Média
HKW	Teste H de Kruskal–Wallis
ANOVA	Análise de Variância
OE	Óleo Essencial
EA	Extrato Aquoso
NO	Óxido Nítrico
Ca^{2+}	Íon Cálcio
NMDA	N-metil-D-aspartato (receptor)
PIZOT	Pizotifeno

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

mg/L	Miligrama por litro
g/L	Grama por litro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
ºC	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 OBJETIVOS 16
2.1 OBJETIVO GERAL 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
3 REVISÃO DE LITERATURA 17
3.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E BASES NEUROBIOLÓGICAS 17
3.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS.....19
3.3 *Eugenia uniflora* E ATIVIDADES NEUROFARMACOLÓGICAS.....20
3.4 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO DE ANSIEDADE.....21
3.5 TESTE CLARO-ESCURO E INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO.....22
4 MATERIAL E MÉTODOS 25
4.1 COLETA DO MATERIAL E EXTRAÇÃO 25
4.1.1 Coleta do material 25
4.1.2 Extração 25
4.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS 28
4.2.1 Espécie e origem 28
4.2.2 Condições de manutenção.....29
4.3 ETAPAS EXPERIMENTAIS 30
4.3.1 Etapa 1 – caracterização do efeito ansiolítico 30
4.3.2 Etapa 2 – avaliação do mecanismo de ação 30
4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES 31
4.4.1 Clonazepam 31
4.4.2 Fluoxetina 31
4.4.3 Tween 80 (controle veículo) 31
4.4.4 Óleo essencial 32
4.4.5 Extrato aquoso 32
4.4.6 Flumazenil 32
4.4.7 Granisetrona 32
4.4.8 Pizotifeno 33
4.5 TESTES 33
4.5.1 Procedimento experimental.....33

4.5.2 Parâmetros comportamentais 37
4.6 EUTANÁSIA 33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
5.1 EXTRATO AQUOSO DE *E. uniflora*..... 40
5.1.1 Tempo de permanência no lado claro..... 40
5.1.2 Tempo de latência para entrada no compartimento escuro..... 41
5.1.3 Número de cruzamentos entre compartimentos..... 42
5.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *E. uniflora* 43
5.2.1 Tempo de permanência no lado claro..... 43
5.2.2 Tempo de latência para entrada no compartimento escuro..... 44
5.2.3 Número de cruzamentos entre compartimentos..... 45
5.3 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO 46
5.3.1 Tempo de permanência no lado claro..... 46
5.3.2 Tempo de latência para entrada no compartimento escuro..... 48
5.3.3 Número de cruzamentos entre compartimentos..... 49
6 CONCLUSÃO 55
REFERÊNCIAS..... 56

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade pode ser caracterizada por sensações de incerteza, apreensão e medo e está associada à antecipação de uma ameaça futura. Embora respostas de ansiedade sejam fisiológicas diante de situações de ameaça, sua persistência ou intensidade desproporcional pode caracterizar um transtorno de ansiedade. Os transtornos de ansiedade podem ser classificados como ansiedade generalizada, síndrome do pânico, estresse pós-traumático, fobias, transtorno obsessivo compulsivo, entre outros. Esses transtornos ocorrem com frequência e as manifestações clínicas são principalmente tontura, falta de ar, dor no peito e palpitações (Wolgensinger, 2015; Cohen; Cukor; Kimmel, 2016; Dean, 2016; Goyatá *et al*., 2016; Zhao *et al*., 2023).

Os transtornos de ansiedade provocam impactos significativos na vida dos indivíduos e de seus familiares, sendo um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, quase um bilhão de pessoas no mundo apresentavam algum tipo de transtorno mental. Em 2020, no primeiro ano da pandemia de COVID-19, a depressão e a ansiedade foram os transtornos mais prevalentes, aumentando a sua prevalência em cerca de 25%. Observa-se, ainda, que a prevalência desses distúrbios é aproximadamente duas vezes maior em mulheres do que em homens (Craske; Stein, 2016; Lelis *et al*., 2020; OMS, 2022).

Os tratamentos mais utilizados para ansiedade são os farmacológicos e psicoterápicos. A terapia farmacológica da ansiedade inclui inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase e buspirona, que atuam sobre a serotonina e noradrenalina. Além de pregabalina e os benzodiazepínicos, que agem no neurotransmissor GABA (Goyatá *et al*., 2016; Kenda *et al*., 2022).

Os pacientes, muitas vezes, não aderem ao tratamento com esses medicamentos, pois eles podem causar efeitos colaterais indesejados ou apresentam atraso na eficácia, o que torna o tratamento mais desafiador. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas formas de tratamento, ou de fármacos adjuvantes dos tratamentos convencionais. Nesse raciocínio, explorar os efeitos comportamentais de produtos naturais derivados de plantas funciona como uma

alternativa terapêutica para esses transtornos (Flores *et al*., 2020; Hacke *et al*., 2020; Kenda *et al*., 2022).

A *Eugenia uniflora* (família Myrtaceae), popularmente chamada de pitanga ou pitanga-vermelha, é utilizada na medicina tradicional para tratar a hipertensão, como diurético, bem como tratar gripe, tosse, doenças cardiovasculares, asma, sinusite, cólicas, diarreia, febre e reumatismo. Estudos com extratos de suas folhas mostraram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. O óleo essencial extraído das folhas dessa espécie também já foi estudado e apresentou possível efeito antidepressivo em camundongos e ratos (Oliveira *et al*., 2017; Da Costa *et al*., 2020; Flores *et al*., 2020; Sobeh *et al*., 2020; Franzolin *et al*., 2022).

O peixe-zebra (*Danio rerio*), modelo animal utilizado em nosso trabalho, é amplamente utilizado como modelo experimental em pesquisas biomédicas devido à sua relevância translacional e versatilidade. Por apresentar sistemas neurotransmissores conservados e respostas comportamentais passíveis de avaliação experimental, esse vertebrado tem se mostrado adequado para o estudo de mecanismos biológicos e distúrbios neurológicos, incluindo os relacionados à ansiedade. Além disso, apresenta baixo custo de manutenção, fácil manejo e alta taxa reprodutiva, características que reforçam sua aplicabilidade em pesquisas neurocomportamentais e farmacológicas (Lakshmanagowda *et al*., 2024).

Além disso, o peixe-zebra constitui um modelo amplamente empregado para avaliar as propriedades ansiolíticas de compostos presentes em extratos vegetais. No teste de preferência claro-escuro, o aumento da exploração ou do tempo de permanência no compartimento claro, na ausência de alterações locomotoras que comprometam a interpretação, pode ser considerado indicativo de efeito ansiolítico (Hacke *et al*., 2020).

Apesar das atividades biológicas já descritas para *E. uniflora*, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antidepressivos, são escassas as evidências acerca de seu potencial ansiolítico, particularmente em modelos experimentais utilizando peixe-zebra. Nesse contexto, o presente estudo investigou os efeitos do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* sobre respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em *Danio rerio*, bem como a possível participação dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico nos efeitos observados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial ansiolítico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* em peixes-zebra (*Danio rerio*), bem como a possível participação dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico nos efeitos observados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do extrato aquoso e do óleo essencial de *E. uniflora* sobre comportamentos relacionados à ansiedade em peixes-zebra, utilizando o teste comportamental de preferência claro-escuro;
- Comparar os efeitos do extrato aquoso e do óleo essencial com os controles positivo e negativo;
- Investigar a possível participação do sistema GABAérgico no efeito comportamental do extrato aquoso e/ou do óleo essencial, por meio da utilização de antagonista farmacológico;
- Investigar a possível participação do sistema serotoninérgico no efeito comportamental do extrato aquoso e/ou do óleo essencial, por meio da utilização de antagonistas de diferentes receptores serotoninérgicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E BASES NEUROBIOLÓGICAS

Os transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionadas. Medo é a resposta emocional à ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura. Os transtornos de ansiedade se diferenciam do medo ou da ansiedade adaptativos por serem excessivos ou persistirem além de períodos apropriados ao nível de desenvolvimento. Como os indivíduos com transtornos de ansiedade em geral superestimam o perigo nas situações que temem ou evitam, a determinação primária do quanto o medo ou a ansiedade são excessivos ou fora de proporção é feita pelo clínico, levando em conta fatores contextuais culturais (DSM-5, 2014).

Os transtornos de ansiedade podem ser definidos como transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico, agorafobia e transtorno de ansiedade generalizada, constituem condições psiquiátricas comuns e potencialmente incapacitantes. Esses distúrbios tendem a se manifestar desde a infância até o início da vida adulta e diferem das respostas ansiosas transitórias, típicas do desenvolvimento ou desencadeadas por situações de estresse, por serem desproporcionais à ameaça real, persistirem ao longo do tempo e comprometerem o funcionamento cotidiano (Craske; Stein, 2016).

Os transtornos de ansiedade apresentam alta prevalência em escala global, com estimativas que variam entre 3,8% e 25% da população mundial, podendo alcançar até 70% entre indivíduos com doenças crônicas. Essas condições exercem impacto significativo sobre o funcionamento diário, a qualidade de vida e o bem-estar psicológico dos pacientes. De acordo com a OMS, em 2025, mais de 1 bilhão de pessoas vivem com transtornos mentais, a ansiedade e a depressão são as condições mais prevalentes (Kandola *et al*., 2018; ONU, 2025).

Além disso, pessoas com transtorno de ansiedade podem apresentar comorbidades como doenças cardiovasculares, diabetes, desordem da tireoide e distúrbios gastrointestinais juntamente com outros transtornos mentais. Acredita-se que a ocorrência do transtorno de ansiedade está associada a disfunção em sistemas

de neurotransmissores, disfunção neuroendócrina e ativação imunoinflamatória (Zhao *et al*., 2023).

Grande parte dos estudos descreve a deficiência na sinapse de dois neurotransmissores monoaminérgicos no sistema nervoso central (SNC) como principais causas dos sintomas do transtorno de ansiedade. A noradrenalina (NE) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT), também conhecida como serotonina. Essas monoaminas desempenham várias funções, entre elas o impacto no humor, emoções, comportamento e influenciam ciclos de sono. Além disso, acredita-se também que a ansiedade possa ser causada por um desequilíbrio entre o transmissor inibitório ácido γ-aminobutírico (GABA) e o transmissor excitatório glutamato (Glu) no cérebro (Diniz; Neves; Vieira, 2020; Zhao *et al*., 2023).

Além da relação com os neurotransmissores, pessoas que sofrem com transtorno de ansiedade podem apresentar aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1β (IL-1β), fator de necrose tumoral (TNF) e IL-6, tanto no sangue quanto no cérebro. Já foi demonstrado, por meio de estudos clínicos, que pacientes com transtornos psiquiátricos apresentam marcadores de ativação imunológica no sangue, como aumento de granulócitos, monócitos, TNF e IL-6. Ocorre também a desregulação das células mieloides periféricas e da micróglia no cérebro. Durante as respostas inflamatórias no cérebro, essas citocinas pró-inflamatórias podem estimular o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o que leva a níveis elevados de cortisol, colaborando com os transtornos (Wohleb *et al*., 2016; ZHAO *et al*., 2023).

O cortisol é um forte imunossupressor e anti-inflamatório, que realiza retroalimentação negativa na hipófise e no hipotálamo. Porém, na ansiedade, o mecanismo de retroalimentação negativa é perturbado e isso resulta em uma ativação contínua do eixo HPA, aumentando a concentração plasmática e o efeito sistêmico dos glicocorticoides (Bruder-Nascimento *et al*., 2015; Zhao *et al*., 2023).

O estresse inflamatório e o cortisol inibem a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Esta proteína promove o crescimento, desenvolvimento e plasticidade adequados das sinapses que usam glutamato e GABA como neurotransmissores, e também influencia a neurotransmissão de serotonina e dopamina através da regulação da diferenciação neuronal. Pesquisas demonstram que os níveis plasmáticos de BDNF em pacientes com transtorno de ansiedade generalizada são significativamente mais baixos em comparação com os do grupo

controle e os déficits na sinalização do BDNF contribuem para a patogênese desse transtorno (Colucci-D'Amato; Speranza; Volpicelli, 2020; Zhao *et al*., 2023).

3.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS

A terapia farmacológica da ansiedade inclui os ISRS, IRSN, antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase e buspirona, que atuam sobre a serotonina e noradrenalina, já pregabalina e os benzodiazepínicos agem no neurotransmissor GABA (Goyatá *et al*., 2016; Kenda *et al*., 2022). Segundo dados da OMS, no Brasil são consumidos anualmente cerca de 500 milhões de psicotrópicos. Deste total, aproximadamente 70% correspondem aos ansiolíticos, em sua maioria benzodiazepínicos (Silva; Silva; Guedes, 2022).

O mecanismo de ação dos ISRS é bloquear os transportadores de serotonina nas membranas pré-sinápticas, impedindo a recaptação da serotonina. As células nervosas geralmente reutilizam a serotonina através da recaptação, isso controla o tempo que a substância fica disponível para exercer seus efeitos. No caso dos pacientes deprimidos, entende-se que a eficiência da sinapse serotoninérgica está baixa, e a mensagem não é transmitida adequadamente aos receptores. O bloqueio da recaptação mantém a serotonina mais tempo na fenda sináptica, aumentando a efetividade da neurotransmissão serotoninérgica. Isso resulta em mais serotonina livre para transmitir mensagens às células nervosas seguintes. Alguns exemplos de ISRS são Escitalopram, Paroxetina, Sertralina, Citalopram, Fluoxetina e Fluvoxamina (Gonçalves *et al*., 2019; Azizi *et al*., 2022).

Alguns exemplos de IRSN são Venlafaxina, Desvenlafaxina e Duloxetina. Esses medicamentos se ligam aos transportadores 5-HT e NE com níveis variados de potência e taxas de afinidade de ligação. A potência da inibição de recaptação de serotonina é algo superior à de recaptação de noradrenalina, ocorrendo em doses inferiores. A venlafaxina e o ODV não apresentam afinidade por receptores adrenérgicos alfa-1, receptores muscarínicos ou histamínicos e também não inibem a monoamino-oxidase. Alteram a sensibilidade de receptores beta-adrenérgicos após dose única, diferente de outros antidepressivos que levam à dessensibilização desses receptores após doses repetidas (Moreno; Soares, 1999).

Embora os antidepressivos sejam tratamentos eficazes em alguns pacientes, aproximadamente 75% dos pacientes apresentam efeitos adversos. Esses efeitos

adversos são diversos e podem prejudicar a qualidade de vida e o funcionamento, contribuem para as taxas de morbidade e mortalidade, criam estigma, e resultam em baixa adesão ao tratamento e, portanto, aumento do risco de recaída de doenças psiquiátricas. Os efeitos mais comuns relatados por pacientes são efeitos gastrointestinais, ganho de peso, sedação, hipotensão ortostática e disfunção sexual (Pillinger *et al*., 2023).

Já os benzodiazepínicos possuem propriedades ansiolíticas, sedativas, hipnóticas, relaxante muscular e anticonvulsivantes, sendo amplamente prescritos para insônia e transtornos de ansiedade. Embora eficazes em tratamentos de curto prazo, seu uso prolongado, acima de 40 dias, aumenta significativamente o risco de tolerância, abstinência e dependência (Silva; Silva; Guedes, 2022).

O mecanismo de ação dos benzodiazepínicos decorre principalmente da intensificação da ação do (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Os benzodiazepínicos atuam como moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA, aumentando a frequência de abertura dos canais de cloreto na presença de GABA e potencializando a neurotransmissão inibitória, promovendo a hiperpolarização das células nervosas e diminuindo sua excitabilidade. Como consequência, produzem os efeitos psicotrópicos típicos da classe, podendo ainda impactar funções cognitivas (Silva; Silva; Guedes, 2022).

Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas formas de tratamento, ou de fármacos adjuvantes dos tratamentos convencionais. Historicamente, os produtos naturais desempenharam um papel fundamental na descoberta de medicamentos, especialmente para câncer e doenças infecciosas, mas também em outras áreas terapêuticas. Explorar os efeitos comportamentais de produtos naturais derivados de plantas funciona como uma alternativa terapêutica para esses transtornos (Flores *et al*., 2020; Hacke *et al*., 2020; Kenda *et al*., 2022; Atanasov *et al*., 2023).

3.3 *Eugenia uniflora* E ATIVIDADES NEUROFARMACOLÓGICAS

A *E. uniflora* (família Myrtaceae), popularmente chamada de pitangueira, pitanga ou pitanga-vermelha, é amplamente distribuída na América do Sul e apresenta uma alta concentração de compostos fenólicos, como flavonoides, taninos, terpenos, antraquinonas, antocianinas, carotenoides e óleos essenciais. Estudos com seus

extratos de folhas mostraram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, os compostos fenólicos podem diminuir o estresse oxidativo e podem atuar no sistema colinérgico regulando a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Essa espécie é utilizada na medicina tradicional para tratar a hipertensão, como diurético, bem como tratar gripe, tosse, doenças cardiovasculares, asma, sinusite, cólicas, diarreia, febre e reumatismo. O óleo essencial extraído das folhas dessa espécie também apresentou efeito antidepressivo em camundongos (Oliveira *et al*., 2017; Da Costa *et al*., 2020; Flores *et al*., 2020; Sobeh *et al*., 2020; Franzolin *et al*., 2022).

Segundo Schaffka (2023), que estudou a composição de exemplares das folhas de *E. uniflora* presentes no câmpus UEPG, o óleo essencial das folhas é constituído principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, enquanto os extratos apresentam elevada concentração de compostos fenólicos, destacando-se ácido gálico e flavonoides derivados de miricetina, quercetina e kaempferol, os quais têm sido associados às atividades biológicas atribuídas à espécie.

Segundo um estudo de Victoria *et al*. (2013), o óleo essencial extraído das folhas dessa espécie (1-50 mg/kg, por via oral) apresentou efeito antidepressivo em camundongos. Esse efeito foi demonstrado pela redução do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, que é uma situação inescapável, efeito semelhante ao da fluoxetina (32 mg/kg, por via oral) como controle positivo.

Já segundo o estudo de Oliveira *et al*. (2017), ratos com dieta altamente palatável aumentaram o tempo de imobilidade no teste de natação forçada, indicando um estado semelhante à depressão, mas o tratamento com extrato da fruta da *E. uniflora* (200 mg/kg/dia, via oral) impediu esse aumento, sugerindo um efeito semelhante ao antidepressivo.

O estudo de Savall *et al*. (2025) demonstrou que o extrato hidroalcoólico do fruto de *E. uniflora* exerce efeito neuroprotetor e, sobretudo, previne comportamentos depressivos e anedônicos em ratas submetidas ao modelo experimental de doença de Parkinson induzido.

3.4 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO DE ANSIEDADE

O modelo animal zebrafish ou peixe-zebra (*Danio rerio*), é um modelo emergente na descoberta inicial de medicamentos e na triagem toxicológica. Possui

várias vantagens em termos de alterações fisiológicas, biológicas e moleculares, além disso, sua facilidade de manutenção, alta taxa de reprodução, desenvolvimento externo e ovos transparentes permitem o monitoramento da organogênese. Nos últimos anos, este modelo foi validado para estudos relacionados a doenças cardiovasculares, neurogênese, sistema digestivo, sistema muscular, câncer, imunologia, diabetes e inflamação, pois compartilha muitos genes, produtos proteicos e moleculares semelhantes aos dos mamíferos (Ismail *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2018).

Esse modelo animal se tornou destaque em estudos relacionados a neurociências e farmacologia, em grande parte devido ao seu genoma já sequenciado, que apresenta de 70 a 80% de similaridade com o genoma humano. Além disso, o seu sistema nervoso central possui núcleos, neurotransmissores e receptores análogos aos encontrados em mamíferos. Esse organismo também manifesta padrões comportamentais complexos, incluindo respostas relacionadas ao medo e a estados semelhantes à ansiedade, o que o torna altamente relevante para investigações nesse campo (Johnson *et al*., 2023).

Quando expostos a estímulos que desencadeiam medo ou ansiedade, os peixes-zebra apresentam um conjunto de comportamentos bem definidos e quantificáveis, como redução acentuada da exploração, maior tendência à escototaxia (preferência por ambientes escuros), geotaxia (permanência no fundo do aquário), tigmotaxia (aproximação das bordas), episódios de congelamento (imobilidade) e alterações motoras (Chahardehi *et al*., 2023).

3.5 TESTE CLARO-ESCURO E INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO

Estudos comprovam que o peixe-zebra é um ótimo modelo para avaliar as propriedades ansiolíticas de compostos presentes em extratos vegetais, sendo utilizado o teste claro-escuro, onde o aumento do tempo de permanência do animal no compartimento claro demonstra propriedade ansiolítica do extrato (Hacke *et al*., 2020).

Entre os protocolos mais utilizados para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em peixes-zebra destacam-se o teste de mergulho em tanque novo e o teste claro-escuro. Ambos os modelos têm sido amplamente validados por meio da administração de fármacos capazes de produzir respostas ansiolíticas ou ansiogênicas. No teste claro-escuro, a ansiedade pode ser avaliada de forma

operacional pelo tempo de permanência nas diferentes zonas: maior tempo no compartimento iluminado indica menor ansiedade, enquanto a preferência pela área escura sugere intensificação do estado ansioso. Além disso, variáveis experimentais como a intensidade da luz, o manejo dos animais, as condições de alojamento antes do teste e até mesmo a coloração do aquário influenciam significativamente as respostas comportamentais observadas nos peixes (Fontana; Alnassar; Parker, 2021).

Em seu estudo, Fontana, Alnassar e Parker (2021) testaram o mergulho em tanque novo e o teste claro-escuro um em seguida do outro e relatam que o efeito ansiolítico da fluoxetina mostrou-se mais evidente quando os peixes eram avaliados na segunda tarefa comportamental ou após um intervalo de seis minutos, independentemente do primeiro teste ser o de mergulho em tanque novo ou o teste claro-escuro. Segundo os próprios autores, esses dados indicam que os efeitos da fluoxetina apresentam um componente temporal, sugerindo a existência de um atraso em sua ação e tanto a farmacocinética quanto a farmacodinâmica desse fármaco podem variar de acordo com a via de administração utilizada e com a duração da exposição.

Um estudo recente de Al Shuraiqi *et al*. (2021) avaliou os efeitos prolongados da fluoxetina no comportamento do peixe-zebra por até 28 dias após uma exposição aguda a diferentes concentrações. Os resultados mostraram que as respostas ao fármaco variam conforme o momento em que o teste comportamental é realizado. Contudo, os efeitos de curto prazo da fluoxetina em paradigmas de ansiedade ainda não foram totalmente esclarecidos, representando uma etapa essencial para compreender tanto a variabilidade entre estudos quanto os mecanismos responsáveis por desencadear perfis ansiolíticos ou ansiogênicos (Fontana; Alnassar; Parker, 2021).

Já o estudo de Egan *et al.* (2009) avaliou a administração crônica de fluoxetina em peixe-zebra através do teste de mergulho em tanque novo, onde comprovou que a fluoxetina promove aumento do tempo de permanência na região superior do aquário, redução da latência para explorar essa área e maior frequência de transições para o topo. Eles também avaliaram que houve uma diminuição dos níveis de cortisol observada nos grupos tratados. Esses achados estão em consonância com resultados obtidos em roedores, nos quais a exposição prolongada à fluoxetina também se associa à redução da ansiedade.

Para investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito ansiolítico observado, foram utilizados antagonistas farmacológicos de diferentes sistemas neurotransmissores. A granisetrona é um antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT3, e estudos demonstraram que a inibição desses receptores reduz a hiperexcitabilidade neuronal e reverte comportamentos associados à ansiedade e depressão, evidenciando a participação dessa via na modulação de respostas emocionais (Xia *et al.*, 2021).

Da mesma forma, o pizotifeno atua como antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT2C, sendo utilizado para investigar a participação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por esse subtipo de receptor nos efeitos farmacológicos observados (Nakayama *et al*., 2021).

Já o flumazenil atua como antagonista seletivo dos receptores benzodiazepínicos, exercendo sua ação por meio da competição com os benzodiazepínicos pelo sítio de ligação presente no receptor GABAA, sendo amplamente utilizado para avaliar o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica nos efeitos comportamentais observados (Wang *et al*., 2021).

Diante da escassez de estudos sobre os efeitos de *E. uniflora* em modelos experimentais de ansiedade, particularmente em peixe-zebra, a investigação do extrato aquoso e do óleo essencial dessa espécie pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre suas propriedades neurocomportamentais e fornecer subsídios para estudos posteriores acerca de seus possíveis mecanismos farmacológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL E EXTRAÇÃO

4.1.1 Coleta do material

Foram coletados quatro sacos, de 15 litros cada, contendo folhas de *E. uniflora* de três espécimes (EU1, EU2 e EU3), localizadas no Campus Uvaranas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). A coleta foi realizada em agosto de 2024 durante o dia. A temperatura média do dia da coleta foi de 25ºC, estava bem ensolarado e sem registro de precipitação nas últimas 24 horas. O espécime EU1 apresenta folhas pequenas e amareladas e está localizado em uma região completamente exposta à luz solar (25°05'39.5"S, 50°06'23.6"W). O espécime EU2 encontra-se parcialmente exposto à luz solar (25°05'42.2"S, 50°06'07.3"W) e apresenta folhas pequenas e escuras. Já o espécime EU3 está localizado em uma região totalmente protegida da luz solar (25°05'42.1"S, 50°06'07.2"W) e possui folhas grandes e escuras. Uma exsicata do espécime EU1 encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUPG), sob o número de registro 22452 (Schaffka, 2024).

4.1.2 Extração

O material vegetal foi então seco à temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 2 dias. Posteriormente, as folhas secas (≅191g) foram trituradas e submetidas a hidrodestilação. Utilizou-se aparelho Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L e uma manta térmica como fonte geradora de calor, conforme modelo descrito na Farmacopeia Brasileira (2024).

Para o processo de extração, as folhas secas (≅ 48g) foram colocadas no balão de fundo redondo com adição de água destilada (2,5 L), o balão foi colocado dentro da manta aquecedora e as folhas foram submetidas a uma temperatura de 100 ºC por 2 horas. O óleo essencial foi coletado em éter etílico e armazenado sob refrigeração. O extrato aquoso obtido foi então filtrado e liofilizado. A etapa de extração contou com o apoio do grupo de pesquisa coordenado pela Prof.ª Dr.ª Cássia Gonçalves

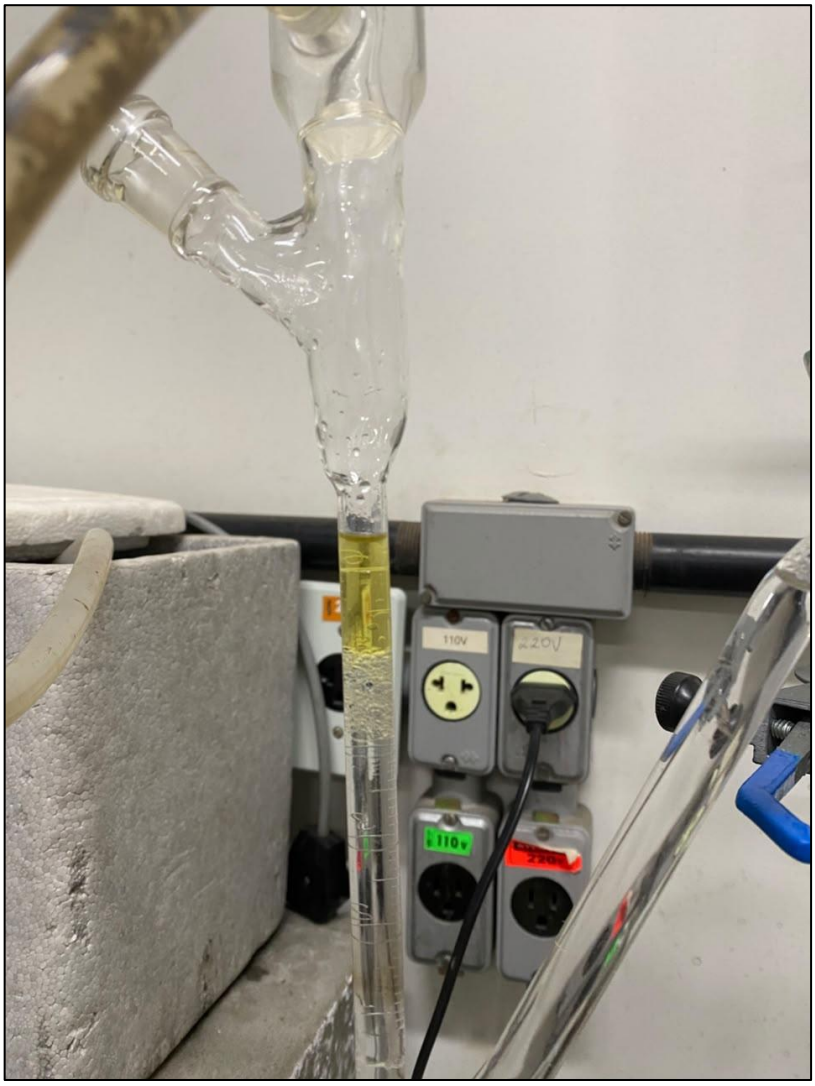
Magalhães, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa (DEQUIM/UEPG), que já desenvolve estudos prévios com esta espécie.

Figura 1 – Sistema de hidrodestilação por aparelho de Clevenger utilizado para extração do óleo essencial das folhas *de Eugenia uniflora*



Fonte: A autora

Figura 2 – Óleo essencial de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação



Fonte: A autora

Figura 3 – Filtração do extrato aquoso de folhas de *E. uniflora* em sistema de filtração a vácuo



Fonte: A autora

4.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

4.2.1 Espécie e origem

Foram utilizados 245 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (4–6 meses de idade), de ambos os sexos, linhagem selvagem. Os animais foram adquiridos do comerciante especializado *Peixe4you Aqua Studio* – Ponta Grossa (PR). Deste total, 17 peixes foram utilizados em estudo piloto para determinação das concentrações de estudo, e 228 nos testes posteriores. Distribuídos em nove grupos experimentais na primeira etapa e dez grupos na segunda etapa, com 12 indivíduos cada grupo.

4.2.2 Condições de manutenção

Os animais foram mantidos em tanques de vidro (100 L) contendo água desclorada mantida sob constante aeração mecânica e filtração química (25-27 °C; pH 7-8; amônia total < 0,01 mg L^{-1}; nitrito < 0,01 mg L^{-1}), e ciclo claro-escuro de 14-10 horas, com uso de lâmpadas fluorescentes (12 Watts; luzes acesas às 7h). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos para peixes.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas para o uso de animais em pesquisa e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEPG), sob o Processo SEI nº 24.000033746-5.

Figura 4 – Aquário utilizado para manutenção dos peixes-zebra durante o experimental



Fonte: A autora

4.3 ETAPAS EXPERIMENTAIS

O presente estudo utilizou exemplares de peixe-zebra, distribuídos em 19 grupos experimentais, com 12 indivíduos por grupo. O estudo foi dividido em duas etapas, na etapa 1 realizou-se a caracterização do efeito ansiolítico. Já na etapa 2 buscou-se avaliar o mecanismo de ação.

4.3.1 Etapa 1 – caracterização do efeito ansiolítico

Nesta etapa, buscou-se caracterizar o possível efeito ansiolítico do extrato aquoso e do óleo essencial de *E. uniflora*. Para tanto, foram realizados ensaios comportamentais nos seguintes grupos experimentais:

1. Controle negativo
2. Veículo (solvente do óleo essencial – Tween 80)
3. Clonazepam 0,75 mg L^{-1} (controle positivo)
4. Fluoxetina (controle positivo)
5. Extrato aquoso – 1 g L^{-1}
6. Extrato aquoso – 5 g L^{-1}
7. Óleo essencial – 5 mg L^{-1}
8. Óleo essencial – 10 mg L^{-1}
9. Óleo essencial – 15 mg L^{-1}

As concentrações empregadas foram determinadas a partir de estudos piloto realizados previamente, os quais permitiram identificar faixas seguras e responsivas para a espécie.

4.3.2 Etapa 2 – avaliação do mecanismo de ação

Com base nos resultados obtidos na etapa 1, que indicaram efeito ansiolítico apenas para o óleo essencial, a segunda etapa teve como objetivo investigar os mecanismos farmacológicos envolvidos e compreendem os seguintes grupos experimentais:

1. Controle Veículo (Tween 80)
2. Clonazepam 0,75 mg L^{-1}
3. Clonazepam + flumazenil
4. Fluoxetina
5. Fluoxetina + granisetrona
6. Fluoxetina + pizotifeno
7. Óleo essencial – 5 mg L^{-1}
8. Óleo essencial + flumazenil
9. Óleo essencial + granisetrona
10. Óleo essencial + pizotifeno

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

4.4.1 Clonazepam

Para obtenção do controle positivo, preparou-se a solução de clonazepam na concentração de 0,75 mg L^{-1}, diluiu-se o medicamento de nome comercial Rivotril 2,5 mg mL^{-1} em 300 mL em água do aquário.

4.4.2 Fluoxetina

Como controle positivo também preparou-se a solução de cloridrato de fluoxetina na concentração de 10 mg L^{-1}, diluiu-se o medicamento 20 mg mL^{-1} em 300 mL de água proveniente do aquário.

4.4.3 Tween 80 (controle veículo)

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de Tween 80 a 0,5% (v/v), por meio da adição de 50 µL de Tween 80 em 9,95 mL de água destilada, totalizando 10 mL. Para o preparo da solução utilizada como controle veículo, 2 mL dessa solução estoque foram adicionados a 298 mL de água do aquário, obtendo-se um volume final de 300 mL e uma concentração de Tween 80 de aproximadamente 0,0033% (v/v).

4.4.4 Óleo essencial

Para a preparação da solução contendo o óleo essencial, o composto foi inicialmente fracionado em microtubos tipo Eppendorf, sendo registrada a massa individual de cada alíquota (por exemplo, 9,6 mg). A partir da solução previamente preparada de Tween 80, foram retirados 2 mL, que foram misturados ao óleo presente em cada Eppendorf em volume suficiente para atingir as concentrações desejadas nos testes. Essa mistura foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e submetida à agitação em vórtex para adequada homogeneização. Esses 2 mL da solução de óleo essencial e Tween 80 foram adicionados a 298 mL de água do aquário, obtendo-se um volume final de 300 mL.

4.4.5 Extrato aquoso

Para o preparo da solução contendo o extrato aquoso, inicialmente foram pesados 2,5 g do pó liofilizado, que foi diluído em 500 mL de água proveniente do aquário. Em seguida, 250 mL dessa solução foram separados e os outros 250 mL foram diluídos em mais 250 mL de água do aquário, obtendo-se a concentração de 5 g L^{-1}. Para a preparação da concentração de 1 g L^{-1}, retiraram-se 100 mL da primeira solução de 250 mL previamente separada, os quais foram completados com 400 mL de água do aquário.

4.4.6 Flumazenil

Para o preparo da solução de flumazenil, utilizou-se o medicamento na concentração de 0,1 mg mL^{-1}. Foram diluídos 3,75 mL do medicamento em 300 mL de água do aquário, obtendo-se uma solução na concentração final de 1,25 mg L^{-1}.

4.4.7 Granisetrona

Para o preparo da solução de granisetrona, utilizou-se uma alíquota previamente acondicionada em microtubo, contendo 50 µL do medicamento na concentração de

20 mg mL^{-1}. O conteúdo foi diluído em 1 L de água do aquário, obtendo-se uma solução na concentração final de 1 mg L^{-1}. Para os ensaios experimentais, foram utilizados 300 mL dessa solução.

4.4.5 Pizotifeno

Para o preparo da solução de pizotifeno, utilizou-se uma alíquota previamente acondicionada em microtubo, contendo 50 µL do medicamento na concentração de 20 mg mL^{-1}. O conteúdo foi diluído em 1 L de água do aquário, obtendo-se uma solução na concentração final de 1 mg L^{-1}. Para os ensaios experimentais, foram utilizados 300 mL dessa solução.

4.5 TESTES

4.5.1 Procedimento experimental

Foram realizados os testes de preferência claro-escuro. Os testes da etapa 1 foram conduzidos submetendo individualmente os animais, por 10 minutos, à imersão em soluções contendo extrato aquoso ou óleo essencial. Para o controle positivo, utilizou-se solução de clonazepam e fluoxetina, enquanto o controle negativo consistiu em soluções contendo Tween 80 (veículo utilizado para o óleo essencial) ou apenas água do aquário, conforme o grupo experimental.

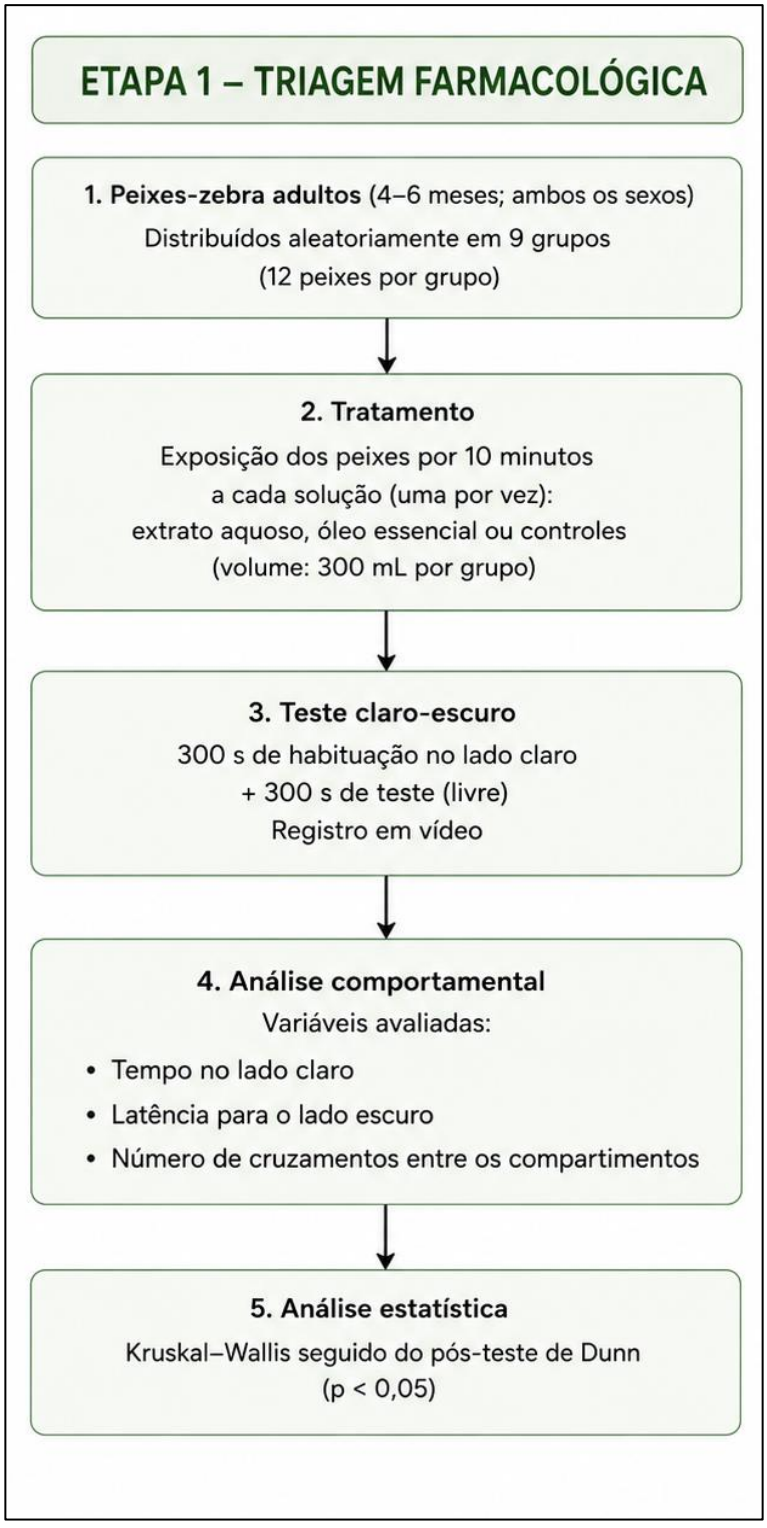
A concentração de 5 mg/L do óleo essencial de *E. uniflora* foi selecionada para a segunda etapa por corresponder à menor concentração testada que apresentou efeito ansiolítico estatisticamente significativo na etapa inicial, evidenciado pelo aumento do tempo de permanência dos peixes-zebra no compartimento claro. Dessa forma, essa concentração foi escolhida para a investigação dos possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito comportamental observado, por meio da associação do óleo essencial com antagonistas dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico.

Já para a etapa 2 os animais ficaram imersos 20 minutos em água do aquário ou nos medicamentos flumazenil, granisetrona e pizotifeno de acordo com seus respectivos grupos, para que houvesse uma melhor absorção destes medicamentos

antagonistas e a água do aquário atuou como controle negativo. Após os 20 minutos, os animais foram retirados das soluções de pré-tratamento e transferidos para outros recipientes contendo a solução de óleo essencial, solução de Tween 80, clonazepam ou fluoxetina, de acordo com o grupo experimental, permanecendo imersos por mais 10 minutos antes da realização do teste comportamental.

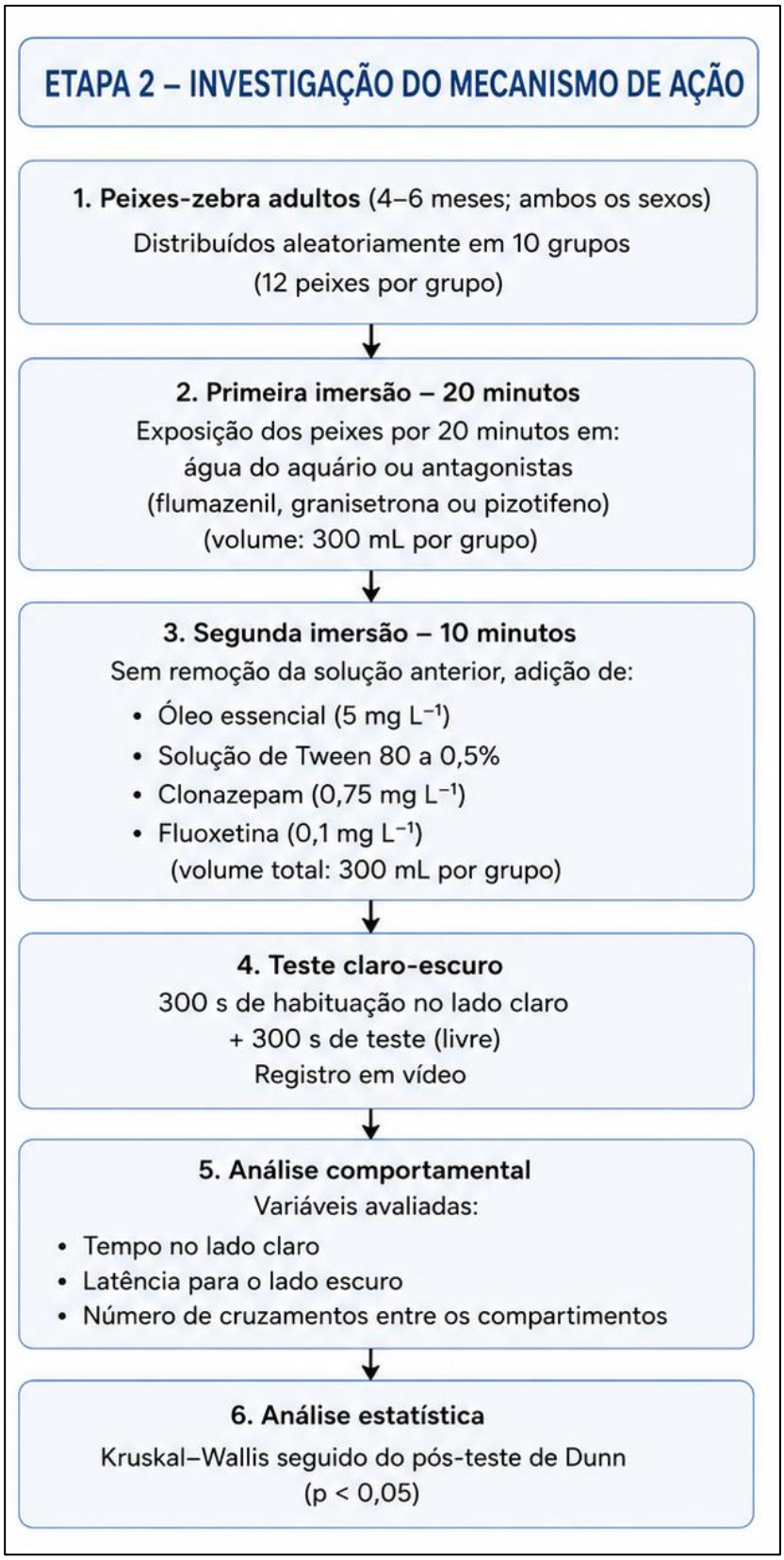
Em seguida, para ambas etapas, os peixes foram transferidos para um tanque de vidro (18 × 9 × 7 cm), preenchido com nível de água de 3 cm, dividido por uma divisória deslizante tipo guilhotina (9 x 7 cm) em dois compartimentos, um claro e um escuro de tamanhos iguais, utilizando um filme adesivo preto cobrindo as paredes externas e o piso (Gebauer *et al*., 2011). Após o tratamento, cada animal foi colocado individualmente no compartimento claro e permaneceu um período de 300 segundos para se habituar. Após esse período a divisória era aberta permitindo que o peixe explorasse todo o tanque por mais 300 segundos, os quais foram registrados em vídeo para análise posterior.

Figura 5 – Fluxograma representativo das etapas experimentais da triagem farmacológica (Etapa 1)



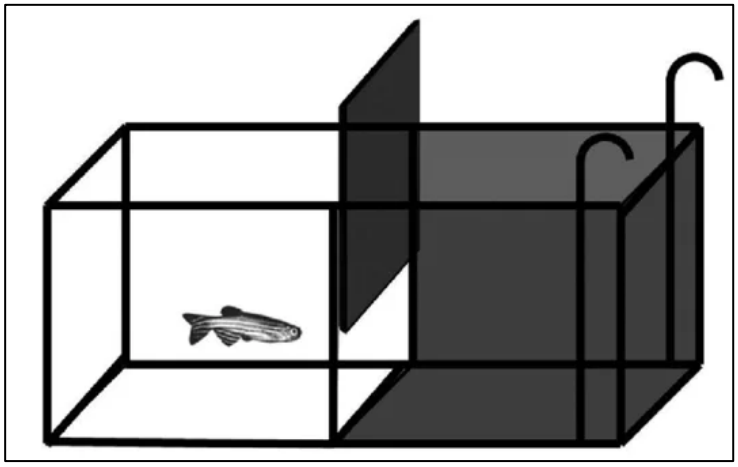
Fonte: A autora

Figura 6 – Fluxograma representativo das etapas experimentais da investigação do mecanismo de ação (Etapa 2)



Fonte: A autora

Figura 7 – Aparato utilizado no teste claro-escuro para avaliação do comportamento tipo ansioso em zebrafish adulto



Fonte: Adaptado de Siebel, Bonan e Silva (2015)

Figura 8 – Aparato utilizado para realização do teste claro-escuro em peixes-zebra



Fonte: A autora

4.5.2 Parâmetros comportamentais

Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais:

- Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro;
- Tempo total de permanência no compartimento claro;
- Número de cruzamentos entre os compartimentos.

O tempo de permanência de cada animal no compartimento claro foi utilizado como parâmetro comportamental relacionado à ansiedade, considerando-se que maior permanência nessa região pode indicar redução do comportamento tipo ansioso. Também foram avaliados o tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos. A latência foi utilizada para caracterizar o comportamento exploratório inicial dos animais, enquanto o número de cruzamentos foi considerado um indicador indireto da atividade locomotora durante o teste (Hacke *et al.*, 2020).

4.6 EUTANÁSIA

Os animais foram sacrificados segundo as normativas do CONCEA. Os peixes foram imersos em solução de óleo de cravo da Índia (0,23%), que causa bloqueio neuromuscular competitivo, aparentemente potencializa o ácido gama aminobutírico (GABA) e é antagonista de receptores NMDA. Foram solubilizados 3 mL de óleo de cravo em 10 mL de etanol. Posteriormente, 10 mL desta solução foram diluídos em 1L de água. Os peixes então foram mergulhados nesta solução até que ocorresse a perda de equilíbrio e a parada da abertura das guelras (Favoretto; Seabra; Olivato, 2019).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, adequado para amostras que não apresentam distribuição normal. Quando identificadas diferenças significativas entre os grupos, foi aplicado o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas, a fim de determinar quais grupos diferiam entre si. O nível de significância adotado em todas as análises foi de $p < 0,05$.

Utilizamos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, pois ele é análogo ao teste F utilizado na Análise de Variância (ANOVA), entretanto para a aplicação da ANOVA deve-se atender os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade, o teste H de Kruskal-Wallis (HKW) não impõe qualquer restrição

sobre a comparação (Cabral Júnior; Lucena, 2020).

As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico JASP (versão 0.95.3.0) e GraphPad Prism (versão 5.01).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados foi organizada em três etapas experimentais. Na primeira, são descritos os achados provenientes dos testes comportamentais realizados com o extrato aquoso de *E. uniflora*, considerando as variáveis tempo de latência, número de cruzamentos e tempo de permanência no compartimento claro. Na segunda etapa, são apresentados os resultados obtidos com o óleo essencial da espécie, analisados a partir dos mesmos parâmetros comportamentais, possibilitando a comparação entre os diferentes tratamentos avaliados.

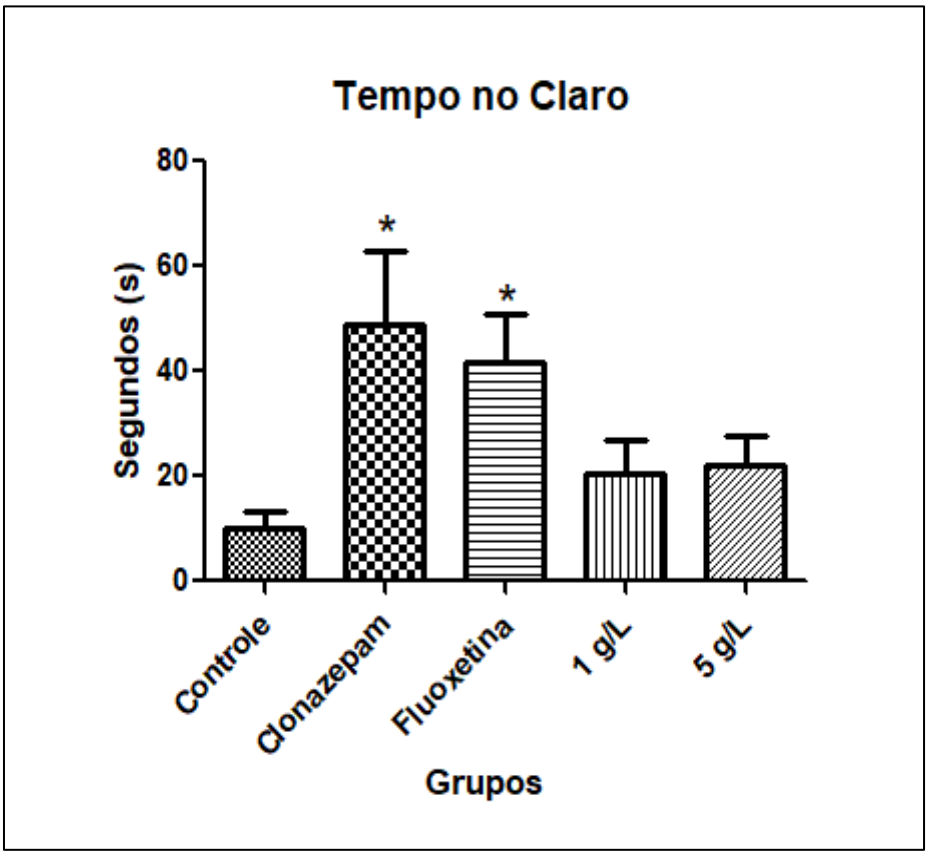
Na terceira etapa, são apresentados os resultados referentes à investigação do mecanismo de ação do efeito ansiolítico observado para o óleo essencial. Para essa avaliação, foi selecionada a concentração de 5 mg L^{-1}, por corresponder à menor concentração capaz de promover efeito ansiolítico significativo nos testes comportamentais. Nessa etapa, foram realizados experimentos utilizando os antagonistas farmacológicos flumazenil, granisetrona e pizotifeno, com o objetivo de investigar o possível envolvimento dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico na mediação dos efeitos observados.

5.1 EXTRATO AQUOSO DE *E. uniflora*

5.1.1 Tempo de permanência no lado claro

Conforme apresentado na figura 9, os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (H = 14,60; p = 0,006). O pós-teste de Dunn indicou que tanto o grupo tratado com clonazepam quanto o grupo tratado com fluoxetina apresentaram aumento significativo no tempo de permanência no compartimento claro em relação ao grupo controle (p = 0,003 para ambos), confirmando a eficácia de ambos como controles positivos. Já os grupos tratados com o extrato aquoso, tanto na concentração de 1 g/L (p = 0,313) quanto em 5 g/L (p = 0,133), não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle.

Figura 9 - Tempo de permanência no compartimento claro dos peixes-zebra tratados com extrato aquoso de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12



Fonte: A autora

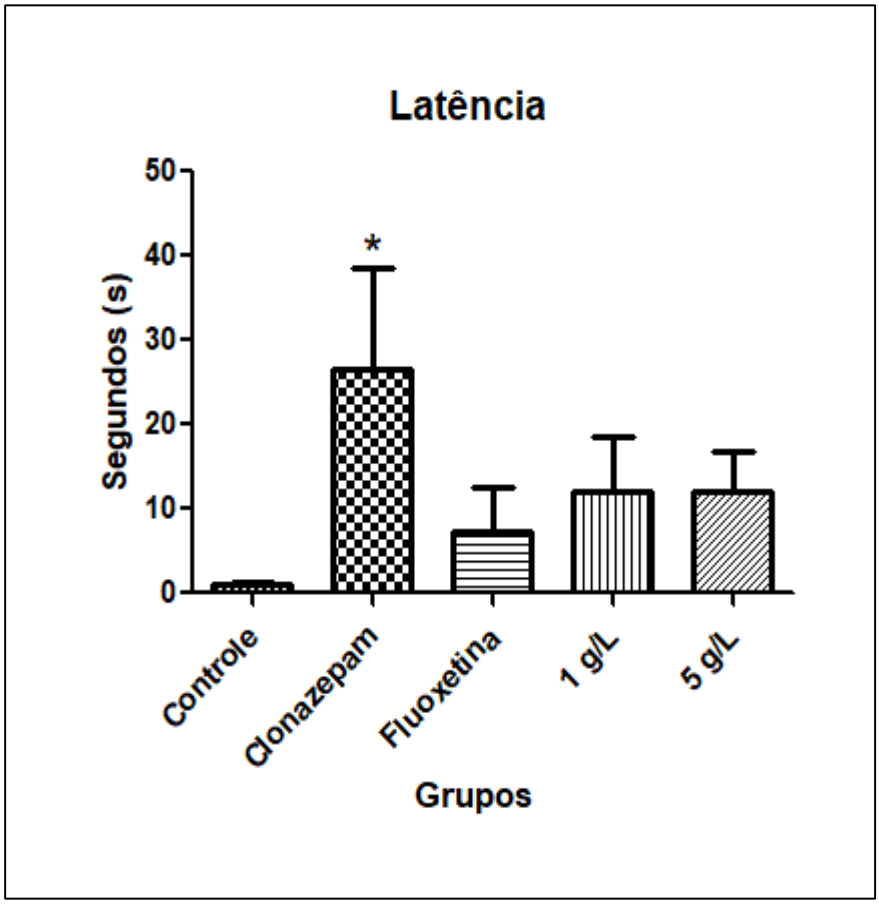
Conforme observado na Figura 9, o aumento estatisticamente significativo do tempo de permanência no compartimento claro promovido pelo clonazepam e pela fluoxetina valida o modelo experimental adotado. De acordo com Mansur, Santos e Gouveia Jr. (2014), a administração de substâncias ansiolíticas aumenta o tempo de permanência no compartimento claro. Em contrapartida, os grupos tratados com o extrato aquoso de *E. uniflora* nas concentrações de 1 e 5 g/L não diferiram estatisticamente do controle, indicando que, nas condições experimentais testadas, o extrato aquoso não promoveu efeito ansiolítico detectável.

5.1.2 Tempo de latência para entrada no compartimento escuro

Embora a análise de Kruskal-Wallis dos dados da figura 10 tenha identificado diferença significativa entre os grupos (H = 10,67; p = 0,030), o padrão observado nos pós-testes indica que essa diferença foi explicada exclusivamente pelo grupo

clonazepam, que apresentou latência significativamente maior em relação ao controle (p = 0,004). Contudo, assim como no parâmetro anterior, o extrato aquoso nas concentrações de 1 g/L (p = 0,695) e 5 g/L (p = 0,155) não apresentou diferença em comparação com o controle. O grupo fluoxetina também não apresentou diferença significativa (p = 0,319).

Figura 10 - Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro em peixes-zebra tratados com extrato aquoso de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. * p < 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



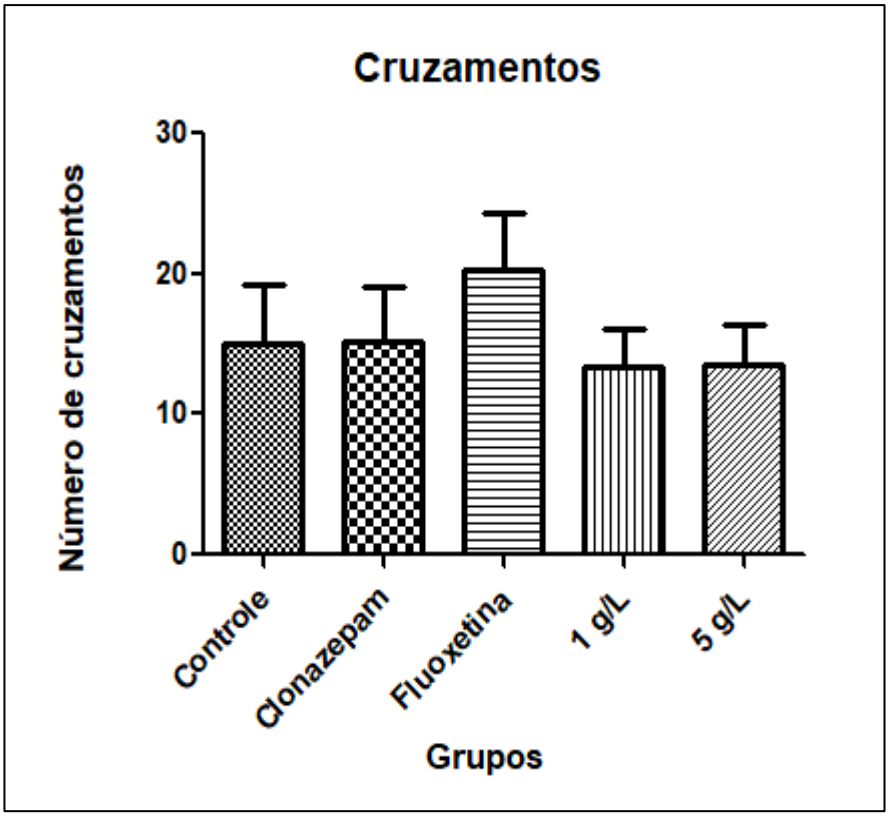
Fonte: A autora

Dessa forma, conclui-se que o extrato aquoso não alterou o comportamento exploratório inicial dos peixes no teste claro-escuro.

5.1.3 Número de cruzamentos entre compartimentos

Não foram observadas diferenças significativas no número de cruzamentos entre os grupos experimentais (H = 2,213; p = 0,697) na figura 11.

Figura 11 - Número de cruzamentos entre compartimentos no teste claro-escuro em peixes-zebra tratados com extrato aquoso de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn)



Fonte: A autora

De acordo com Hacke *et al*. (2020) o número de cruzamentos da linha média entre os compartimentos claro e escuro é um indicador de atividade locomotora, então a semelhança entre os grupos tratados e o controle sugere que o extrato aquoso não interferiu na atividade locomotora geral dos animais, indicando ausência de efeitos sedativos ou de prejuízo motor.

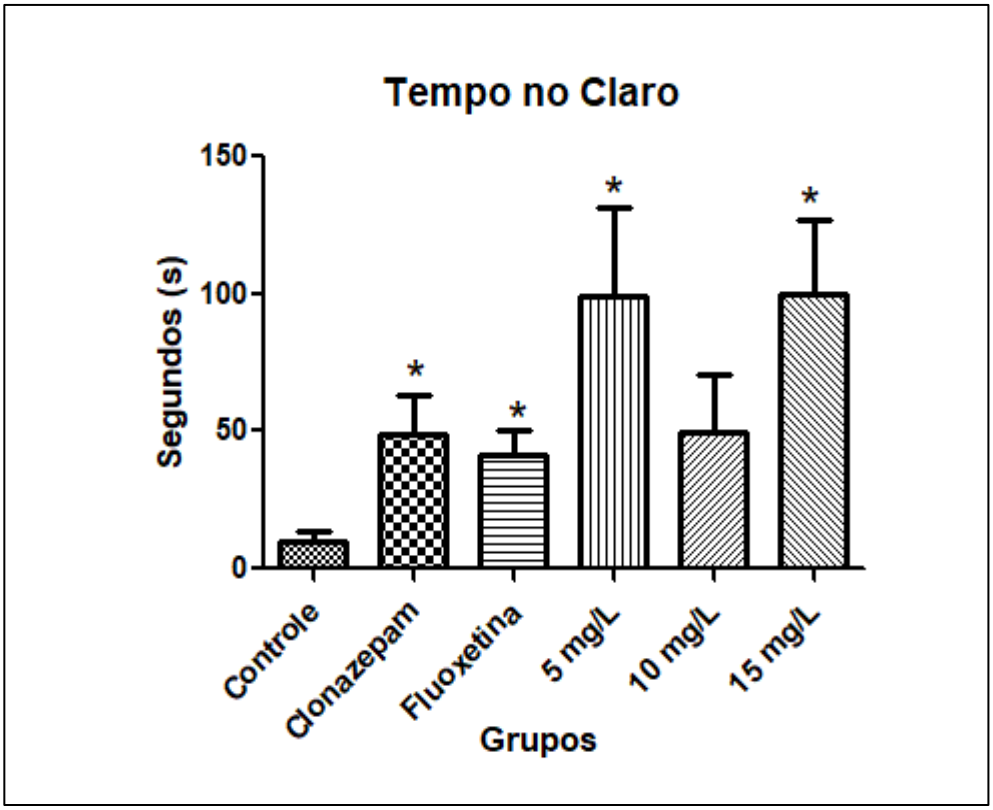
5.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *E. uniflora*

5.2.1 Tempo de permanência no lado claro

A figura 12 demonstra diferença estatisticamente significativa entre os grupos (H = 18,38; p = 0,003). O pós-teste de Dunn indicou que o grupo tratado com óleo essencial nas concentrações de 5 mg/L (p = <0,001) e 15 mg/L (p = <0,001)

apresentou aumento significativo no tempo de permanência no compartimento claro quando comparado ao grupo controle. Os grupos tratados com clonazepam e com fluoxetina também apresentaram diferença significativamente do controle (p = 0,017), confirmando a validade do ensaio.

Figura 12 - Tempo de permanência no compartimento claro dos peixes-zebra tratados com óleo essencial de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. * p < 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



Fonte: A autora

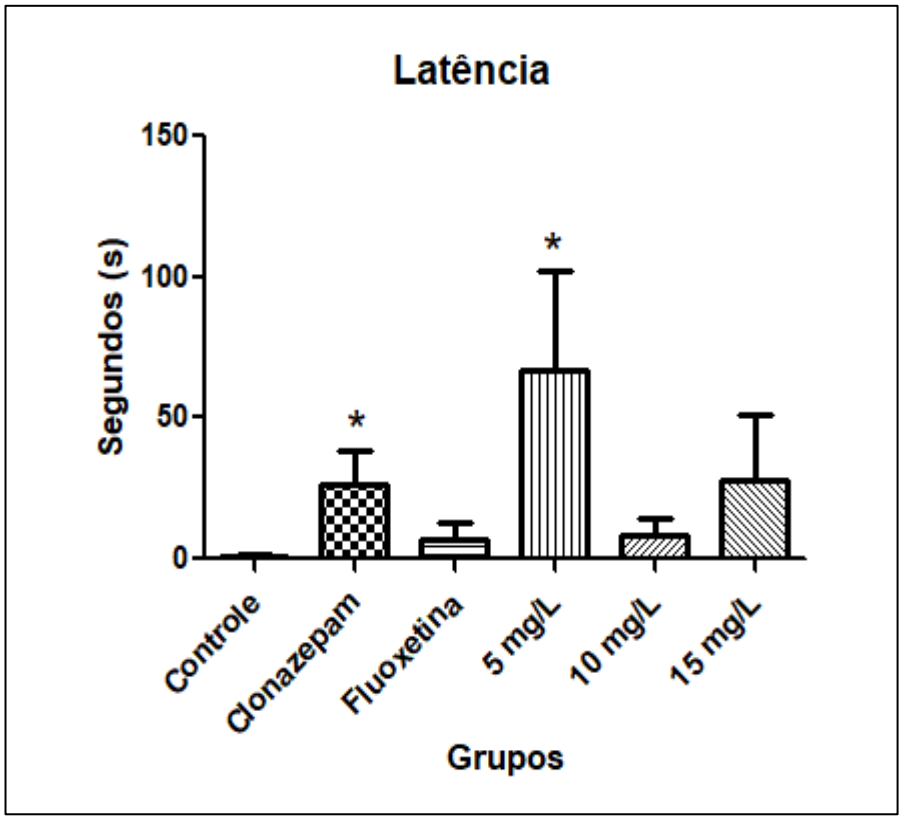
Esses resultados indicam que o óleo essencial, principalmente nas concentrações de 5 mg/L e 15 mg/L, promoveu comportamento compatível com efeito ansiolítico, aumentando o tempo de permanência dos animais no compartimento claro do tanque.

5.2.2 Tempo de latência para entrada no compartimento escuro

Na figura 13 foi observada diferença significativa entre os grupos também para o parâmetro de latência (H = 15,15; p = 0,010). O pós-teste revelou que os peixes tratados com óleo essencial a 5 mg/L apresentaram aumento significativo do tempo

de latência em relação ao grupo controle (p = 0,006), resultado semelhante ao observado com o clonazepam (p = 0,002).

Figura 13 - Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro em peixes-zebra tratados com óleo essencial de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. * p < 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



Fonte: A autora

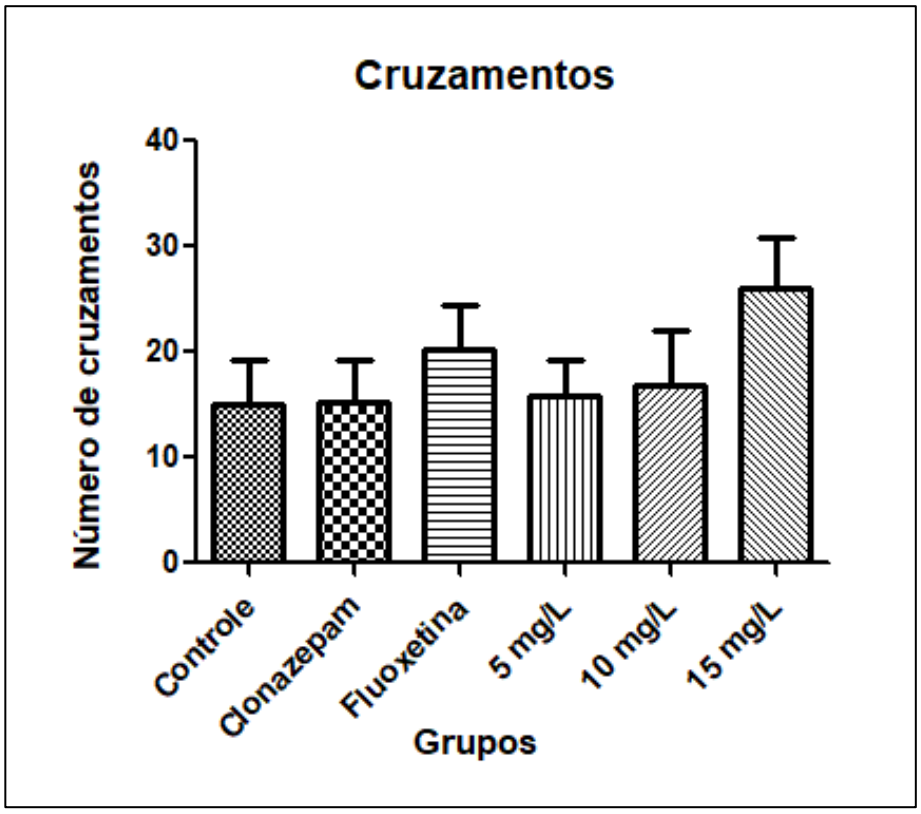
Esses achados indicam que o óleo essencial, particularmente na concentração de 5 mg/L, aumentou a latência para entrada no compartimento escuro, parâmetro relacionado à exploração de novos ambientes (Hacke et al., 2020). Embora isoladamente não comprove um efeito ansiolítico, esse resultado, associado ao aumento do tempo de permanência no compartimento claro e à ausência de alterações significativas no número de cruzamentos, sugere uma possível ação ansiolítica do óleo essencial.

5.2.3 Número de cruzamentos entre compartimentos

No parâmetro de número de cruzamentos, a figura 14 demonstra que não foram

detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (*H* = 4,68; *p* = 0,456).

Figura 14 - Número de cruzamentos entre compartimentos no teste claro-escuro em peixes-zebra tratados com óleo essencial de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



Fonte: A autora

Esse resultado sugere que, nas condições avaliadas, o efeito observado sobre a permanência no compartimento claro não foi acompanhado por alteração detectável da atividade locomotora.

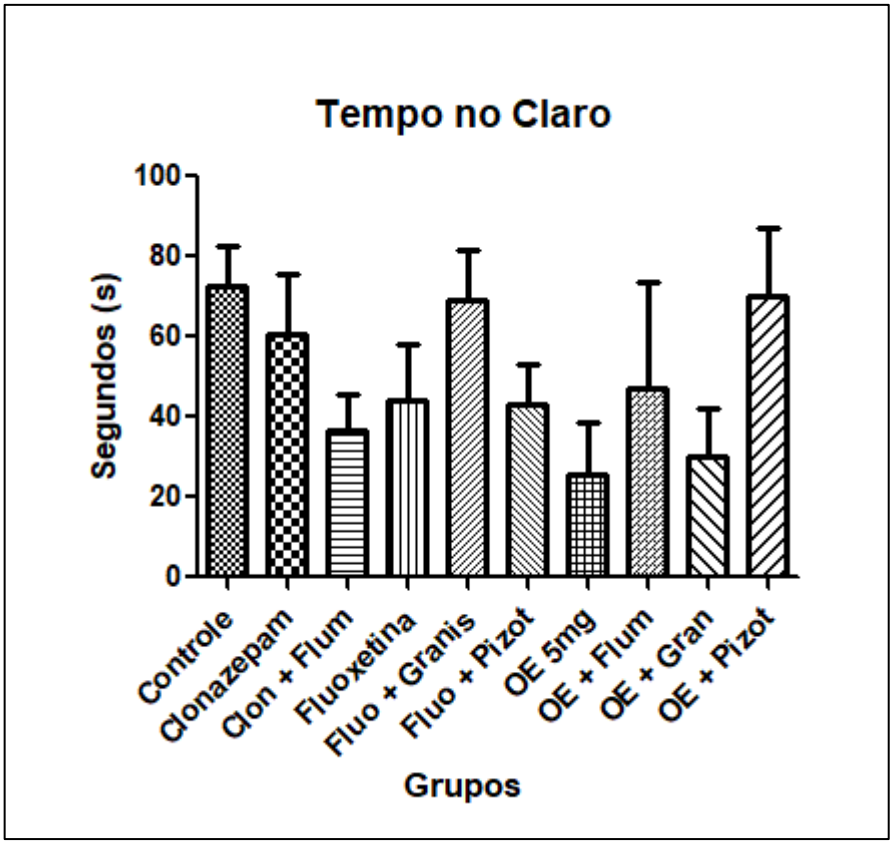
5.3 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO

5.3.1 Tempo de permanência no lado claro

Na figura 15 foi observada diferença significativa entre os grupos para o tempo de permanência no compartimento claro (H = 17,88; p = 0,037). No entanto, o pós-teste de Dunn não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos após a correção para comparações múltiplas.

Figura 15 - Tempo de permanência no compartimento claro dos peixes-zebra submetidos aos tratamentos utilizados na investigação do mecanismo de ação do óleo essencial de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



Fonte: A autora

De maneira geral, observou-se variação no tempo de permanência no compartimento claro entre os tratamentos avaliados. O grupo tratado com óleo essencial associado ao pizotifeno apresentou os maiores valores para esse parâmetro, enquanto o grupo tratado apenas com óleo essencial apresentou menores tempos de permanência no compartimento claro. Apesar da diferença global observada pelo teste de Kruskal-Wallis, as comparações individuais entre os grupos não permitiram identificar quais tratamentos foram responsáveis por essa diferença.

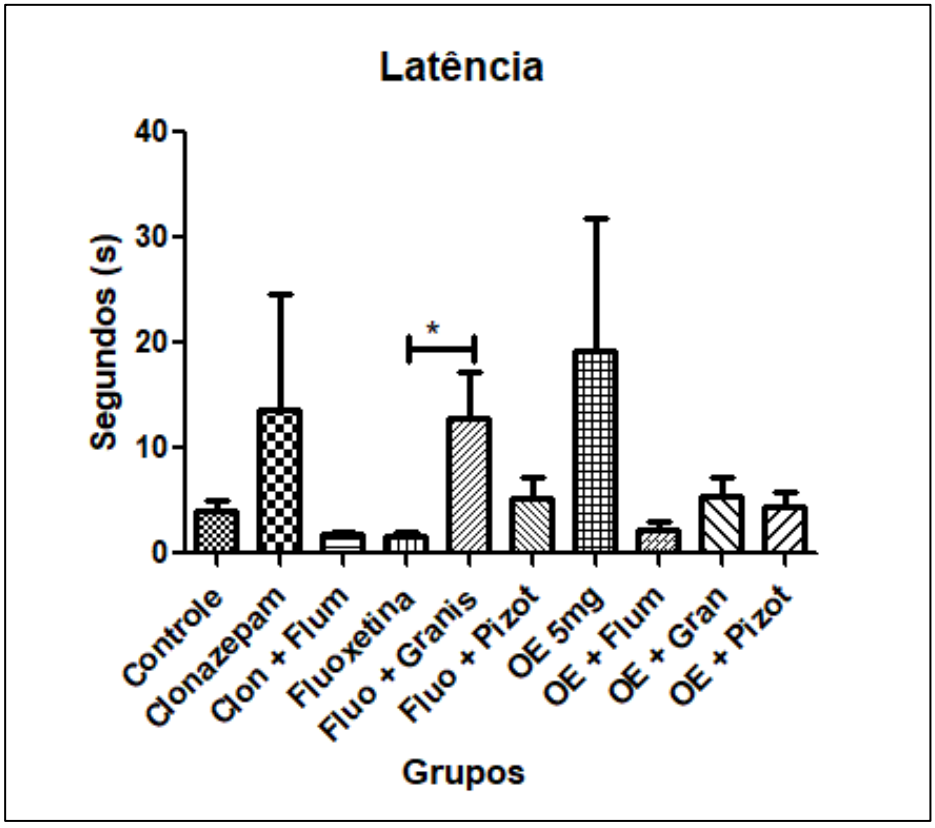
Cabe destacar que, diferentemente do observado na primeira etapa experimental, o grupo tratado apenas com óleo essencial não apresentou aumento do tempo de permanência no compartimento claro. Como consequência, não foi possível reproduzir o efeito ansiolítico previamente observado para o óleo essencial nesta

etapa do estudo. De acordo com Johnson *et al.* (2023), diferentes fatores inerentes aos ensaios comportamentais, como as condições do ambiente de teste e a presença ou proximidade dos pesquisadores durante os experimentos, podem influenciar as respostas comportamentais dos animais, contribuindo para a variabilidade dos resultados.

5.3.2 Tempo de latência para entrada no compartimento escuro

Na figura 16 foi observada diferença significativa entre os grupos para o parâmetro de latência (H = 19,85; p = 0,019). O pós-teste de Dunn revelou diferença significativa entre os grupos fluoxetina e fluoxetina associada à granisetrona (p = 0,020).

Figura 16 - Tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro em peixes-zebra submetidos aos tratamentos utilizados na investigação do óleo essencial de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12. * p < 0,05 entre os grupos indicados (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



Fonte: A autora

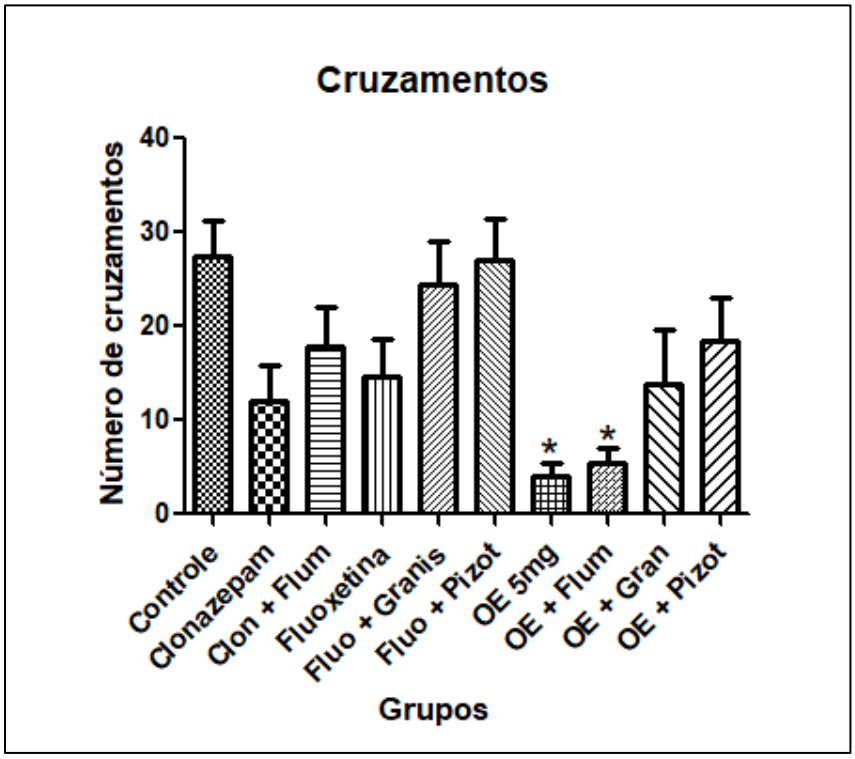
Os resultados demonstram uma tendência de aumento da latência nos animais

tratados apenas com óleo essencial, indicando maior permanência inicial no compartimento claro. Entretanto, os pré-tratamentos com flumazenil, granisetrona e pizotifeno promoveram redução dos valores de latência, sugerindo possível atenuação do efeito observado para o óleo essencial, embora sem confirmação estatística nas comparações múltiplas.

5.3.3 Número de cruzamentos entre compartimentos

Na figura 17 foi observada diferença significativa entre os grupos para o número de cruzamentos (H = 41,14; p < 0,001). O pós-teste de Dunn revelou que os grupos tratados com óleo essencial a 5 mg/L apresentaram redução significativa no número de cruzamentos em relação ao grupo controle (p < 0,001) e ao grupo fluoxetina (p = 0,001). Resultado semelhante foi observado no grupo tratado com óleo essencial associado ao flumazenil, que apresentou menor número de cruzamentos em comparação ao controle (p = 0,003) e à fluoxetina (p = 0,003).

Figura 17 - Número de cruzamentos entre compartimentos no teste claro-escuro em peixes-zebra submetidos aos tratamentos utilizados na investigação do mecanismo de ação do óleo essencial de *E. uniflora*. Os valores são apresentados como média ± EPM. Grupos com n = 12 . * p < 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn)



Fonte: A autora

Os resultados indicam diminuição da atividade locomotora nos grupos tratados com óleo essencial a 5 mg/L e óleo essencial associado ao flumazenil. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle para esse parâmetro.

A redução na atividade locomotora provocada pelo OE foi revertida pelos fármacos serotoninérgicos e não foi revertida pelo flumazenil, sugerindo que esse efeito é modulado pelo sistema serotoninérgico. Por outro lado, a fluoxetina não foi capaz de causar a mesma redução de cruzamentos. A participação da serotonina na modulação da ansiedade e da atividade locomotora em zebrafish já foi demonstrada, sendo que intervenções farmacológicas sobre esse sistema produzem alterações comportamentais dependentes do fármaco, da dose e do paradigma experimental empregado (Maximino *et al*., 2013).

Além disso, embora a fluoxetina atue aumentando a disponibilidade de serotonina, seus efeitos sobre a locomoção não são padrões entre diferentes testes comportamentais em peixe-zebra, podendo inclusive não reproduzir o mesmo perfil observado para outros compostos serotoninérgicos (Maximino *et al*., 2013; Näslund *et al*., 2024).

Segundo Maximino *et al*. (2010), o peixe-zebra apresenta respostas comportamentais consistentes e comparáveis às observadas em mamíferos, além de reagir de forma previsível a fármacos ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Essa sensibilidade farmacológica, aliada à facilidade de manejo e à reprodutibilidade dos resultados, reforça a validade e a aplicabilidade do peixe-zebra em estudos neurocomportamentais voltados à avaliação de compostos com potencial efeito ansiolítico.

De acordo com Blaser e Peñalosa (2011), um bom modelo validado na literatura é o teste claro-escuro, pois o peixe-zebra demonstra uma preferência pelo compartimento escuro, comportamento interpretado como uma resposta de evitação frente a situações potencialmente ameaçadoras. Essa preferência é denominada escototaxia, na qual a evitação de áreas iluminadas está associada à ansiedade. Os autores também demonstraram que o comportamento no teste é sensível a agentes farmacológicos ansiolíticos e ansiogênicos, reforçando sua utilidade experimental.

O estudo de Sackerman *et al*. (2010) demonstra que em condições de

exposição a novos ambientes, essa espécie tende a permanecer nas regiões inferiores do tanque ou em áreas escuras, um comportamento associado à ansiedade e à percepção de risco de predação.

Utilizamos em nosso estudo o medicamento Clonazepam que é um agonista do receptor GABA $_A$, se liga ao sítio benzodiazepínico nos complexos do receptor GABA$_A$ no sistema nervoso central, resultando em uma ligação aumentada do GABA ao receptor GABA $_A$ (Johnson *et al*., 2023). Além do controle positivo ser realizado com a administração do Clonazepam, utilizamos também um outro grupo de controle positivo em que os animais receberam a administração de Fluoxetina que é um medicamento ISRS.

A utilização da fluoxetina e do clonazepam como controles positivos neste estudo baseia-se em seus efeitos farmacológicos amplamente descritos em modelos comportamentais com peixe-zebra. Sackerman *et al*. (2010) demonstraram que a administração de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como a fluoxetina e o citalopram, reduz esse comportamento ansioso, aumentando o tempo de permanência na porção superior do tanque e nos compartimentos iluminados, efeito decorrente da sua afinidade pelos transportadores de serotonina no encéfalo do peixe-zebra. Os autores também afirmam que de forma semelhante, compostos benzodiazepínicos, como o clonazepam e o clordiazepóxido, modulam o sistema GABAérgico, promovendo efeitos ansiolíticos evidenciados pelo aumento da exploração e do tempo de permanência em áreas claras nos testes comportamentais.

No presente estudo, o clonazepam e a fluoxetina apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, confirmando sua eficácia como controle positivo e validando o modelo comportamental adotado.

Conforme descrito por Victoria *et al*. (2013), esses autores demonstraram que o óleo essencial das folhas da espécie apresenta ação antidepressiva e antioxidante, mediada pela ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT$_2$A/C e pela participação do sistema adrenérgico. A presença de sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados, como o β-cariofileno e o germacreno, pode contribuir para esses efeitos, uma vez que tais compostos possuem reconhecida atividade neuroativa.

Oliveira *et al*. (2017) relataram que o extrato padronizado dos frutos vermelhos da espécie foi capaz de prevenir alterações metabólicas e comportamentais, além de exercer efeitos antioxidantes e antidepressivos em ratos submetidos à síndrome metabólica induzida por dieta hipercalórica.

O estudo de Savall *et al*. (2025) demonstrou que o extrato hidroalcoólico do fruto de *E. uniflora* exerce efeito neuroprotetor e, sobretudo, previne comportamentos depressivos e anedônicos em ratas submetidas ao modelo experimental de doença de Parkinson induzido. Esses resultados reforçam a capacidade da espécie em modular vias neuroquímicas envolvidas no controle do humor e na neurodegeneração, indicando seu potencial terapêutico na prevenção de distúrbios depressivos e emocionais.

De acordo com o estudo de Schaffka (2023), no qual o autor caracterizou o óleo essencil e o extrato aquoso de exemplares das folhas de *E. uniflora* presentes no Câmpus UEPG, a caracterização dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS) identificou a presença de 13 compostos fenólicos, sendo predominantes àcidos fenólicos e flavonoides glicosilados. Entre os compostos identificados estão os relatados na tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização dos extratos de *E. uniflora*

Tempo de Retenção (Min)	[M-H] (*m/z*)	MS/MS	Proposta de Composto
2,82	169,41	125,27	Ácido Gálico
7,74	653,58	326,4	n.i
8,05	501,47	479,49/316,52	Miricetina derivado
8,35	463,37	449,4/316,26	Miricetina-3-*O*-ramnosideo
8,55	463,37	433,34/300,40	Quercetina glucosídeo
8,75	433,47	405,39/300,40	Quercetina pentosídeo
8,98	447,51	300,4	Quercetina-3-*O*-ramnosideo
9,11	521,49	447,38/301,25/209,59/187,55/125,40	Quercetina derivado
9,19	483,39	447,38/417,54/301.38	Quercetina derivado
9,26	533,64	483,46/339,60/301.38	Quercetina derivado
9,38	417,35	285,38	Kaempferol pentosídeo
9,48	431,45	285,38	Kaempferol-3-*O*-ramnosideo
9,72	495,55	301,39/179,29	Quercetina derivado
9,91	495,42	325,62	n.i
10,07	329,39	314,18	Quercetina 3',4'-dimetil éter

n.i: não identificado

Fonte: Schaffka (2023)

Para o óleo essencial, Schaffka (2023) realizou a caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), a qual permitiu

a identificação de aproximadamente 60 compostos no óleo essencial. Os constituintes pertencem às classes dos monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, sendo estes os principais responsáveis pelo perfil químico do óleo essencial. Entre os compostos identificados destacam-se os compostos descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização dos óleos essenciais *E. uniflora*

IRL[a]	IRL[b]	Compostos	Área relativa (%)		
			EU1	EU2	EU3
1396	1394	β-Elemeno	3,05	2,67	3,88
1439	1435	γ-Elemeno	2,67	5,96	-
1488	1480	Germacreno D	12,64	17,01	10,02
1504	1500	Curzereno	13,28	14,61	**21,51**
1512	1510	Bulneseno	-	-	2,1
1529	1519	Cubebol	-	-	3,16
1530	1534	γ-Cadineno	-	2,26	-
1566	1561	Germacreno B	**16,19**	**32,76**	5,9
1584	1582	Espatulenol	-	-	2,66
1605	1605	β-Elemenona	7,68	-	-
1662	1660	Cadin-4-en-10-ol	-	-	2,37
1704		Furanodieno	4,3	-	8,55
1708	1696	Germacrona	9,03	-	8,58
1756	1755	Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one	4	-	7,12
1765	1767	Antraceno	-	-	2,08

IRL[a]: Indice de retenção linear calculado utilizando uma coluna RTx-5MS e uma sequência de n-alcanos C8-C20; IRL[b]: Indice de retenção linear publicados para colunas apolares.

Fonte: Schaffka (2023)

Schaffka (2023) relata ainda que a composição do óleo essencial apresentou maior variabilidade entre os espécimes do que a composição dos extratos fenólicos, indicando maior sensibilidade dos metabólitos voláteis às condições ambientais, o que pode ter influenciado na reprodutibilidade do efeito ansiolítico do presente estudo.

A ausência de reprodução do efeito ansiolítico observado na primeira etapa pode estar relacionada também à variabilidade inerente aos ensaios comportamentais em peixe-zebra. Segundo o estudo de Silva *et al.* (2023) muitos fatores ambientais podem afetar a fisiologia e o comportamento do peixe-zebra, alguns desses fatores podem ser controlados como a temperatura da água, o oxigênio dissolvido, a osmolaridade e o pH. Outros fatores podem representar fontes de variação, como a intensidade da luz e o ruído de fundo causado pelo funcionamento de bombas de

água, aeradores, resfriadores e outros equipamentos. Outro fator importante, que pode afetar o comportamento dos animais, é a diferença de linhagem.

Além disso, de acordo com Johnson *et al*. (2023), outros fatores também podem interferir nos efeitos de substâncias ansiolíticas sobre o comportamento dessa espécie, como o uso prévio de tanques de habituação, o tipo de alimentação, as condições do ambiente de teste, a origem dos animais (se provenientes de criações laboratoriais ou coletados na natureza), bem como a presença e a proximidade de pesquisadores durante os experimentos.

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais avaliadas, o extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* não promoveu alterações comportamentais compatíveis com efeito ansiolítico no teste claro-escuro em peixe-zebra. Em contrapartida, na primeira etapa experimental, o óleo essencial promoveu aumento do tempo de permanência no compartimento claro e da latência para a primeira entrada no compartimento escuro sem alterar a atividade locomotora dos animais, caracterizando uma resposta comportamental compatível com possível efeito ansiolítico.

Entretanto, esse efeito não foi reproduzido na segunda etapa experimental, conduzida para investigação do mecanismo de ação utilizando antagonistas farmacológicos. A ausência de reprodução da resposta inicialmente observada impossibilitou avaliar de forma conclusiva a participação dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico por meio dos antagonistas farmacológicos empregados.

Dessa forma, embora os resultados iniciais indiquem potencial atividade neurocomportamental do óleo essencial de *E. uniflora*, os achados não permitem confirmar, nas condições experimentais empregadas, um efeito ansiolítico reprodutível ou estabelecer os mecanismos farmacológicos envolvidos. Estudos adicionais, com maior padronização das condições experimentais e caracterização química do óleo essencial utilizado, são necessários para confirmar a reprodutibilidade do efeito observado e investigar seus possíveis mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

AL SHURAIQI, A.; AL-HABSI, A.; BARRY, M. J. Time-, dose- and transgenerational effects of fluoxetine on the behavioural responses of zebrafish to a conspecific alarm substance. **Environ Pollut**, v. 270, p. 116164, 2021.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; INTERNATIONAL NATURAL PRODUCT SCIENCES TASKFORCE; SUPURAN, C. T. Natural products in drug Discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

AZIZI, M.; KHANI, S.; KAMALI, M.; ELYASI, F. The Efficacy and Safety of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors in the Treatment of Menopausal Hot Flashes: A Systematic Review of Clinical Trials. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 47, n. 3, 2022.

BLASER, R. E.; PEÑALOSA, Y. M. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 831-837, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 7. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2024.

BRUDER-NASCIMENTO, T.; CAMPOS, D. H. S. C.; CICOGNA, A. C.; CORDELLINI, S. Estresse crônico melhora a função vascular dependente de NO e fluxo de Ca2+: Um estudo farmacológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 104, n. 3, p. 226-233, 2015.

CABRAL JÚNIOR, J. B.; LUCENA, R. L. Análises das precipitações pelos testes não paramétricos de Mann-Kendall e Kruskal-Wallis. **Mercator**, v. 9, 2020

CHAHARDEHI, A. M.; HOSSEINI, Y.; MAHDAVI, S. M.; NASEH, I. Zebrafish, a biological model for pharmaceutical research for the management of anxiety. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 4, p. 3863-3872, 2023.

COHEN, S. D.; CUKOR, D.; KIMMEL, P. L. Anxiety in Patients Treated with Hemodialysis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 12, p. 2250-2255, 2016.

COLUCCI-D'AMATO, L.; SPERANZA, L.; VOLPICELLI, F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, 2020.

CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. **The Lancet**, v. 388, p. 3048-3059, 2016.

DA COSTA, J. S.; BARROSO, A. S.; MOURÃO, R. H, V.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; FIGUEIREDO, P. L. B. Seasonal and Antioxidant Evaluation of Essential Oil from *Eugenia uniflora* L., Curzerene-Rich, Thermally Produced in Situ. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.

DEAN, E. Anxiety. **Nursing standard**, v. 30, n. 46, 2016.

DINIZ, J. P.; NEVES, S. A. O.; VIEIRA, M. L. Ação dos Neurotransmissores Envolvidos na Depressão. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 4, p. 437-443, 2020.

EGAN, R. J.; BERGNER, C. L.; HART, P. C.; CACHAT, J. M.; CANAVELLO, P. R.; ELEGANTE, M. F.; ELKHAYAT, S. I.; BARTELS, B. K.; TIEN, A. K.; TIEN, D. H.; MOHNOT, S.; BEESON, E.; GLASGOW, E.; AMRI, H.; ZUKOWSKA, Z.; KALUEFF, A. V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38-44, 2009.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. **Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa**. 1 ed, São Paulo: CEUA/UNIFESP, 2019.

FLORES, N. P.; BONA, N. P.; KUDUVICO, K. P.; CARDOSO, J. S.; SOARES, M. S. P.; GAMARO, G. D.; SPANEVELLO, R. M.; LENCINA, C. L.; GAZAL, M.; STEFANELLO, F. M. *Eugenia uniflora* fruit extract exerts neuroprotective effect on chronic unpredictable stress-induced behavioral and neurochemical changes. **Journal Food Biochemistry**, v. 44, n. 10, e13442, 2020.

FONTANA, B. D.; ALNASSAR, N.; PARKER, M. O. The zebrafish (Danio rerio) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light-dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 239, n. 1, p. 287-296, 2021.

FRANZOLIN, M. R.; COURROL, D. D. S.; DE SOUZA BARRETO, S.; COURROL, L. C. E*ugenia uniflora* L. Silver and Gold Nanoparticle Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Photoreduction Process in Antimicrobial Activities. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, 2022.

GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and diferences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480-486, 2011.

GONÇALVES, M. J. M.; CARDOSO, M. P.; KHOURI, A. G.; SANTOS, S. O. Inibidores seletivos da recaptação de serotonina: uma opção segura no tratamento da depressão em idosos. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás**, v. 2, n. 1, p. 126-134, 2019.

GOYATÁ, S. L. T.; AVELINO, C. C. V.; SANTOS, S. V. M.; SOUZA JR, D. I.; GURGEL, M. D. S. L.; TERRA, F. S. Effects from acupuncture in treating anxiety: integrative review. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, n. 3, p. 564-571, 2016.

HACKE, A. C. M.; MIYOSHI, E.; MARQUES, J. A.; PEREIRA, R. P. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (Danio rerio). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, 2020.

ISMAIL, H. F.; HASHIM, Z.; SOON, W. T.; RAHMAN, N. S. A.; ZAINUDIN, A. N.; MAJID, F. A. A. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 452-465, 2017.

JOHNSON, A.; LOH, E.; VERBITSKY, R.; SLESSOR, J.; FRANCZAK, B. C.; SCHALOMON, M.; HAMILTON, T. J. Examining behavioral test sensitivity and locomotor proxies of anxiety-like behavior in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 13, n. 3768, 2023.

KANDOLA, A.; VANCAMPFORT, D.; HERRING, M.; REBAR, A.; HALLGREN, M.; FIRTH, M.; STUBBS, B. Moving Beat Anxiety: Epidemiology and Therapeutic Issues with Physical Activity for Anxiety. **Current Psychiatry Reports**, v. 20, n. 8, 2018.

KENDA, M.; GLAVAČ, N. K.; NAGY, M.; DOLENC, M. S. Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: An Update. **Molecules**, v. 27, n. 18, 2022.

LAKSHMANAGOWDA, N. K.; SAGAR, N.; PUTTASIDDAIAH, R.; SRIDHAR, K.; RAGHAVENDRA, V. B.; BHASWANT, M. *Benincasa hispida* Alleviates Stress and Axiety in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model. **Life (Basel)**, v. 14, n. 3, 2024.

LELIS, K. C.; BRITO, R. V.; PINHO, S.; PINHO, L. Sintomas de depressão, ansiedade e uso de medicamentos em universitários. **Revista Portuguesa de Enfermagem de Saúde Mental**, v. 23, p. 9-14, 2020.

MANSUR, B. M.; SANTOS, B. R.; GOUVEIA JR, A. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, *Danio rerio*. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 1, p. 87-93, 2014.

MAXIMINO, C.; BRITO, T. M.; BATISTA, A. W. S.; HERCULANO, A. M.; MORATO, S.; GOUVEIA JR, A. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioral Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157-171, 2010.

MAXIMINO, C.; PUTY, B.; BENZECRY, R.; ARAÚJO, J.; LIMA, M. G.; BATISTA, E. J. O.; OLIVEIRA, K. R. M.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; HERCULANO, A. M. Role of serotonin in zebrafish (Danio rerio) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83-87, 2013.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos**. Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 21, p. 24-40, 1999.

NAÇÕES UNIDAS. OMS alerta para aumento de casos de ansiedade e depressão no mundo**. ONU News**, 23 set. 2025. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2025/09/1850854>. Acesso em: 23 out. 2025.

NAKAYAMA, J.; TAN, L.; LI, Y.; GOH, B. C.; WANG, S.; MAKINOSHIMA, H.; GONG, Z. A zebrafish embryo screen utilizing gastrulation identifies the HTR2C inhibitor pizotifen as a suppressor of EMT-mediated metastasis. **eLife**, v. 10, e70151, 2021.

NÄSLUND, J.; LANDIN, J.; HIERONYMUS, F.; BANOTE, R. K.; KETTUNEN, P. Anxiolytic-like effects of acute serotonina-releasing agentes in zebrafish models of anxiety: experimental study and systematic review. **Acta Neuropsychiatrica**, 37:e35, 2024.

OLIVEIRA, P. S.; CHAVES, V. C.; BONA, N. P.; SOARES, M. S. P.; CARDOSO, J. S.; VASCONCELLOS, F. A.; TAVARES, R. G.; VIZZOTO, M.; DA SILVA, L. M. C.; GRECCO, F. B.; GAMARO, G. D.; SPANEVELLO, M.; LENCINA, C. L.; REGINATTO, F. H.; STEFANELLO, F. M. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 92, p. 935-941, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório Mundial de Saúde Mental: Transformando a saúde mental para todos**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2022.

PILLINGER, T.; HOWES, O. D.; CORRELL, C. U.; LEUCHT, S.; HUHN, M.; SCHNEIDER-THOMA, J.; GAUGHRAN, F.; JAUHAR, S.; MCGUIRE, P. K.; TAYLOR, D. M.; YOUNG, A. H.; MCCUTCHEON, R. A. Antidepressant and antipsychotic side-effects and personalized prescribing: a systematic review and digital tool development. **The Lancet Psychiatry**, v. 10, n. 11, p. 860-876, 2023.

SACKERMAN, J.; DONEGAN, J. J.; CUNNINGHAM, C. S.; NGUYEN N. N.; LAWLESS, K.; LONG, A.; BENNO, R. H.; GOULD, G. G. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of Danio rerio Line. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 1, p. 43-61, 2010.

SAVALL, A. S. P.; MELLO, J. D.; FIDELIS, E. M.; BORTOLOTTO, V. C.; DAHLEH, M. M. M.; GUERRA, G. P.; PRIGOL, M; PUNTEL, R; BOLDORI, J. R.; DENARDIN, C. C.; SAMPAIO, T. B.; PINTON, S. *Eugenia uniflora* Effects on the Depressive-like Behavior of MPTP-Exposed Female Rats: Apoptosis and α-Synuclein Modulation. **Brain Sciences**, v. 15, n. 41, 2025.

SCHAFFKA, V. M. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Eugenia uniflora* L.** 2024. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2024. Disponível em: <https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UEPG_186c8c975cd6440437a021138783acf8>. Acesso em: 17 jul. 2026

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. *In:* RESENDE, R. R (org.). **Biotecnologia aplicada à saúde:** fundamentos e aplicações. São Paulo: Blucher, 2015. v. 1, cap. 1, p. 15-56.

SILVA, M. V.; SILVA, J. L.; GUEDES, J. P. Riscos associados ao uso abusivo de benzodiazepínicos: uma revisao de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, e131111537040, 2022.

SILVA, O. F.; LEANIZ, C. G.; FREIRE, F. A. M.; SILVEIRA, V. A. M.; LUCHIARI, A. C. Different housing conditions for zebrafish: What are the effects? **Behavioural Processes**, v. 209, e104886, 2023.

SOBEH, M.; HAMZA, M. S.; ASHOUR, M. L.; ELKHATIEB, M.; EL RAEY, M. A.; ABDEL-NAIM, A. B.; WINK, M. A Polyphenol-Rich Fraction from *Eugenia uniflora* Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 13, n. 5, 2020.

VICTORIA, F. N.; BRAHM, A. S; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Involvement of serotoninergic and adrenergic systems on antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, v. 544, p. 105-106, 2013.

WANG, N.; LIAN, J.; CAO, Y.; MUHEYATI, A.; YUAN, S.; MA, Y.; ZHANG, S.; YU, G.; SU, R. High-Dose Benzodiazepines Positively Modulate $GABA_A$ Receptors via a Flumazenil-Insensitive Mechanism. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 1, 2021.

WOHLEB, E. S.; FRANKLIN, T.; IWATA, M.; DUMAN, R. S. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2016.

WOLGENSINGER, L. Cognitive behavioral group therapy for anxiety: recent developments. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 347-351, 2015.

XIA, G.; HAN, Y.; MENG, F.; ELE, Y. L.; SRISAI, D.; FARIAS, M.; DANG, M.; PALMITER, R. D.; XU, Y.; WU, Q. Reciprocal control of obesity and anxiety-depressive disorder via a GABA and serotonin neural circuit. **Mol Psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 2837-2853, 2021.

ZHANG, S.; LIU, X.; SUN, M.; ZHANG, Q.; LI, T.; LI, X.; XU, J.; ZHAO, X.; CHEN, D.; FENG, X. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). **Behavioral and Brain Functions**, v. 14, n. 1, 2018.

ZHAO, H.; ZHOU, M.; LIU, Y.; JIANG, J.; WANG, Y. Recent advances in anxiety disorders: Focus on animal models and pathological mechanisms. **Animal models and experimental medicine**, v. 6, n. 6, p. 559-572, 2023.