



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Rede Nordeste de Biotecnologia - Renorbio

**Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e
do seu complexo de inclusão - β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina**

George Laylson da Silva Oliveira

Teresina - Pi

2019

GEORGE LAYLSON DA SILVA OLIVEIRA

Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo de inclusão - β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia com sede na Universidade Federal do Piauí e ponto focal na Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

Coorientadora: Dra. Chistiane Mendes Feitosa

Teresina - Pi

2019

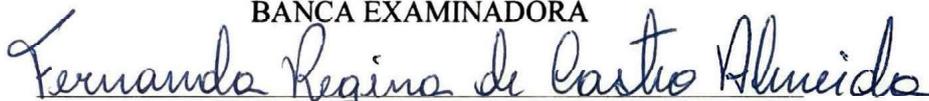
GEORGE LAYLSON DA SILVA OLIVEIRA

**Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e
do seu complexo de inclusão - β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina**

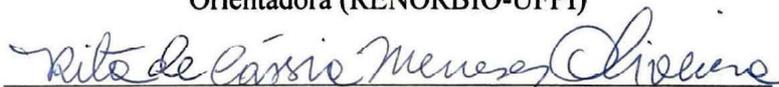
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Rede Nordeste de
Biotecnologia com sede na Universidade Federal
do Piauí e ponto focal na Universidade Federal do
Piauí, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 10 / 06 / 2019

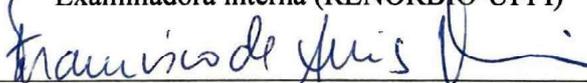
BANCA EXAMINADORA



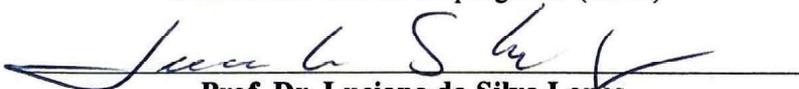
Prof. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida
Orientadora (RENORBIO-UFPI)



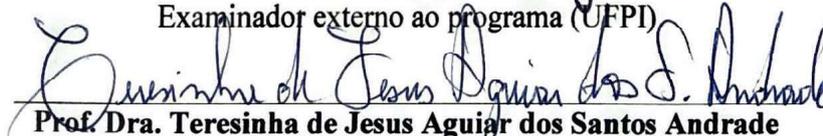
Prof. Dra. Rita de Cassia Meneses Oliveira
Examinadora interna (RENORBIO-UFPI)



Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira
Examinador externo ao programa (UFPI)



Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes
Examinador externo ao programa (UFPI)



Prof. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade
Examinador externo ao programa (IFMA)

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

O48e Oliveira, George Laylson da Silva.
Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo de inclusão - β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina / George Laylson da Silva Oliveira. – 2019.
172 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida”.
“Coorientadora: Dra. Chistiane Mendes Feitosa”.

1. β -cariofileno. 2. L-arginina-óxido nítrico. 3. metil- β -ciclodextrina. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 660.6

“Faça a sua parte, independentemente do reconhecimento, porque a maior recompensa sempre será a sua consciência de dever cumprido”

Flávio Augusto da Silva (Geração de valor)

“Espelhe-se nos que superaram grandes adversidades e você vai aumentar suas chances de aprender seus caminhos”

Flávio Augusto da Silva (Geração de valor)

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus familiares como maior exemplo de educadores e pela dedicação, esforço, responsabilidade e dignidade. Aos amigos que participaram de forma direta ou indiretamente e ao professor **Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (In memoriam)**.*

Agradecimentos

A Deus e a minha família.

*Ao professor **Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (In memoriam)**, as professoras **Dra. Chistiane Mendes Feitosa** e **Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida** pela parceria, pelo conhecimento repassado e pelas orientações.*

*A **Dr. Ana Paula dos Santos C. L da Silva** pelo imenso apoio e contribuições no desenvolvimento deste trabalho*

*À **Me. Keylla Conceição Machado, Me. Kátia Conceição Machado, Me. Oskar Almeida Silva, Dr. Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Dr. Pauline Sousa dos Santos** pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.*

*À toda a família do Laboratório de Farmacologia da Dor (LAFDor), **Everton Lopes, Celyane Piauilino, Marluce Lima, Ana Rita, Carlos Filho, Flaviano Pinheiro, Laércio Gomes e Boris Acha** pela recepção, ajuda, trocas de experiências e tornar o ambiente de trabalho bem mais agradável.*

*À **Universidade Federal do Piauí** e a coordenação do **Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO** - Ponto Focal – PI pelas oportunidades proporcionadas.*

*Às agências de fomento à pesquisa: **CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e **FAPEPI** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.*

*Aos **membros da banca** por se disponibilizarem gentilmente para avaliação deste estudo.*

*Agradeço a **todas as pessoas** que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.*

RESUMO

OLIVEIRA, G.L.S. **Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo de inclusão- β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina**. 2019. 172p. Orientador: Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO). Ponto focal, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, Piauí.

O β -cariofileno ([[(1R,4E,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno]]) é um sesquiterpeno bicíclico com importante papel na química dos sesquiterpenóides que pode ser usado como aditivo alimentar e que apresenta várias atividades farmacológicas *in vivo* e *in vitro*. Esse sesquiterpeno natural têm atraído demasiado interesse do ponto de vista químico, diversidade estrutural, quimiotaxonômico e principalmente porque apresentam atividades farmacológicas direcionadas aos distúrbios do sistema nervoso central (epilepsia, depressão, ansiedade e doenças neurodegenerativas). No entanto, poucas informações toxicológicas têm sido relatadas e seu uso é baseado no fato de que esse sesquiterpeno bicíclico é diariamente consumido como alimento vegetal em quantidades muito maiores do que como um aditivo alimentar. Dessa forma, estudos toxicológicos que visam avaliar possíveis efeitos adversos é de suma importância. Adicionalmente, estudos além do toxicológico destacam a necessidade de avaliações experimentais contínuas para determinar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos farmacológicos do β -cariofileno em relação à doenças do sistema nervoso central como ansiedade, depressão e epilepsia. Assim, o presente estudo avaliou primeiramente a toxicidade aguda (dose única) e em doses repetidas (28 dias) do β -cariofileno administrado por via oral nas doses de 300 e 2000 mg/kg em camundongos *Swiss* fêmeas analisando alterações no peso corporal, consumo de alimento, ingestão de água, parâmetros hematológicos e bioquímicos, peso de órgãos após necropsia, biomarcadores de estresse oxidativo e histopatologia de vários tecidos vitais. O estudo de toxicidade aguda (300 e 2000 mg/kg) e em doses repetidas (300 e 2000 mg/kg) foram realizados de acordo com a diretriz 423 e 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), respectivamente. Já o potencial neurofarmacológico do β -cariofileno (100, 200 e 400 mg/kg) foi avaliado por modelos experimentais usando o teste do campo aberto, rota rod, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda e nado forçado, bem como os modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida. Adicionalmente, o modelo experimental de depressão induzido por dor neuropática foi utilizado para determinar o potencial antidepressivo do β -cariofileno livre (100 e 200 mg/kg) e β -cariofileno complexado com metil- β -ciclodextrina (50 e 100 mg/kg). É importante destacar que o β -cariofileno apresenta algumas características como volatilidade e baixa solubilidade em água, sendo que técnicas como complexações com ciclodextrinas pode melhorar a solubilidade, estabilidade e liberação controlada desse sesquiterpeno. O método de liofilização foi utilizado no presente estudo para obtenção do complexo de inclusão do β -cariofileno com metil- β -ciclodextrina após a preparação da mistura física num almofariz na proporção molar 1:1 (β -cariofileno e metil- β -ciclodextrina). Os resultados obtidos destacaram ausência de sinais clínicos adversos e mortalidade em qualquer animal submetido ao estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas. Além disso, não foram observadas alterações significativas no peso corporal, biomarcadores oxidativos (catalase, superóxido dismutase e peroxidação lipídica), parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina) e bioquímicos (glicose, ureia, creatinina e ácido úrico) quando comparado com o grupo controle do estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas. As observações dos efeitos neurofarmacológicos resultaram na possível compreensão dos mecanismos neuromoleculares subjacentes às propriedades ansiolíticas e anticonvulsivantes que podem envolver os receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, uma

vez que o pré-tratamento do β -cariofileno (200 mg/kg) com flumazenil (reconhecido antagonista do receptor benzodiazepínico) ou bicuculina (antagonista do receptor GABA_A) reestabeleceu os parâmetros de ansiedade no labirinto em cruz elevado, bem como os resultados de redução da latência para consumir o alimento no teste da alimentação suprimida pela novidade. No mesmo teste usando outro grupo de animais, as propriedades farmacológicas do β -cariofileno podem estar relacionadas a inibição da síntese de óxido nítrico, uma vez que o pré-tratamento com L-arginina reverteu significativamente os resultados ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivantes do β -cariofileno (200 mg/kg) ($p < 0,05$). Adicionalmente, os resultados obtidos nas propriedades neurofarmacológicas sugerem que os receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{2A} e 5-HT₃ não estão envolvidos nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes do β -cariofileno. Além dos resultados já abordados, foi demonstrado que o β -cariofileno complexado (100 mg/kg) quando administrado em camundongos *Swiss* com constrição do nervo ciático e comportamento semelhante à depressão quando verificado pelo aumento do tempo total de imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado, foi mais efetivo no efeito antidepressivo com uma dose inferior ao β -cariofileno não complexado ou livre (200 mg/kg). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo destacam uma premissa interessante no possível uso do complexo de inclusão β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de dosagem oral com biodisponibilidade aumentada em propriedades antidepressivas.

Palavras-chave: β -cariofileno, L-arginina-óxido nítrico, metil- β -ciclodextrina, receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, toxicidade.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G.L.S. **Non-clinical toxicological and neuropharmacological studies of β -caryophyllene and its β -caryophyllene/methyl- β -cyclodextrin inclusion complex.** 2019. 172p. Advisor: Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida. Thesis (Post-Graduate Studies in Biotechnology, Northeast Network of Biotechnology - RENORBIO), Focal point, Federal University of Piauí - UFPI, Teresina, Piauí.

β -caryophyllene [(1*R*,4*E*,9*S*)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo [7.2.0]undec-4-ene] is a bicyclic sesquiterpene with an important role in sesquiterpenoid chemistry that can be used as a food additive and has various pharmacological activities *in vivo* and *in vitro*. This natural sesquiterpene has attracted too much interest from the chemical point of view, structural diversity, chemotaxonomic and mainly because they present pharmacological activities directed to central nervous system disorders (epilepsy, depression, anxiety and neurodegenerative diseases). However, little toxicological information has been reported and its use is based on the fact that this bicyclic sesquiterpene is daily consumed as a plant food in much larger quantities than as a food additive. Thus, toxicological studies aimed at evaluating possible adverse effects is of paramount importance. Additionally, studies beyond toxicology highlight the need for ongoing experimental evaluations to determine the molecular mechanisms underlying the pharmacological effects of β -caryophyllene in relation to central nervous system disorders such as anxiety, depression and epilepsy. Therefore, the present study evaluated the acute toxicity (single dose) and repeated doses (28 days) of β -caryophyllene administered orally in female Swiss mice analyzing changes in body weight, feed intake, water intake, hematological and biochemical parameters and organ weight after necropsy, oxidative stress biomarkers and histopathology of various vital tissues. The acute toxicity study using (300 and 2000 mg/kg) and repeated doses (300 and 2000 mg/kg) were performed according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines 423 and 407 respectively. The neuropharmacological potential of β -caryophyllene (100, 200 and 400 mg/kg) was evaluated using animal models in the open field test, rotated rod, elevated plus maze, tail suspension and forced swimming, as well as models of epileptic seizures induced by pilocarpine, pentylentetrazol and isoniazid. Additionally, the animal model of depression induced by neuropathic pain was used to determine the antidepressant potential of free β -caryophyllene (100 and 200 mg/kg) and complex β -caryophyllene with methyl- β -cyclodextrin (50 and 100 mg/kg). It is important to highlight that β -caryophyllene displays some characteristics such as volatility and low solubility in water, and techniques such as complexation with cyclodextrins can improve the solubility, stability and controlled release of this sesquiterpene. The lyophilization method was used in the present study to obtain the inclusion complex of β -caryophyllene with methyl- β -cyclodextrin after preparation of the physical mixture in a 1:1 molar ratio (β -caryophyllene and methyl- β -cyclodextrin) in mortar. The results showed the absence of adverse clinical signs and mortality in any animal that went through a single dose and repeated dose toxicity study. In addition, no significant changes in body weight, oxidative biomarkers (catalase, superoxide dismutase and lipid peroxidation), hematological parameters (erythrocytes, leukocytes, platelets, hemoglobin) and biochemical parameters (glucose, urea, creatinine and uric acid) were observed when compared with the control group of single-dose and repeat-dose toxicity study. Observations of neuropharmacological effects have resulted in a possible understanding of the neuromolecular mechanisms underlying anxiolytic and anticonvulsant properties that may involve benzodiazepine/GABAergic receptors, since pretreatment of β -caryophyllene (200 mg/kg) with flumazenil (a recognized antagonist of benzodiazepine receptor) or bicuculline (GABA_A receptor antagonist) reestablished the anxiety parameters in the elevated plus maze, as well as

the results of reduced food consumption latency in the novelty suppressed feeding test. In the same test using another group of animals, the pharmacological properties of β -caryophyllene may be related to inhibition of nitric oxide synthesis, since pretreatment with L-arginine significantly reversed anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant results of caryophyllene (200 mg/kg) ($p < 0,05$). Additionally, the results obtained in the neuropharmacological properties suggest that 5-HT_{2A} and 5-HT₃ serotonergic receptors are not involved in the anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant properties of β -caryophyllene. In addition to the results already discussed, it has been shown that complexed β -caryophyllene (100 mg/kg) when administered in *Swiss* mice with sciatic nerve constriction and behavior similar to depression-like behavior when verified by increasing the total immobility time in the tail suspension and forced swimming test was more effective in antidepressant effect at a dose lower than uncomplexed or free β -caryophyllene (200 mg/kg). Thus, the results obtained in the present study highlight an interesting premise on the possible use of the β -caryophyllene/methyl- β -cyclodextrin inclusion complex for the development of oral dosage forms with increased bioavailability in antidepressant properties.

Keywords: β -caryophyllene, *Swiss* mice, benzodiazepine/GABAergic receptors, L-arginine-nitric oxide, methyl- β -cyclodextrin, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Representação esquemática das atividades experimentais desenvolvidas...	25
--	----

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: População com transtornos de ansiedade em 2016.....	31
Figura 2: Representação resumida da síntese do óxido nítrico (NO) realizada pelo óxido nítrico sintase (NOS) e a via de sinalização L-arginina-NO-guanosina monofosfato cíclico (GMPc).....	36
Figura 3: Prevalência dos transtornos depressivos em determinadas populações em 2016....	38
Figura 4: Número total de pessoas de todas as idades com depressão diferenciadas por sexo	39
Figura 5: Organização molecular dos sistemas monoaminérgicos.....	41
Figura 6: Classificação básica das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE).....	44
Figura 7: Classificação expandida das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE).....	45
Figura 8: Estruturas químicas de benzodiazepínicos com efeito ansiolítico.....	47
Figura 9: Estruturas químicas de antidepressivos.....	50
Figura 10: Estruturas químicas de compostos antiepiléticos usados para tratar a epilepsia.....	51
Figura 11: Via geral para biossíntese dos sesquiterpenos com formação do β -cariofileno.....	53
Figura 12: Estruturas das ciclodextrinas α , β e γ com 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosídeo, respectivamente.....	56

CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno [(1 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno].....	85
Figura 2: Protocolo experimental para avaliação da toxicidade aguda em camundongos e em doses repetidas.....	87

Figura 3: Resultados do peso corporal de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) no estudo de toxicidade aguda (Figura 3A) e em doses repetidas (Figura 3B).....	92
Figura 4: Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim dos animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) após o estudo de toxicidade em doses repetidas (28 dias).....	101

CAPÍTULO II

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno [(1 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno].....	113
Figura 2: Resultados da atividade exploratória espontânea do β -cariofileno (β -CNF) e Diazepam (DZP, 5 mg/kg) no teste do campo aberto (A, B, C, D e E).....	118
Figura 3: Resultados da coordenação motora e da atividade exploratória do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 5 mg/kg) no teste rota <i>rod</i> (A e B) e de alteração da camada de maravalha (A, B e C), respectivamente.....	119
Figura 4: Resultados do efeito tipo ansiolítico do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 2 mg/kg) no teste de labirinto em cruz elevado (A, B, C e D).....	120
Figura 5: Resultados do efeito tipo ansiolítico do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 2 mg/kg) no teste da alimentação suprimida pela novidade (A e B).....	121
Figura 6: Resultados do efeito tipo antidepressivo do β -cariofileno (β -CNF) e imipramina (IMP) no teste da suspensão pela cauda (A), nado forçado (B) e borrifagem de sacarose (<i>splash test</i>) (C e D).....	124
Figura 7: Resultados da atividade anticonvulsivante do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP) nos modelos de crises epilépticas induzido por pilocarpina (A e B), pentilenotetrazol (D e E) e isoniazida (G e H).....	127

CAPÍTULO III

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno [(1 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno] e da metil- β -ciclodextrina, respectivamente.....	148
Figura 2: Representação esquemática das etapas e protocolos experimentais desenvolvidos no presente estudo.....	151
Figura 3: Resultados do limiar nociceptivo mecânico (LNM) no modelo de dor neuropática por constrição parcial do nervo ciático da pata direita.....	154

Figura 4: Resultados da atividade exploratória espontânea do β -cariofileno livre (β -CNF) e complexado com metil- β -ciclodextrina (β -CNF/M β CD) no teste do campo aberto.....	155
Figura 5: Resultados do efeito tipo antidepressivo do β -cariofileno (β -CNF) livre, complexado com metil- β -ciclodextrina (β -CNF/M β CD) e da imipramina (IMP) no teste da suspensão pela cauda (A) e nado forçado (B).....	156
Figura 6: Resultados do β -cariofileno livre (β -CNF), complexado com metil- β -ciclodextrina (complexado β -CNF/M β CD) e da imipramina (IMP) no teste de borrifagem de sacarose.....	157

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Efeitos adversos de vários compostos antiepilépticos.....	52
Tabela 2: Algumas propriedades físicas e químicas das ciclodextrinas.....	57
Tabela 3: Principais derivados das ciclodextrinas (CD).....	59

CAPÍTULO I

Tabela 1: Efeitos do β -cariofileno em animais durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	90
Tabela 2: Efeitos do β -cariofileno (β -CFN) na toxicidade motora em animais submetidos ao estudo de (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	91
Tabela 3: Resultados do consumo de ração, água, formação de urina e fezes de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	93
Tabela 4: Resultados do peso absoluto e relativo dos órgãos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	95
Tabela 5: Resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	96
Tabela 6A: Resultados da urinálise dos grupos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	97
Tabela 6B: Resultados da urinálise dos grupos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....	98
Tabela 7: Análise histopatológica de órgãos dos animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) na toxicidade em doses repetidas (H e E x 100).....	99

CAPÍTULO II

Tabela 1: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) no teste de labirinto em cruz elevado.....	121
Tabela 2: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) no teste da alimentação suprimida pela novidade.....	123
Tabela 3: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) no teste da suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose.....	126
Tabela 4: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) na atividade anticonvulsivante nos modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β -CNF/M β CD	Complexo de inclusão do β -cariofileno em metil- β -ciclodextrina
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AZM	Azul de metileno
β -CFN	β -cariofileno
BIC	Bicuculina
C log P	Coefficiente de partição n-octanol/água
CAT	Catalase
CB ₂	Receptor canabinoide do tipo 2
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CD	Ciclodextrinas
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CID-10	Classificação Internacional de Doenças
CGTase	Ciclodextrina glucanotransferase
CME- β -CD	6-O-carboximetil-O-etil- β -ciclodextrina
CN	Controle negativo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAT	Transportador de dopamina
DHP- β -CD	2,3-dihidroxipropil- β -ciclodextrina
DL ₅₀	Dose letal média
DM- β -CD	2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina
DMA- β -CD	2,6-di-O-metil-3-O-acetil- β -ciclodextrina
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DZP	Diazepam
E.P.M.	Erro padrão da média
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FLU	Flumazenil
HCM	Hemoglobina corpuscular média
G1- β -CD	6-O-glicosil- β -ciclodextrina

G2- β -CD	6-O-maltosil- β -ciclodextrina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GBD	Estudo Fardo Global das Doenças
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GHS	Sistema globalmente harmonizado de classificação
GTP	Guanosina trifosfato
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GSH	Glutathiona reduzida
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
HDC	Histidina decarboxilase
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IHME	Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
IMP	Imipramina
ISRNs	Inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
IVTF	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
KTS	Ketanserina
LAFDOR	Laboratório de farmacologia da dor
LAPNNEX	Laboratório de pesquisa em produtos naturais e neuroquímica experimental
L-ARG	L-arginina
L-NAME	Éster metílico de N-nitro-L-arginina
L-NOARG	N ^G -nitro-L-arginina
LNM	Limiar nociceptivo mecânico
LPC	Latência da primeira convulsão
LPM	latência de morte
M- β -CD	Metil- β -ciclodextrina
MCAO	Oclusão transitória da artéria cerebral média
MAO	Monoamina oxidase
NAN-190	Antagonista seletivo do receptor 5-HT _{1A}
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Número de entradas nos braços fechados

NET	transportador de noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOESY	Espectroscopia de efeito nuclear de <i>Overhauser</i>
NMDAR	Receptores N-metil-D-aspartato
ODN	Ondansetrona
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PTZ	Pentilenotetrazol
<i>r</i>	Correlação de Pearson
S- β -CD	β -ciclodextrina sulfatadas
SBE- β -CD	Sulfobutil éter β -ciclodextrina
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TA- β -CD	2,3,6-tri-O-acetil- β -ciclodextrina
TB- β -CD	2,3,6-tri-O-butanoil- β -ciclodextrina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS	Teste da borrifagem de sacarose
TCA	Teste do campo aberto
TM- β -CD	2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina
TNF	Teste do nado forçado
TP- β -CD	2,3,6-tri-O-propanoil- β -ciclodextrina
TPH	Triptofano hidroxilase
TSC	Teste da suspensão pela cauda
TEBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados
TV- β -CD	2,3,6-tri-O-valeril- β -ciclodextrina
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v.o.	Via oral
VCM	Volume corpuscular médio

VMAT	Transportador de monoaminas vesicular
2-HE- β -CD	2-hidroxietil- β -ciclodextrina
2-HP- β -CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
3-HP- β -CD	3-hidroxipropil- β -ciclodextrina
5-HT	5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
Referências.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	31
3.1. Ansiedade.....	31
3.2. Depressão.....	37
3.3. Epilepsia.....	43
3.4. Tratamentos farmacológicos.....	45
3.5. Terpenos.....	52
3.6. Ciclodextrinas.....	55
3.6.1. Potencial aplicação farmacológica das ciclodextrinas.....	55
Referências.....	60
4. CAPÍTULO I: Toxicologia não clínica do β-cariofileno, um canabinoide dietético: Ausência de efeitos adversos em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.....	83
Resumo.....	83
1. Introdução.....	84
2. Material e Métodos.....	85
3. Resultados.....	90
4. Discussão.....	102
5. Conclusão.....	104
Referências.....	105
5. CAPÍTULO II: Diferentes modulações neuromoleculares do β-cariofileno nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes.....	110
Resumo.....	110
1. Introdução.....	111
2. Material e Métodos.....	112
3. Resultados.....	118

4. Discussão.....	130
5. Conclusão.....	136
Referências.....	136
6. CAPÍTULO III: Efeito do tipo antidepressivo do complexo de inclusão do β-cariofileno (β-cariofileno/metil-β-ciclodextrina) em camundongos <i>Swiss</i> com depressão induzida por dor neuropática.....	144
Resumo.....	145
1. Introdução.....	146
2. Material e Métodos.....	148
3. Resultados.....	153
4. Discussão.....	158
5. Conclusão.....	159
Referências.....	160
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	166
PERSPECTIVAS.....	168
ANEXOS.....	170

1. INTRODUÇÃO

Para a indústria farmacêutica, um dos maiores desafios continua sendo o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de uma variedade de doenças. Assim, um grande esforço da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos está sendo feito em parcerias acadêmicas e a razão para a implantação destas parcerias decorre da constatação de que, apesar de grandes investimentos nas últimas décadas, o número de novos medicamentos que chegam ao mercado permanece estável a um custo extremamente alto de investimento em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D), particularmente, para o tratamento de distúrbios do Sistema Nervoso Central (epilepsia, depressão, ansiedade, esquizofrenia, doenças neurodegenerativas e outras) que afeta aproximadamente 1,5 bilhões de pessoas no mundo (GOOCH; PRACHT; BORENSTEIN, 2017; KESSELHEIM; HWANG; FRANKLIN, 2015; MARCHAND et al., 2018; WATTS, 2016).

Existe uma enorme preocupação pelo fato das grandes empresas farmacêuticas estarem reduzindo seletivamente suas divisões com finalidades de pesquisas na área da neurociência refletindo uma visão crescente de que desenvolver medicamentos neurofarmacológicos é bem mais complexo e difícil, além de demorado e caro quando comparado com outras áreas terapêuticas, o que acaba representando uma área fraca para futuros investimentos (CHOI et al., 2014; PALMER; ALAVIJEH, 2012; TRIST; COHEN; BYE, 2014). Em razão da proporção de pessoas que são afetadas, existe uma necessidade tanto clínica quanto econômica de melhorar e ampliar as formas de tratamento para distúrbios do sistema nervoso central e a preocupação devido à falta de novos medicamentos tem que resultar em um amplo incentivo para o desenvolvimento de neurofármacos com aprovação regulatória mais acelerada. Nessas condições em 2015, a câmara dos representantes dos Estados Unidos aprovou um projeto de lei denominado de Curas do Século XXI que visa permitir aumento no financiamento dos Institutos Nacionais de Saúde e que a *US Food and Drug Administration (FDA)* agilize todas as etapas de aprovação de novos medicamentos no mercado (JAFFE, 2015; JAFFE, 2017; KARANDE; TRASATTI; CHANDRA, 2015).

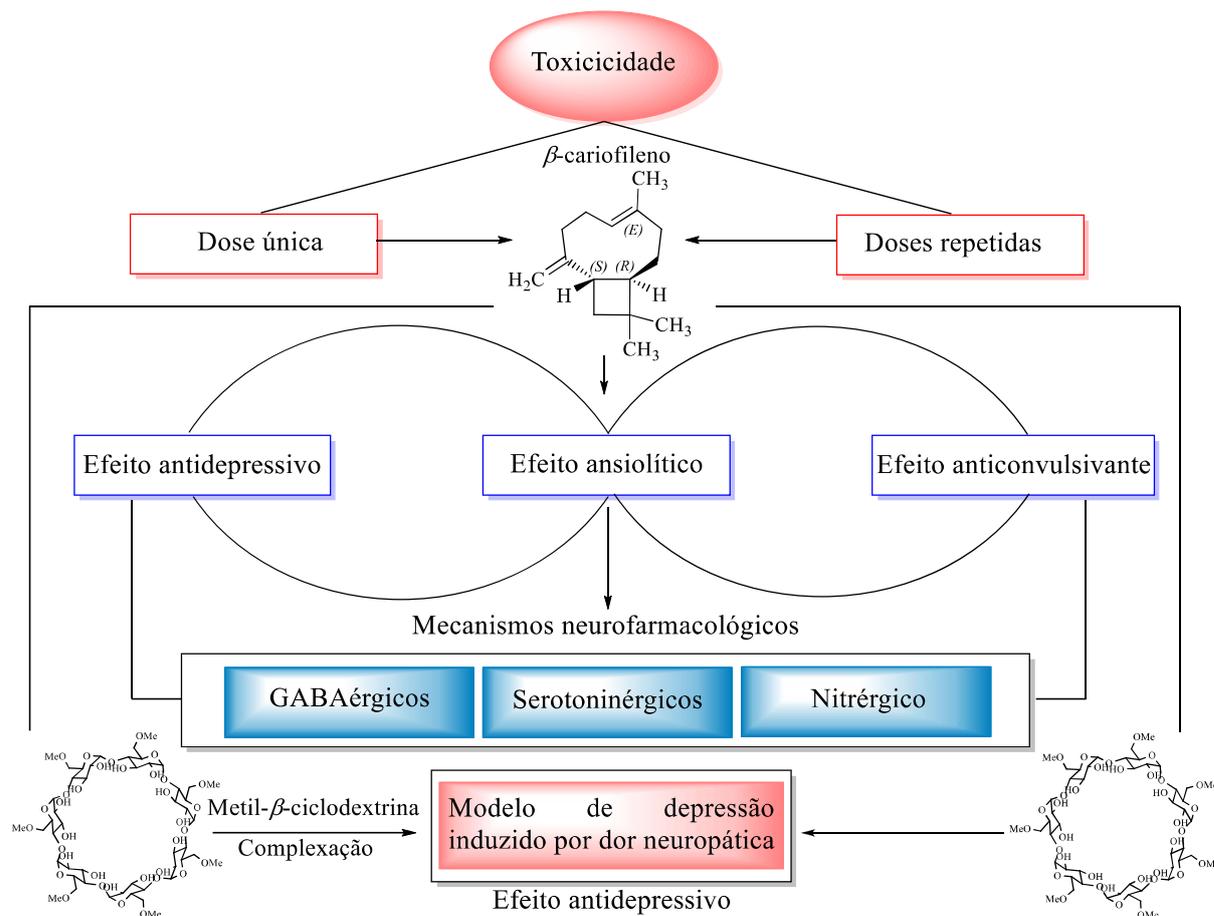
Dentre as razões para o que foi abordado no parágrafo anterior, pode ser atribuído à complexidade do sistema nervoso em que a causa de muitos distúrbios permanece ainda desconhecida, ação farmacológica específica sem causar efeitos colaterais e a necessidade de fármacos com a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica que pode restringir a interação de um determinado fármaco com o alvo do sistema nervoso central (GROENEVELD; HAY; GERVEN, 2016). Assim, essa estrutura de permeabilidade altamente seletiva representa

um grande desafio para a ação de fármacos no sistema nervoso central e por isso tem sido um foco primário no desenvolvimento de novas técnicas de administração, sendo que as limitações estabelecidas pela barreira hematoencefálica incluem o tamanho da molécula, polaridade, especificidade do substrato e os mecanismos ativos envolvidos (CARDOSO et al., 2016; CHEN; ZHAO; HU, 2019; ZHANG et al., 2016).

Os compostos naturais como os terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos) que apresentam múltiplas aplicações terapêuticas e são importantes constituintes de óleos essenciais podem ser encontrados na natureza como hidrocarbonetos ou outras formas que contém átomos de oxigênio como os álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos ou lactonas (WIART, 2014). Entre as classes de terpenos, os sesquiterpenos que são constituídos de três unidades de isopreno têm atraído demasiado interesse do ponto de vista químico, diversidade estrutural, quimiotaxonômico e principalmente porque muitos apresentam várias atividades farmacológicas direcionadas aos distúrbios do sistema nervoso central (NUUTINEN, 2018). O cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico que inclui os isômeros alfa (α), beta (β) e gama (γ). Dentre esses isômeros, o β -cariofileno [(1*R*,4*E*,9*S*)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno] representado na **Figura 1** não apresenta ligações duplas e desempenha um importante papel na química dos sesquiterpenóides. A partir das análises de composição química como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), está entre os sesquiterpeno majoritários em óleos essenciais da *Croton campestris* A. St.-Hil (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2018), *Severinia monophylla* Linn (SATYAL et al., 2019), *Baccharis amygdalina* Griseb. (ASCARI et al., 2019), *Artemisia annua* Linn. (Qinghao) (ÁVAR et al., 2012), *Cannabis sativa* Linn (IBRAHIM et al., 2019) e várias espécies do gênero *Copaifera* (ARRUDA et al., 2019).

O β -cariofileno tem demonstrado ser uma importante composto à terapia de distúrbios neurológicos, em especial a epilepsia, depressão e ansiedade por promover a diminuição da excitotoxicidade mediada pelo glutamato, ativação dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica, bem como a inibição da resposta neuroinflamatória (ASSIS et al., 2014; CHENG; DONG; LIU, 2014; GUO et al., 2014). Além disso, o β -cariofileno consegue atuar sobre o sistema endocanabinoide que desempenha um papel central na modulação limiar convulsivo que é mediada principalmente através da ativação dos receptores canabinoides (CHICCA et al., 2014; GERTSCH et al., 2008). É importante também considerar que há várias evidências de interação entre o sistema canabinoide e outros neurotransmissores, incluindo sistema serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico (GASTON; FRIEDMAN, 2017; LISBOA et al., 2017).

Figura 1: Representação esquemática das atividades experimentais desenvolvidas.



Fonte: Autoria própria

Apesar do potencial farmacológico desse sesquiterpeno, há várias limitações como baixa solubilidade em água, volátil e sofre fácil oxidação quando exposto à luz e oxigênio. Essas características físico-químicas resultam em baixa biodisponibilidade do β-cariofileno e consequentemente pode limitar a sua aplicação farmacêutica (SANTOS et al., 2017). A complexação de compostos naturais como os sesquiterpenos com ciclodextrinas naturais ou derivadas tem sido uma relevante estratégia para melhorar a solubilidade aquosa, a estabilidade, a taxa de dissolução e a biodisponibilidade (LIMA et al., 2016).

Com a capacidade de transportar compostos farmacológicos que podem ser altamente potentes e específicos, os carboidratos têm recebido considerável interesse como materiais de encapsulação devido à sua origem natural, biodegradabilidade e biocompatibilidade, bem como devido ao seu caráter hidrofílico e facilidade de modificação química combinada com baixo custo e a possibilidade de fabricação em grande escala (BUCHWALD; BODOR, 2016; VECSENYÉS et al., 2014). A aplicação desses oligossacarídeos em formulações farmacêuticas é principalmente para administração oral, parenteral, nasal ou pulmonar. Estudos

não clínicos têm demonstrado que as ciclodextrinas podem ser usadas farmacologicamente para os distúrbios do sistema nervoso central, quando considerado as suas propriedades específicas, sem comprometer com o funcionalmente normal do cérebro (CARDOSO et al., 2016; SHELLEY; BABU, 2018; ZAFAR; FESSI; ELAISSARI, 2014).

Devido a constante necessidade de estudos em prol de substâncias com potencial farmacológico para distúrbios do sistema nervoso central, um dos principais objetivos na realização desta tese de doutorado intitulado “**Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo de inclusão - β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina**”, consistiu em avaliar o potencial toxicológico e neurofarmacológico em camundongos *Swiss* fêmeas do sesquiterpeno bicíclico β -cariofileno e do seu derivado complexado em metil- β -ciclodextrina.

A presente tese de doutorado foi estruturada em 3 capítulos (artigos científicos) que destacam principalmente o potencial toxicológico e neurofarmacológico do β -cariofileno conforme a **Figura 1**. O primeiro capítulo detalha o perfil toxicológico do β -cariofileno por meio do estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas em camundongos *Swiss* analisando vários parâmetros como a toxicidade motora, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos de tecidos vitais. Já o segundo capítulo detalha as propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes em camundongos *Swiss* fêmeas, bem como os possíveis mecanismos moleculares [receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, serotoninérgicos (5-HT_{2A} e 5-HT₃) e a via da L-arginina-óxido nítrico] envolvidos nas ações neurofarmacológicas do β -cariofileno. No terceiro capítulo foi detalhado as propriedades antidepressivas do β -cariofileno livre (não complexado) e do seu complexo de inclusão com metil- β -ciclodextrina no modelo de depressão induzido por dor neuropática (constricção crônica do nervo ciático) em camundongos *Swiss*.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, C.; ALDANA MEJÍA, J. A.; RIBEIRO, V. P.; GAMBETA BORGES, C. H.; MARTINS, C. H. G.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1-20, 2019.

ASCARI, J.; DE OLIVEIRA, M. S.; NUNES, D. S.; GRANATO, D.; SCHARF, D. R.; SIMIONATTO, E.; OTUKI, M.; SOLEY, B.; HEIDEN, G. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 234, p. 1-7, 2019.

ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C.; DE BEM, A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 279, n. 0, p. 220-231, 2014.

BUCHWALD, P.; BODOR, N. Brain-Targeting Chemical Delivery Systems and Their Cyclodextrin-Based Formulations in Light of the Contributions of Marcus E. Brewster. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2589-2600, 2016.

CARDOSO, A. M.; GUEDES, J. R.; CARDOSO, A. L.; MORAIS, C.; CUNHA, P.; VIEGAS, A. T.; COSTA, R.; JURADO, A.; PEDROSO DE LIMA, M. C. Chapter One - Recent Trends in Nanotechnology Toward CNS Diseases: Lipid-Based Nanoparticles and Exosomes for Targeted Therapeutic Delivery. In: AL-JAMAL, K. T. (Ed.). **International Review of Neurobiology**: Academic Press, v.130, 2016. p.1-40.

ĆAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M.; VIDIC, D.; PARIĆ, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 479-485, 2012.

CHICCA, A.; CAPRIOGLIO, D.; MINASSI, A.; PETRUCCI, V.; APPENDINO, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; GERTSCH, J. Functionalization of β -Caryophyllene Generates Novel Polypharmacology in the Endocannabinoid System. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 7, p. 1499-1507, 2014.

CHEN, R.; ZHAO, X.; HU, K. 9 - Physically open BBB. In: GAO, H. e GAO, X. (Ed.). **Brain Targeted Drug Delivery System**: Academic Press, 2019. p.197-217.

CHENG, Y.; DONG, Z.; LIU, S. β -Caryophyllene Ameliorates the Alzheimer-Like Phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 Receptor Activation and the PPAR γ Pathway. **Pharmacology**, v. 94, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

CHOI, DENNIS W.; ARMITAGE, R.; BRADY, LINDA S.; COETZEE, T.; FISHER, W.; HYMAN, S.; PANDE, A.; PAUL, S.; POTTER, W.; ROIN, B.; SHERER, T. Medicines for the Mind: Policy-Based “Pull” Incentives for Creating Breakthrough CNS Drugs. **Neuron**, v. 84, n. 3, p. 554-563, 2014.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GASTON, T. E.; FRIEDMAN, D. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 313-318, 2017.

GOOCH, C. L.; PRACT, E.; BORENSTEIN, A. R. The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action. **Annals of Neurology**, v. 81, n. 4, p. 479-484, 2017.

GROENEVELD, G. J.; HAY, J. L.; VAN GERVEN, J. M. Measuring blood–brain barrier penetration using the NeuroCart, a CNS test battery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 20, p. 27-34, 2016.

GUO, K.; MOU, X.; HUANG, J.; XIONG, N.; LI, H. Trans-Caryophyllene Suppresses Hypoxia-Induced Neuroinflammatory Responses by Inhibiting NF- κ B Activation in Microglia. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.

HARTSEL, J. A.; EADES, J.; HICKORY, B.; MAKRIYANNIS, A. Chapter 53 - Cannabis sativa and Hemp. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Nutraceuticals**. Boston: Academic Press, 2016. p.735-754.

IBRAHIM, E. A.; WANG, M.; RADWAN, M. M.; WANAS, A. S.; MAJUMDAR, C. G.; AVULA, B.; WANG, Y.-H.; KHAN, I. A.; CHANDRA, S.; LATA, H.; HADAD, G. M.; ABDEL SALAM, R. A.; IBRAHIM, A. K.; AHMED, S. A.; ELSOHLI, M. A. Analysis of Terpenes in Cannabis sativa L. Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. **Planta Medica**, v. 85, n. 05, p. 431-438, 2019.

JAFFE, S. 21st Century Cures Act progresses through US Congress. **The Lancet**, v. 385, n. 9983, p. 2137-2138, 2015.

JAFFE, S. Experts confident of Congressional funding for US Cures Act. **The Lancet**, v. 389, n. 10065, p. 141-142, 2017.

KARANDE, P.; TRASATTI, J. P.; CHANDRA, D. Chapter 4 - Novel Approaches for the Delivery of Biologics to the Central Nervous System. In: SINGH, M. e SALNIKOVA, M. (Ed.). **Novel Approaches and Strategies for Biologics, Vaccines and Cancer Therapies**. San Diego: Academic Press, 2015. p.59-88.

LIMA, P. S. S.; LUCCHESI, A. M.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

LISBOA, S. F.; GOMES, F. V.; TERZIAN, A. L. B.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; RESSTEL, L. B. M.; GUIMARÃES, F. S. Chapter Eight - The Endocannabinoid System and Anxiety. In: LITWACK, G. (Ed.). **Vitamins and Hormones**: Academic Press, v.103, 2017. p.193-279.

KESSELHEIM, A. S.; HWANG, T. J.; FRANKLIN, J. M. Two decades of new drug development for central nervous system disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 12, p. 815-816, 2015.

MARCHAND, G. C.; HILPERT, J. C.; BRAGG, K. M.; CUMMINGS, J. Network-based assessment of collaborative research in neuroscience. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 4, p. 433-443, 2018.

NUUTINEN, T. Medicinal properties of terpenes found in Cannabis sativa and Humulus lupulus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 198-228, 2018.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. D. M.; PESSOA, R. T.; FERNANDES, M. N. M.; ALCÂNTARA, I. S.; DA SILVA, B. A. F.; DE OLIVEIRA, M. R. C.; MARTINS, A. O. B. P. B.; DA SILVA, M. D. S.; TINTINO, S. R.; RODRIGUES, F. F. G.; DA COSTA, J. G. M.;

DE LIMA, S. G.; KERNTOPF, M. R.; DA SILVA, T. G.; DE MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82-95, 2018.

PALMER, A. M.; ALAVIJEH, M. S. Translational CNS medicines research. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19, p. 1068-1078, 2012.

SANTOS, P. S.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; MEDEIROS, J. V. R.; NUNES, S. C. C.; CARVALHO, R. A.; PAIS, A. C. C.; VEIGA, F. J. B.; NUNES, L. C. C.; FIGUEIRAS, A. Methyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex with β -Caryophyllene: Preparation, Characterization, and Improvement of Pharmacological Activities. **ACS omega**, v. 2, n. 12, p. 9080-9094, 2017.

SATYAL, P.; HIEU, H. V.; CHUONG, N. T. H.; HUNG, N. H.; SINH, L. H.; VAN THE, P.; TAI, T. A.; HIEN, V. T.; SETZER, W. N. Chemical composition, *Aedes* mosquito larvicidal activity, and repellent activity against *Triatoma rubrofasciata* of *Severinia monophylla* leaf essential oil. **Parasitology Research**, *In press*, 2019.

SHELLEY, H.; BABU, R. J. Role of Cyclodextrins in Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 7, p. 1741-1753, 2018.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122-1144, 2017.

TRIST, D. G.; COHEN, A.; BYE, A. Clinical pharmacology in neuroscience drug discovery: quo vadis? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 14, p. 50-53, 2014.

VECSERNYÉS, M.; FENYVESI, F.; BÁCSKAY, I.; DELI, M. A.; SZENTE, L.; FENYVESI, É. Cyclodextrins, Blood–Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 8, p. 711-729, 2014.

WATTS, G. Drug development partnerships look set to grow. **The Lancet**, v. 388, n. 10039, 2016. p. 16-18.

WIART, C. Chapter 2 - Terpenes. In: WIART, C. (Ed.). **Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Neurodegenerative Diseases**. San Diego: Academic Press, 2014. p.189-284.

ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1, p. 351-366, 2014.

ZHANG, F.; LIN, Y.-A.; KANNAN, S.; KANNAN, R. M. Targeting specific cells in the brain with nanomedicines for CNS therapies. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 212-226, 2016.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar ensaios não clínicos do potencial toxicológico e neurofarmacológico do sesquiterpeno β -cariofileno e do seu derivado complexado em metil- β -ciclodextrina.

2.2. Objetivos Específicos

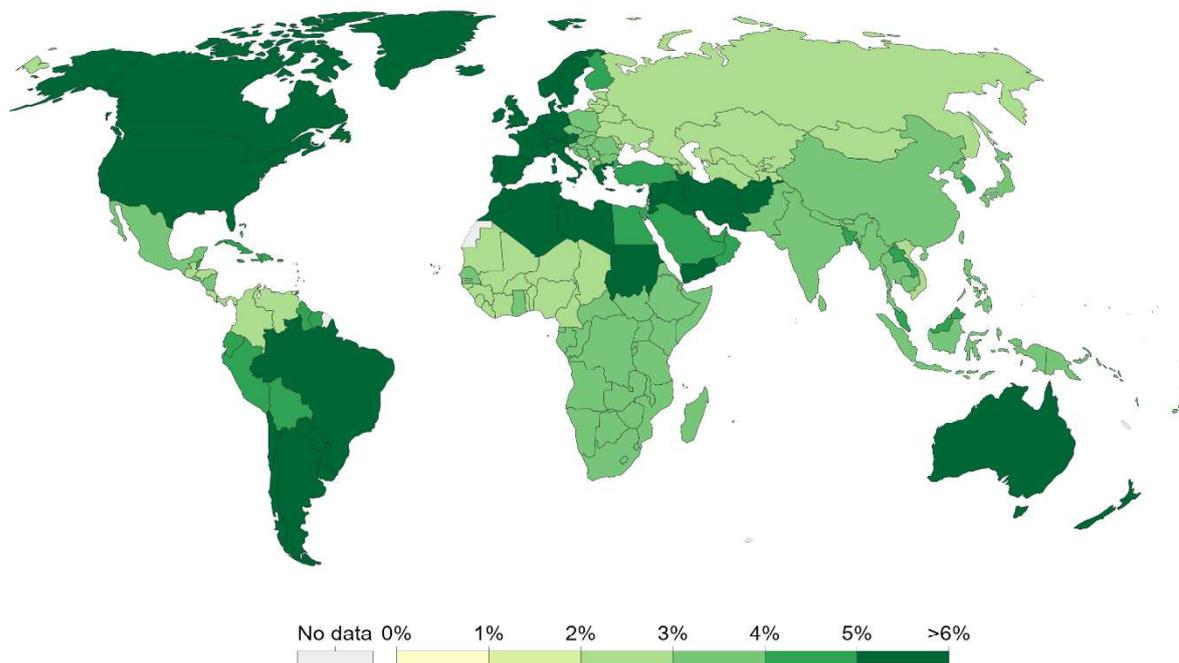
- Determinar a toxicidade em dose única (aguda) e em doses repetidas do β -cariofileno em camundongos *Swiss (Mus musculus)* pelos seguintes parâmetros: mortalidade, sinais clínicos, variações no peso corporal e no consumo de ração, água, formação de urina e fezes e patologia clínica (hematologia, bioquímica).
- Realizar a histopatologia de fígado, rim, coração e pulmão dos animais tratados com β -cariofileno (300 e 2000 mg/kg) após o estudo de toxicidade em doses repetidas, bem como os biomarcadores de estresse oxidativo (catalase, superóxido, níveis de peroxidação lipídica, nitrito e glutatona reduzida) no fígado e rim.
- Avaliar os efeitos neurocomportamentais do β -cariofileno em camundongos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas no teste do campo aberto, rota rod, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose (*splash test*).
- Investigar o efeito neuroprotetor do β -cariofileno em camundongos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas contra crises epiléticas induzida pelos quimioconvulsivantes pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida.
- Avaliar os mecanismos neurofarmacológicos do β -cariofileno mediado por receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, serotoninérgicos (5-HT_{2A} e 5-HT₃) e a via da L-arginina-óxido nítrico (NO).
- Determinar a efeito neuroprotetor do β -cariofileno livre e do seu complexo de inclusão (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina) em camundongos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas com comportamento depressivo induzido por dor neuropática (constricção crônica do nervo ciático) utilizando o teste do campo aberto, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Ansiedade

A ansiedade é uma condição neuropsiquiátrica de ocorrência comum que pode interferir tanto na saúde física quanto mental e os mecanismos neurobiológicos que estão envolvidos na gênese da ansiedade ainda são complexos. Ansiedade como uma condição neuropsiquiátrica pode incluir critérios específicos de diagnósticos, disfunções neurobiológicas e antecedentes genéticos específicos e levar a incapacidade social e ocupacional (RUSCIO et al., 2017; STEEL et al., 2014). Conforme o estudo Fardo Global das Doenças (GBD) do Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (IHME) e a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), aproximadamente 264 milhões de pessoa apresentam transtornos de ansiedade sendo estimado que os transtornos ansiedade e depressão custam à economia global US \$ 1 trilhão por ano em perda de produtividade. No Brasil em 2016, segundo o GBD, os índices indicam que 6,14% da população apresentaram transtornos de ansiedade conforme a **Figura 1**.

Figura 1: População com transtornos de ansiedade em 2016.



Fonte: Estudo sobre o Fardo Global das Doenças (GBD) (2017). Mapa retirado em 01/12/2018 a partir de <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.

Conforme o estudo de Baxter et al. (2012), foi estabelecido uma prevalência global dos transtornos de ansiedade em 7,3% sugerindo que uma para cada 14 pessoas no mundo pode ter

um distúrbio de ansiedade a qualquer momento de sua vida. Além disso, mundialmente, as mulheres são quase duas vezes mais propensas que os homens a ter um transtorno de ansiedade, sendo que em 2016 cerca de 62% (170 milhões) eram do sexo feminino em relação a 105 milhões de homens conforme o Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde e a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017; STEEL et al., 2014). É importante destacar que os transtornos de ansiedade constituem um grupo heterogêneo de transtornos mentais com etiologia e características fisiológicas diferentes que afetam a sociedade mundial crescentemente e são uma das principais causas de incapacidade física e mental. As características essenciais dos transtornos de ansiedade podem incluir ataques e transtorno de pânico, fobias excessivas e persistentes, bem como transtorno da ansiedade generalizada. Embora a neurobiologia dos transtornos de ansiedade seja ainda amplamente desconhecida, algumas generalizações foram identificadas para a maioria dos transtornos como alterações no sistema límbico (CRASKE; STEIN., 2017; DIELEMAN et al., 2015; WILLIAMS, 2016).

Além dos fatores genéticos ou disposição biológica, impacto ambiental sobre um indivíduo, eventos adversos precoces e estressores que resultam em mudanças adaptativas, os transtornos de ansiedade envolvem a modulação de uma ampla variedade de neurotransmissores químicos que incluem os peptidérgicos, neuropeptídeo com característica ansiolítica como o neuropeptídeo Y, transmissores monoaminérgicos, 5-hidroxitriptamina (5-HT), dopamina e os neurotransmissores aminoácidos ácido γ -aminobutírico (GABA) e glutamato. Além disso, um sistema adicional de neurotransmissão de moléculas e mensageiros lipídicos tem sido proposto para fundamentar os transtornos de ansiedade como o sistema endocanabinoide que apresenta novos desafios aos pesquisadores (IBARRA-LECUE et al., 2018; LUTZ et al., 2015; PATEL et al., 2017).

Substâncias químicas que são utilizadas até hoje, embora eficazes, não são isentas de certas deficiências (SAKE et al., 2018). Assim, benzodiazepínicos clássicos e os benzodiazepínicos atípicos como a buspirona são fármacos utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade, contudo que apresentam várias limitações que pode incluir o comprometimento cognitivo e de coordenação, ataxia, sedação e dependência. Nessas circunstâncias, há a necessidade de avaliar novas vias neuroquímicas para o desenvolvimento de substâncias químicas eficazes e seguras para o transtorno de ansiedade sem efeitos colaterais (CORNETT et al., 2018; PALMER; ALAVIJEH, 2012).

A partir de estudos clínicos e não clínicos, o envolvimento do sistema GABA em transtornos de ansiedade desempenha uma importante atividade, sendo que para o tratamento de curto prazo, moduladores alostéricos dos receptores ionotrópicos GABA_A, cujas

subunidades apresentam diferentes isoformas, como os benzodiazepínicos são extremamente úteis devido ao rápido início da ação ansiolítica (WATERS et al., 2018). No entanto, a maioria dos compostos que são moduladores GABAérgicos têm propriedades sedativas e possíveis abusos e dependências limitam seu uso, sendo que essas substâncias devem ser usadas com cautela em indivíduos com transtornos relacionados ao uso de álcool ou outras substâncias como moduladores negativos do receptor GABA_A que pode aumentar a ansiedade. No entanto, compostos que aumentam a transmissão GABAérgica como o tiagabina, valproato, vigabatrina podem diminuir a ansiedade (OLSEN et al., 2018; SAŁAT et al., 2015). Embora o desenvolvimento das pesquisas tenha verificado mais a atuação do GABA_A sobre a ansiedade, elementos do funcionamento do receptor GABA_B podem contribuir nos aspectos da fisiopatologia da ansiedade, sendo que estudos neurocomportamentais indicaram que os agonistas do GABA_B influenciam a ansiedade sem interferir no desempenho cognitivo e atividade locomotora. Os efeitos adversos associados ao tratamento com benzodiazepínicos incluem sonolência, tontura e particularmente em indivíduos idosos, aumento do risco de quedas (CHUA; CHEBIB, 2017; PIZZO; O'LEARY; CRYAN, 2018).

É importante destacar que o neurotransmissor excitatório glutamato pode atuar de forma coordenada com o GABA e assim desempenhar uma atividade proeminente na sinalização neuronal da ansiedade e outras doenças, sendo que a diminuição da ansiedade tem sido associada à ativação do glutamato (PITSIKAS, 2014). Sendo assim, substâncias farmacológicas voltadas para os aspectos moleculares da neurotransmissão glutamatérgica podem ser promissoras no tratamento farmacológico da ansiedade. Nessa situação, vários tipos de agentes glutamatérgicos como antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) (AP5, AP7, CGP37849, CGP39551, LY235959, NPC17742 e MK-801) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico (AMPA) (topiramato), agonistas parciais de NMDAR (D-cicloserina, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico) e vários moduladores alostéricos visando os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR1, mGluR2/3 e mGluR5) demonstraram ação semelhante aos ansiolíticos por meio de estudos em modelos animais e seres humanos (BERMUDO-SORIANO et al., 2012; FERRAGUTI, 2018; FILIPPIS et al., 2015).

Além do que foi abordado anteriormente, alterações da neurotransmissão serotoninérgica tem influência na regulação de vários processos fisiológicos que estão envolvidos no sono, apetite, termorregulação, humor, resposta ao estresse, dor, depressão e ansiedade. Esse neuromodulador monoaminérgico interage com 7 famílias dos seus receptores (5-HT₁₋₇) que podem resultar em uma variedade de efeitos farmacológicos (BEECHER; BELMER; BARTLETT, 2019; ŹMUDZKA et al., 2018). Dentre os receptores, o receptor de

serotonina 1A (5-HT_{1A}) está amplamente distribuído no cérebro dos vertebrados e tem um proeminente papel na modulação das características relacionadas aos transtornos de ansiedade como ataque e transtorno de pânico (HASSELL et al., 2017; LILLESAAR; GASPAR, 2019). Na neurotransmissão serotoninérgica, o 5-HT_{1A} atua como um autoreceptor pré-sináptico cuja ativação leva à redução do disparo de neurônios serotoninérgicos e à diminuição dos níveis de serotonina no cérebro. Adicionalmente, os heterorreceptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos estão localizados em neurônios excitatórios e inibitórios e modulam a atividade de várias estruturas límbicas envolvidas no humor e comportamento, incluindo o hipocampo, o córtex pré-frontal e amígdala (OHNO, 2019).

Em modelos genéticos, camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1A} exibiram um aumento ao estresse e ansiedade, enquanto camundongos geneticamente modificados que superexpressam o receptor 5-HT_{1A} apresentaram uma redução no comportamento de ansiedade demonstrando que a estimulação desse receptor desempenha uma importante atividade comportamental na ansiedade (DONALDSON et al., 2014). Além disso, agonista de 5-HT_{1A} como a buspirona tem a capacidade de diminuir os níveis de ansiedade em vários modelos animais como labirinto em cruz elevado, conflito de Vogel e de interação social (HORVÁTH et al., 2013; MAJERCSIK et al., 2003; OHNO, 2019).

Além do receptor 5-HT_{1A}, os receptores 5-HT₂ (5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}) e 5-HT₃ também podem contribuir na fisiopatologia da ansiedade e experimentos tanto clínicos quanto não clínicos destacam a importância desses receptores como um possível alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos ativos para transtornos que podem incluir além da ansiedade, depressão e esquizofrenia (CHAGRAOUI et al., 2016; CLINARD et al., 2015). Vários argumentos possibilitam destacar a atuação dos receptores 5-HT₂, especialmente o 5-HT_{2C}, na regulação da ansiedade como a sua ampla distribuição na região central e periférica do sistema nervoso, diminuição aparente das características de ansiedade em camundongos *knockout* para os receptores 5-HT_{2C} e a prevenção da maioria dos efeitos ansiogênicos induzidos pelo m-clorofenil-piperazina (mCPP) (um agonista parcial do 5-HT_{2C}) (CHAGRAOUI et al., 2016).

Transtornos de ansiedade como problema de saúde causa incapacidade física e mental gerando perda de produtividade e os tratamentos farmacológicos pode envolver a neurotransmissão serotoninérgica ou GABAérgica. No entanto, por constituir um grupo heterogêneo de transtornos com características fisiológicas diferentes, pode haver resistência ao tratamento com substâncias serotoninérgica e GABAérgica e o uso dessas substâncias está inclusive associado aos efeitos colaterais como dependência, abstinência, disfunção sexual e

aumento do peso corporal. Assim, depois de 60 anos da descoberta dos benzodiazepínicos, existe a necessidade não somente de novos fármacos, mas também de vias neuroquímicas alternativas como a neurotransmissão nitrérgica que emergiu como um alvo promissor, uma vez que várias pesquisas destacam que o óxido nítrico (NO), neurotransmissor gasoso que atua como mensageiro intracelular e intercelular no cérebro, está envolvido na ansiedade (BRUENIG et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2017; ORFANIDOU et al., 2017; PITSIKAS, 2018).

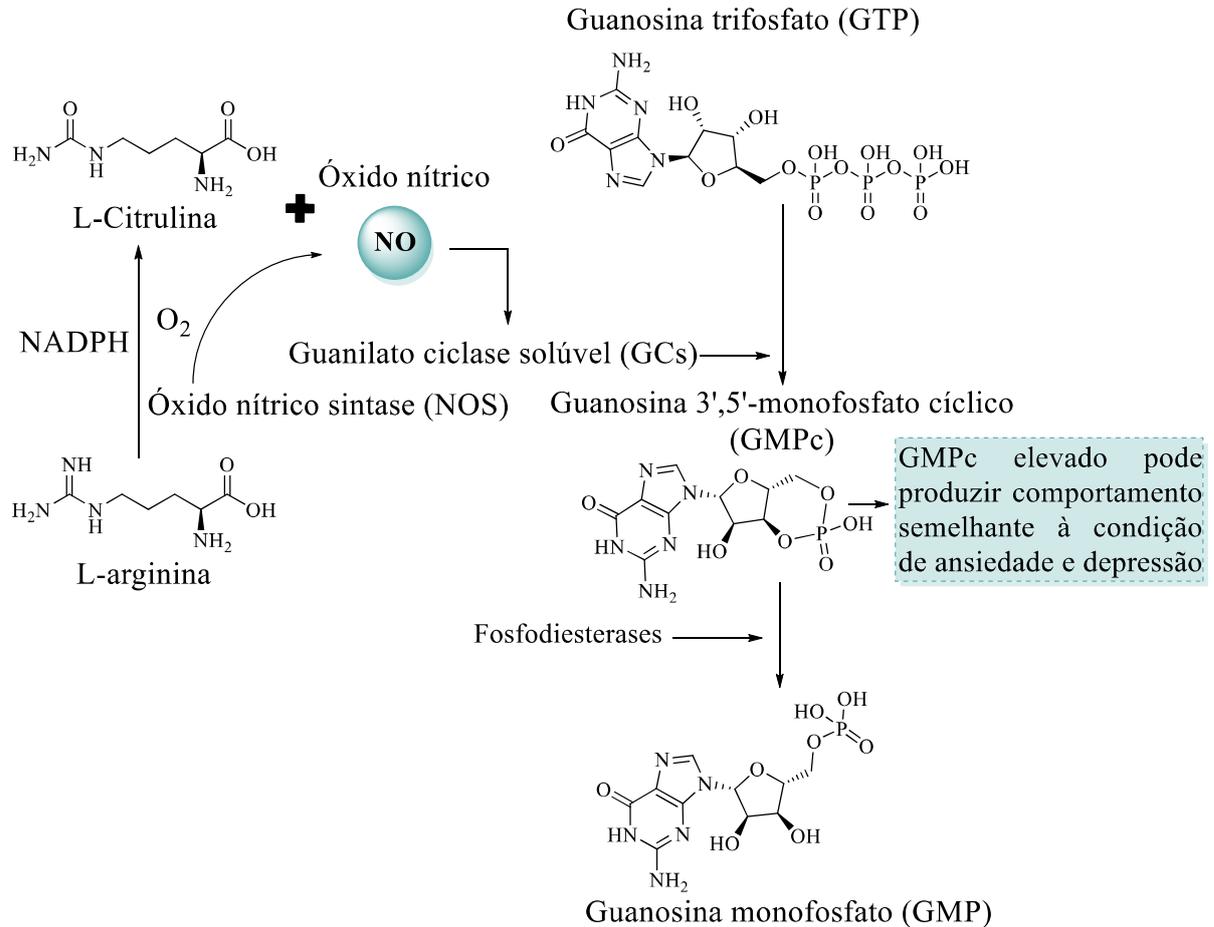
A síntese do NO conforme resumido na **Figura 2** envolve atividade enzimática que é realizada pela família de enzimas designadas por óxido nítrico sintase (NOS) que oxida a L-arginina para produzir citrulina e NO em vários tecidos (GULATI; RAY, 2017). As três isoformas do óxido nítrico sintase (NOS) são denominadas de NOS-I (nNOS), NOS-II (iNOS) e NOS-III (eNOS) com base na ordem em que foram descobertas ou identificadas em seres humanos e outros organismos. As duas isoformas constitutivas, inicialmente identificadas em neurônios (nNOS) e células endoteliais vasculares (eNOS) são reguladas por cálcio e calmodulina. Diferentemente, a outra isoforma é independente de cálcio e calmodulina e foi inicialmente identificada em macrófagos, mas pode ser expressa em resposta a citocinas inflamatórias e endotoxinas em várias outras células (KUMAR; SINGH; BHARDWAJ, 2017).

Na sinalização do óxido nítrico, a guanilato ciclase solúvel (GCs) é uma enzima heterodímera que atua como receptor intracelular para o óxido nítrico, sendo que a ativação da GCs resulta na conversão catalítica da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) que por sua vez pode atuar em vários alvos a jusante como proteína quinase dependente de GMPc (PKG), fosfodiesterases, canais de íons controlados por nucleotídeo cíclico e fatores transcricionais para iniciar subseqüentes mudanças intracelular (**Figura 2**) (CHACHLAKI; GARTHWAITE; PREVOT, 2017; TEGEDER, 2019). A decomposição do GMPc pela fosfodiesterase encerra a sinalização NO/GCs e como muitos neurotransmissores convencionais, o NO age através de segundos mensageiros (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2018).

Especificamente no sistema nervoso central de mamíferos, a nNOS está localizada principalmente em células tronco neurais, astrócitos e neurônios, sendo que alterações na expressão da nNOS foram detectadas em doenças do sistema nervoso central como depressão e ansiedade (SITUMORANG et al., 2018; ZHOU et al., 2018). O envolvimento do NO na ansiedade tem sido verificado por uma série de estudos experimentais não clínico, embora seu papel ainda não tenha sido completamente elucidado, sendo que ainda existem resultados conflitantes sobre como a ativação da via NO/GMPc proporciona um aumento ou redução do

comportamento semelhante ao da ansiedade (BRUENIG et al., 2017; KALOUDA; PITSIKAS, 2015; ORFANIDOU et al., 2017).

Figura 2: Representação resumida da síntese do óxido nítrico (NO) realizada pelo óxido nítrico sintase (NOS) e a via de sinalização L-arginina-NO-guanosina monofosfato cíclico (GMPC).



Fonte: Autoria própria

A distribuição de neurônios expressando a nNOS em áreas cerebrais como o núcleo medial da amígdala, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, hipocampo indicam o potencial do sistema nitrérgico na ansiedade. A administração aguda de 7-nitroindazole (7-NI), um inibidor seletivo da nNOS, resultou em ansiólise semelhante ao diazepam (DUNN et al., 1998; YILDIZ et al., 2000). Conforme Workman et al. (2008), a inibição da atividade da nNOS pelo tratamento com 7-NI resultou em potencial atividade ansiolítica em roedores. O tratamento sistêmico com L-NAME (éster metílico de N-nitro-L-arginina), L-NOARG (N^G-nitro-L-arginina) produziu efeito ansiolítico em roedores no comportamento exploratório no teste do labirinto em cruz elevado (VOLKE; WEGENER; VASAR, 2003). A redução da produção de

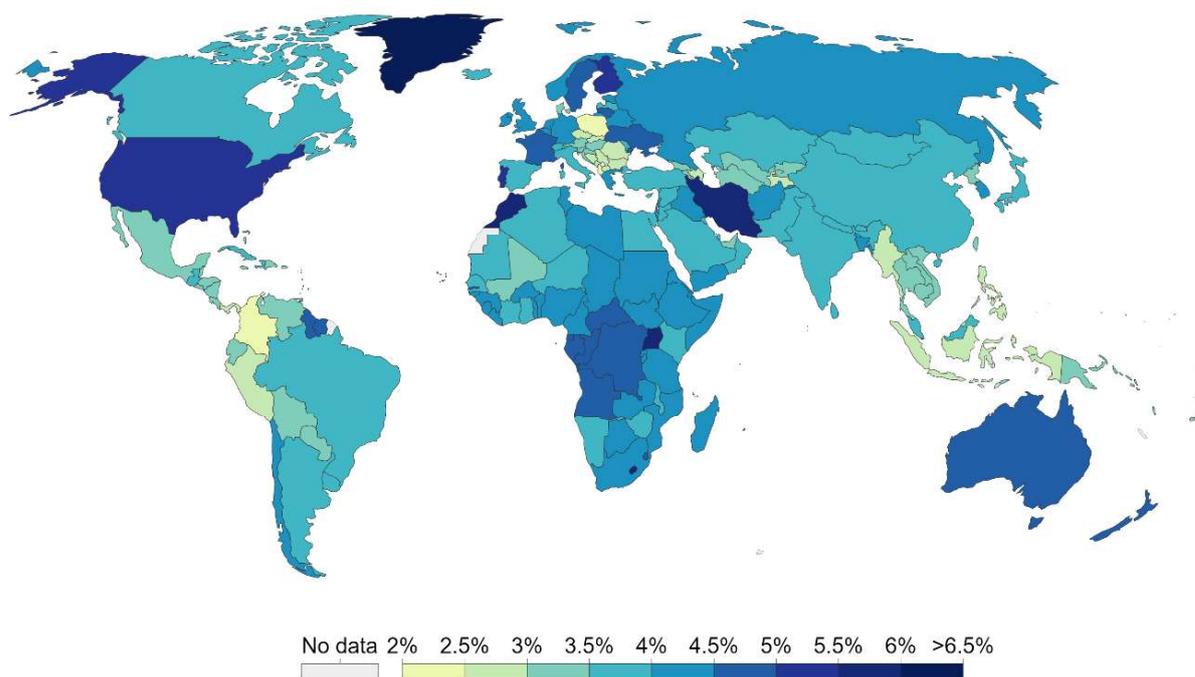
NO em áreas cerebrais de roedores pode justificar o efeito ansiolítico a partir da inibição da nNOS (JOUNG et al., 2012; WALIA; GARG; GARG, 2019).

Além de está implicado na ansiedade, é importante destacar que a via L-arginina-NO-GMP cíclico tem sido cada vez mais explorado na depressão e compostos como a venlafaxina que atua como inibidor de recaptção de serotonina/noradrenalina, bupropiona que atua como inibidor de recaptção de dopamina e imipramina produzem suas ações antidepressivas em modelos animais por modulação dessa via de sinalização (KRASS et al., 2011; KUMAR et al., 2010). Adicionalmente, tem sido verificado que o GMPc em níveis elevados resulta em comportamento semelhante à depressão e que uma diminuição de seus níveis pode produzir efeito do tipo antidepressivo (HEIBERG et al., 2002; HOLLAS et al., 2019; OSTADHADI et al., 2018).

3.2. Depressão

Dentre os transtornos mentais, os depressivos são particularmente comuns e pode afetar de 2 a 6 % da população de um determinado país, sendo bem mais altas em populações do continente Africano (**Figura 3**). É observado que desde 2005 e diferente do esperado pela Organização Mundial da Saúde, a depressão aumentou em 18,4 % e conforme a própria Organização Mundial de Saúde, a depressão foi a principal causa de perda na qualidade de vida devido a incapacidade física/mental e o quarto maior contribuinte para a carga global de doenças em 2004, com uma tendência de ser o segundo ou primeiro lugar até 2030. Mundialmente, adultos mais velhos (70 anos ou mais) apresentam um maior risco de depressão em relação às outras faixas etárias e as mulheres podem ser até três vezes mais propensas a sofrerem de depressão em relação aos homens (KAHL; STAPEL; FRIELING, 2019; MATHERS; LONCAR, 2006; OMS, 2017).

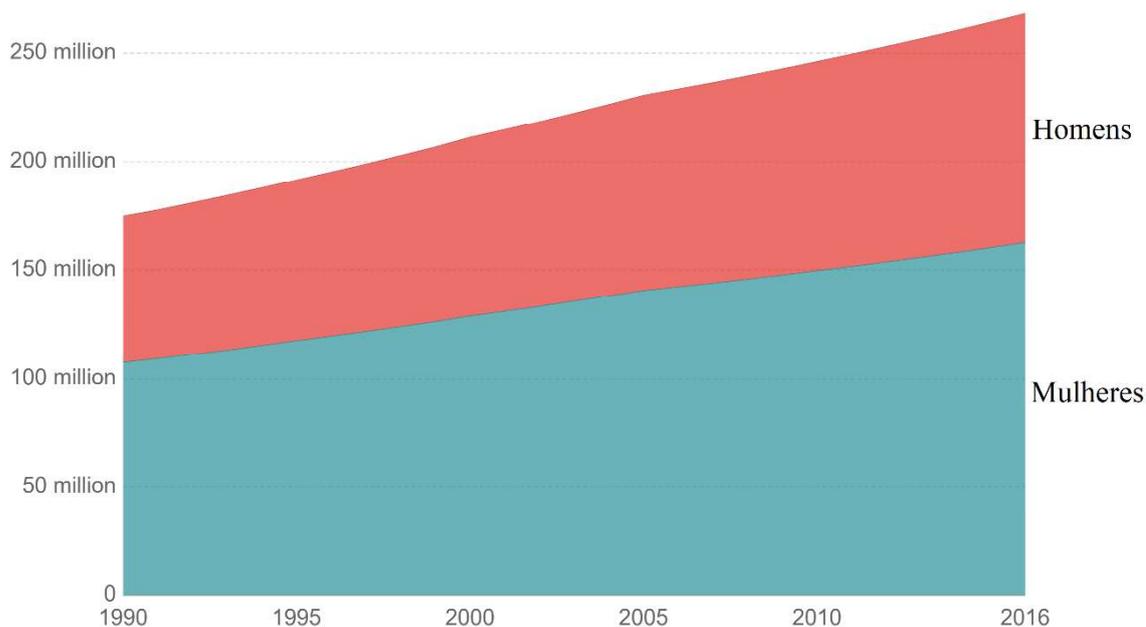
Figura 3: Prevalência dos transtornos depressivos em determinadas populações em 2016.



Fonte: Estudo sobre o Fardo Global das Doenças (GBD) (2017). Mapa retirado em 01/12/2018 a partir de <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.

Em 2016, conforme o estudo Fardo Global das Doenças (GBD) do Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (IHME), bem como a Organização Mundial da Saúde, foram estimados que 268 milhões de pessoas no mundo sofreram de depressão (**Figura 4**). No Brasil em 2016, segundo o GBD, os índices indicam que 3,72 % da população (7,77 milhões de pessoas) sofreram de depressão conforme a **Figura 3**. A depressão é o resultado de uma complexa interação de fatores sociais, psicológicos e biológicos (fatores endócrinos, inflamatórios ou imunológicos), sendo caracterizada por baixo humor, perda de interesse, perda de motivação e prazer (anedonia), sentimento de culpa, falta de concentração, baixa autoestima, distúrbios do sono e aumento ou diminuição do apetite (HALE et al., 2017; OMS, 2017). Assim, a definição de depressão é baseada em sintomas que causam principalmente comprometimento funcional. Adicionalmente, a associação da depressão com uma maior intensidade de estresse pode piorar a qualidade de vida das pessoas que são afetadas (DULANEY et al., 2018).

Figura 4: Número total de pessoas de todas as idades com depressão diferenciadas por sexo.



Fonte: Estudo sobre o Fardo Global das Doenças (GBD) (2017). Mapa retirado em 01/12/2018 a partir de <https://ourworldindata.org/grapher/number-of-people-with-depression>.

Várias situações diárias podem aumentar o risco do desenvolvimento da depressão como diversos abusos que inclui o físico, sexual, emocional ou de substâncias químicas, bem como uma doença grave, fatores genéticos e fortes emoções (tristeza ou pesar) (CUKOR et al., 2019; KRISHNAN, 2017). Nessas condições, a depressão não pode ser considerada apenas uma grande preocupação de saúde pública no mundo, uma vez que a depressão acaba sendo um distúrbio multifacetado com diversas causas que tem sido associado a um risco maior de desenvolver alguma condição que precisa de assistência médica como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer e Parkinson, diabetes, câncer, artrites, doença pulmonar obstrutiva crônica, obesidade, epilepsia e até suicídio (JONES; JORGE, 2019; LEE, 2019; LOTFALIANY et al., 2018; ROBILLARD et al., 2018).

Dentre os subtipos de depressão (atípica, melancólica, distímia, transtorno afetivo sazonal, perturbação depressiva breve recorrente, depressão pós-parto e depressão Menor) conforme o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5; APA, 2013) e Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e que podem ser diagnosticadas com base na duração, gravidade ou características específicas, o transtorno depressivo maior (TDM) é a principal forma sendo caracterizado por episódios depressivos recorrentes que frequentemente ocasiona incapacidade funcional e comprometimento da saúde tanto física quanto mental conforme já destacado em parágrafos anteriores (OTTE et al., 2016). O diagnóstico desse subtipo pode ser feito após um conjunto de sintomas como a constante sensação de incapacidade

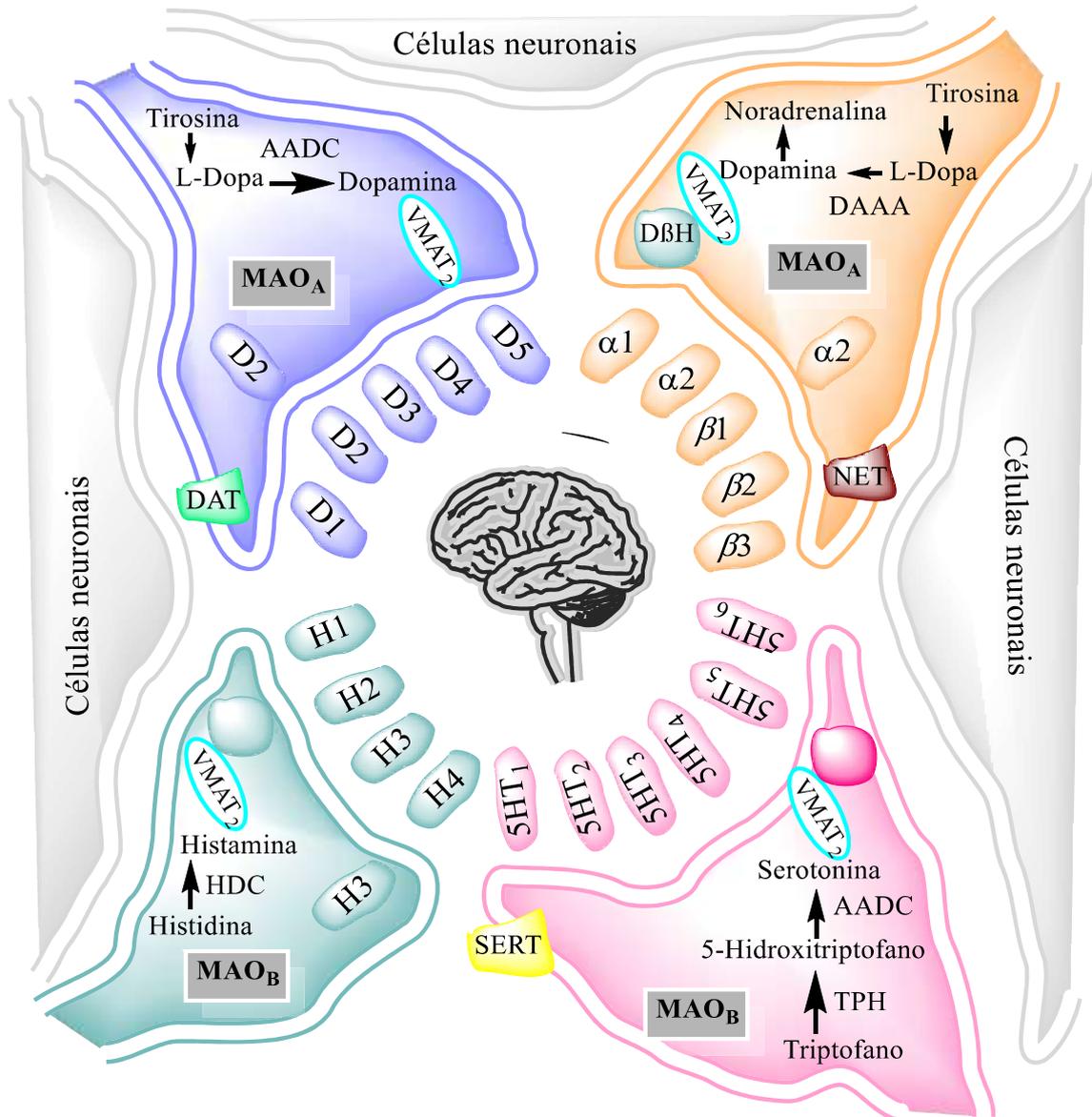
e desesperança, desespero, retardo mental, insônia e anedonia que durou por pelo menos duas semanas (HASHIMOTO, 2018). Caso a depressão seja descrita como crônica, os sintomas irão permanecer por longos períodos de tempo e até presente momento não está estabelecido qualquer mecanismo que pode explicar todos os aspectos envolvido no transtorno depressivo maior. No entanto, a patogênese dessa doença pode envolver deficiência das aminas biogênicas, fatores genéticos, anormalidade no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, alterações de volume cerebral em região como o hipocampo e alterações funcionais nos circuitos cerebrais como a rede de saliência que está envolvida no controle cognitivo e afetivo (HUANG; LIN, 2015; JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018; SCHMITGEN et al., 2019).

No cérebro, as atividades dos neurônios noradrenérgicos ocorre no tronco cerebral e em quase todas as áreas do cérebro onde a noradrenalina modula a função do córtex pré-frontal, processamento da memória, comportamento e atenção. Assim como a noradrenalina, a serotonina inerva basicamente todas as regiões cerebrais sendo um dos maiores sistemas de neurotransmissores no cérebro regulando processos fisiológicos como sono, apetite, humor e termorregulação (HAASE; BROWN, 2015). Já a dopamina exerce as suas funções em processos fisiológicos de motivação, recompensa, atenção e memória de trabalho. É evidente que os sistemas monoaminérgicos (dopaminérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos) no cérebro estão relacionados com vários comportamentos depressivos, sendo que a desregulação nos níveis de serotonina pode resultar em vários comportamentos depressivos como humor reduzido, falta de motivação, fadiga e atraso psicomotor (GOVONI; LANNI, 2017). Da mesma forma, a desregulação nos níveis de dopamina tem sido relacionada à falta de motivação e concentração, bem como agressividade (MORENO-CASTILLA et al., 2016; OHNO, 2019).

A baixa disponibilidade de noradrenalina juntamente com serotonina e dopamina que resulta em um amplo espectro de comportamentos depressivos descritos anteriormente é conhecida como “hipótese da monoamina”. Nessa hipótese, a deficiência funcional de neurotransmissores monoaminérgicos pode ser atribuído as ações contínuas das monoaminoxidases (MAO) nas fendas sinápticas, sendo que essa hipótese é a base para a aplicação de inibidores da monoaminoxidase (IMAO) como fármacos antidepressivos (SHYN; HAMILTON, 2010). Além das monoaminoxidases, outras possibilidades tentam explicar a baixa disponibilidade de neurotransmissores monoaminérgicos como a interação de alguns transmissores (glutamato e histamina) em resposta ao estresse induzido pela depressão que diminui a produção de substrato para da serotonina como o receptor e transportador de serotonina (SERT) (**Figura 5**) (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018). Nessas

condições, um aumento nos níveis de noradrenalina, serotonina e dopamina no cérebro de indivíduos deprimidos deve ser acompanhado pela reversão de comportamentos depressivos.

Figura 5: Organização molecular dos sistemas monoaminérgicos.



Legenda: L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC), dopamina- β -hidroxilase (DBH), Monoaminoxidase (MAO), transportador de monoaminas vesicular (VMAT), transportador de noradrenalina (NET), Histidina descarboxilase (HDC); transportador de dopamina (DAT), triptofano hidroxilase (TPH), L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC), receptores de serotonina (5-HT₁₋₆), transportador de serotonina (SERT).

Fonte: Autoria própria

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da depressão progrediu consideravelmente nas últimas décadas a partir de estudos clínicos e não clínicos e assim como acontece na hipótese da monoamina com a redução de neurotransmissores monoaminérgicos, tem sido postulado a hipótese do déficit GABAérgico com a redução dos níveis de GABA no cérebro, comprometimento da neurotransmissão GABAérgica e desregulação na expressão e função dos receptores GABA_A e GABA_B (GHOSAL; HARE; DUMAN, 2017). Pesquisas clínicas usando a técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear demonstraram baixos níveis de GABA na região do córtex frontal de indivíduos deprimidos sem medicação quando comparado com humanos saudáveis (SANACORA et al., 1999). O desenvolvimento de pesquisas posteriores utilizando a mesma técnica demonstraram níveis semelhantes de GABA em sub-regiões do córtex pré-frontal que são mais importantes para o comportamento depressivo, sendo que observações adicionais destacaram que a reversão do comportamento depressivo estava relacionado com normalização dos níveis de GABA (HASLER et al., 2005; HASLER et al., 2007; VIEIRA et al., 2006).

Adicionalmente, nessa hipótese tem sido discutido que a eficácia dos antidepressivos que são atualmente utilizados pode ser determinada pelo potencial de aumentar a neurotransmissão GABAérgica (LUSCHER; SHEN; SAHIR, 2010; LUSCHER; FUCHS, 2015). Por exemplo, indivíduos que receberam tratamentos com inibidores seletivos da recaptção de serotonina apresentaram uma normalização dos níveis de GABA e consistente com esse estudo, resultados obtidos em camundongos mutantes para receptores GABA ($\gamma^{2+/-}$) que exibem comportamentos depressivos mostraram uma normalização após o tratamento com fluoxetina (SHEN et al., 2010). Adicionalmente, o tratamento crônico com fluoxetina também aumentou os níveis extracelulares de GABA em várias regiões cerebrais (GÖREN et al., 2007). Evidências clínicas adicionais destacam que a ketamina (antagonista do receptor de NMDA) que é usado tipicamente como anestésico ou analgésico produz efeitos antidepressivos em poucas horas em pacientes com depressão resistente ao tratamento (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006). A ketamina interagem especificamente no sítio fenciclidina (PCP) no receptor NMDA e em vez de diminuir, há um aumento nos níveis de glutamato no cérebro. Essa atividade paradoxal de um antagonista do receptor de NMDA pode ser explicada quando destacado que em baixas doses, conforme as utilizadas no tratamento da depressão, a ketamina bloqueia preferencialmente os receptores NMDA presente nos interneurônios GABAérgicos (ABDALLAH et al., 2015; DUMAN et al., 2016; VOLLENWEIDER; KOMETER, 2010). Assim, pode ser evidenciado que as atividades moleculares da ketamina incluem a regulação da sinalização GABAérgica.

Além da ansiedade e depressão, a epilepsia estar associada com a baixa função do sistema GABAérgico no cérebro, sendo que os compostos que aumentam a neurotransmissão GABAérgica (ex: moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A) podem apresentar propriedades ansiolíticas, antidepressivas e antiepiléticos (LAVERTY et al., 2019; MASIULIS et al., 2019; METHUKU et al., 2018; SIGEL; ERNST, 2018).

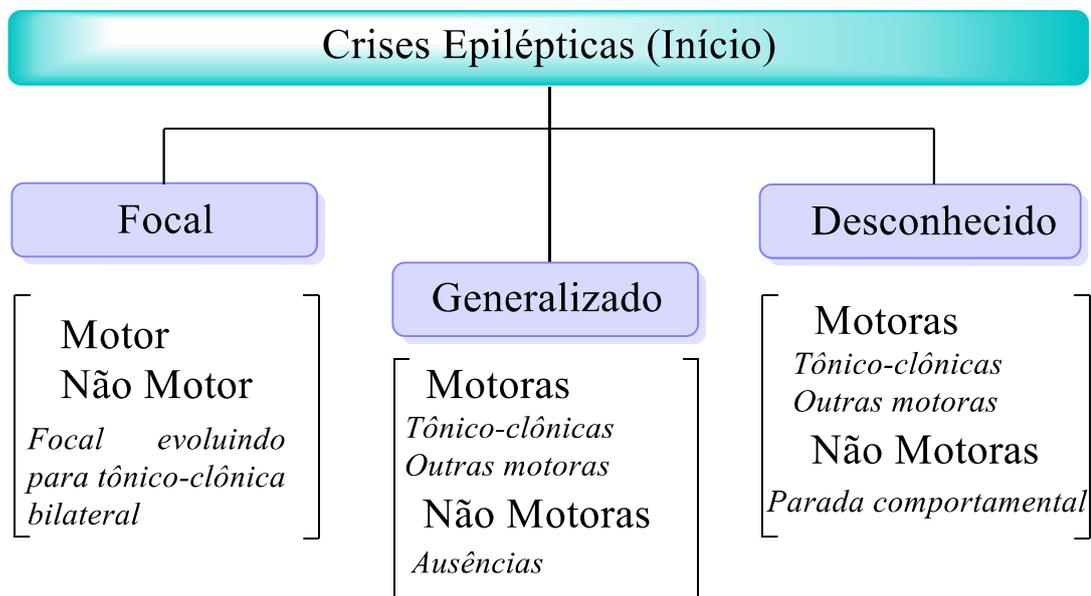
3.3. Epilepsia

Para evitar uma confusão na definição de crises epiléticas e epilepsia, a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) publica relatórios que definem e classificam crises epiléticas e epilepsia. Em 2017, a ILAE apresentou uma classificação operacional revisada dos tipos de crises epiléticas em que ficou estabelecido como uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas secundárias em razão da atividade neuronal anormal excessiva ou sincrônica no cérebro. Para a definição de epilepsia ficou estabelecida como sendo uma condição crônica caracterizada por uma propensão duradoura a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. Conforme esse conceito, a epilepsia requer o aparecimento no cérebro de pelo menos uma crise epilética desde que seja verificada uma condição que predisponha o cérebro a gerar crises epiléticas como uma anormalidade eletroencefalográfica ou uma lesão cerebral às quais a ocorrência das crises epiléticas possa ser atribuída (FISHER et al., 2005; FISHER et al., 2017a; FISHER et al., 2017b). As definições desses termos podem ser redefinidas novamente uma vez que o conhecimento sobre a epilepsia apresenta constantes atualizações (BERG et al., 2010; CHANG et al., 2017; FISHER, 2017).

Conforme já destacado, uma crise epilética é uma mudança comportamental transitória que pode ser um sinal ou sintoma subjetivo (perda da consciência, enrijecimento) e o início da crise epilética pode ser focal (quando a atividade neuronal excessiva surge em uma ou mais regiões cerebrais localizadas ou hemisfério), generalizada (quando a atividade neuronal excessiva começa com ampla distribuição em ambos os hemisférios) ou de início desconhecido (as informações clínicas e laboratoriais em que estão disponíveis não possibilitam identificar como focal ou generalizado) (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; FISHER et al., 2017b; SCHEFFER et al., 2017). O início de uma crise epilética focal ou generalizado é determinado quando existe mais de 80% de confiança na acurácia sobre o modo de início baseado em resultados de neuroimagem, análise laboratorial e eletroencefalograma. Sendo assim, as crises epiléticas podem ser classificadas conforme a **Figura 6** que retrata a

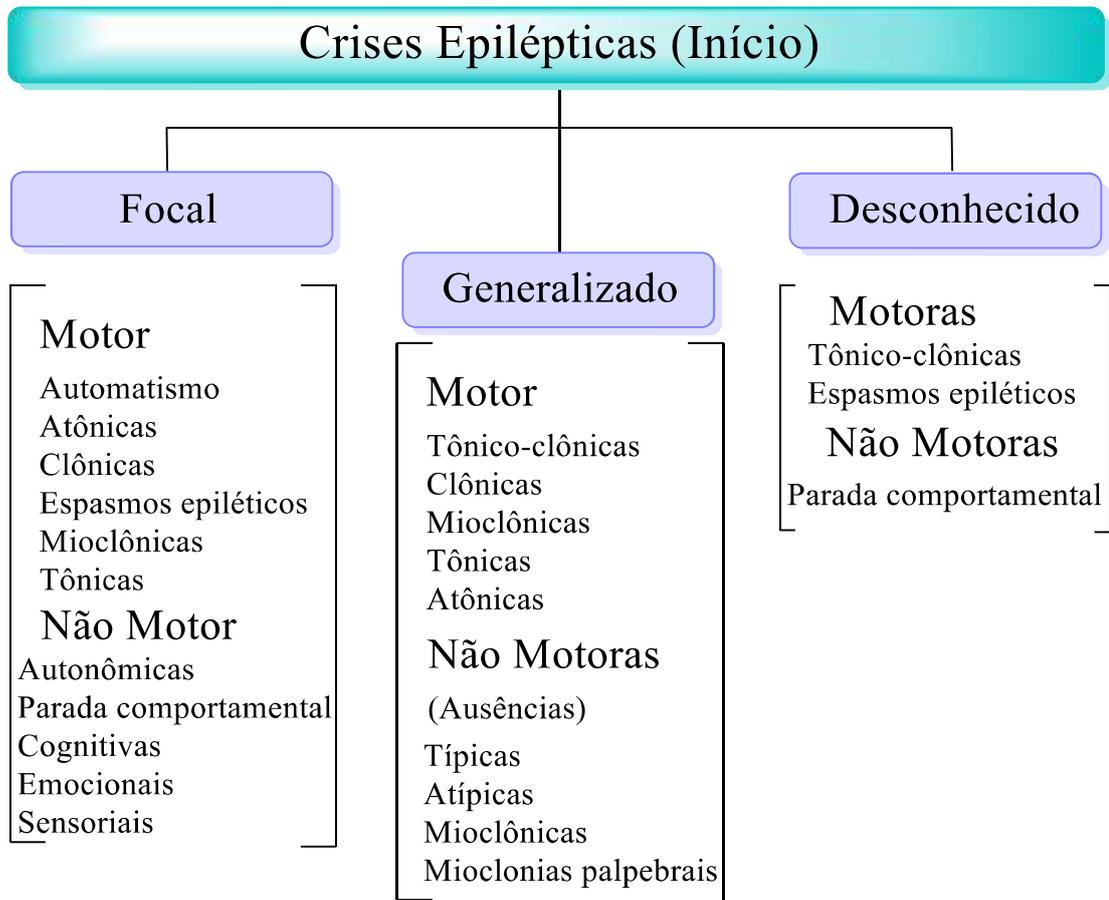
classificação básica e conforme a **Figura 7** que retrata a classificação expandida. Apesar da supressão de subcategorias da classificação expandida para formar a versão básica, as duas abrangem a mesma classificação. O uso das classificações conforme **Figura 6** e/ou **Figura 7** depende do nível de detalhes desejado, sendo que a classificação expandida pode ser mais relevante para neurofisiologistas e pesquisadores, enquanto a versão básica pode ter uma maior utilidade para os médicos, enfermeiros e outros profissionais de saúde (FISHER et al., 2017a; FISHER et al., 2017b).

Figura 6: Classificação básica das crises epilépticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE).



Fonte: Autoria própria

Figura 7: Classificação expandida das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE).



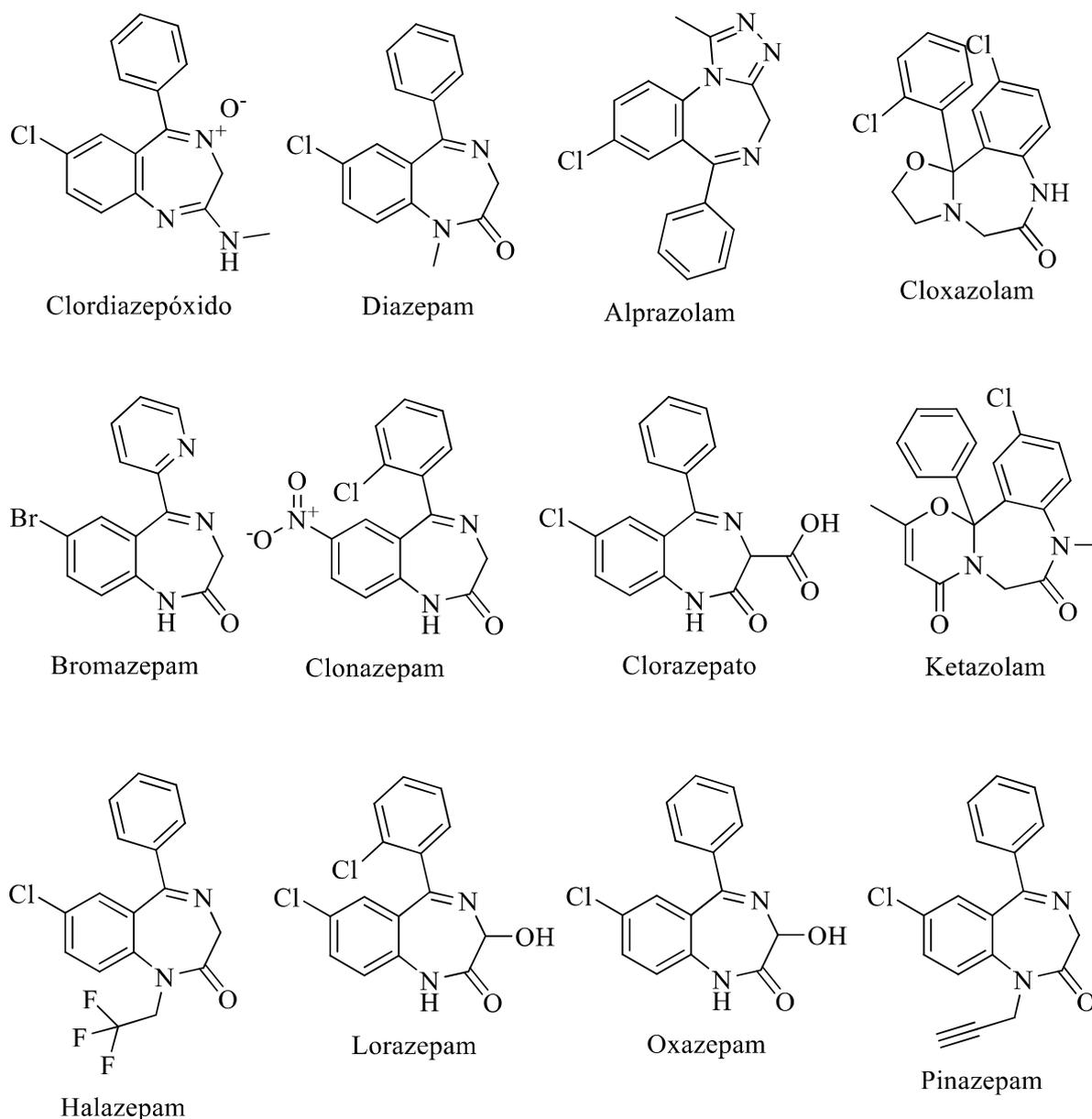
Fonte: Autoria própria

Ainda que não seja possível especificar a causa da epilepsia em muitos pacientes, as crises epiléticas podem ser o resultado de qualquer lesão que altere a função cerebral. Essas lesões podem ser em razão de um acidente vascular cerebral ou traumatismo cranioencefálico, estrutural devido a mudanças irreversíveis em células cerebrais, doenças infecciosas como a neurocisticercose, doenças autoimunes devido a anticorpos contra antígenos neuronais e mutações genéticas (BONZANNI et al., 2018; GOZUBATIK-CELIK et al., 2017; REDDY; VOLKMER, 2017). Diferenças no tipo de epilepsia estão associadas com mutações genéticas e até o presente momento, mais de 500 genes foram identificados e relacionados com a epilepsia como genes envolvidos na sinalização GABAérgica, uma importante via biológica nessa doença neurológica (KANG, 2017; ORSINI et al., 2018).

3.4. Tratamentos farmacológicos

O clordiazepóxido é considerado o primeiro benzodiazepínico e foi introduzido no mercado em 1960. Logo em seguida, foi o diazepam em 1963 que serviu de base do qual muitos outros derivados foram sintetizados (CHAYTOR, 2006; VARDANYAN; HRUBY, 2016). Em 2015 no mundo, 53 benzodiazepínicos já estavam disponíveis em formulações orais, sendo que 15 foram categorizados como sedativo/hipnóticos, 15 como ansiolíticos (**Figura 8**), 7 como fármacos antiepilépticos e 1 como relaxamento da musculatura esquelética. Os benzodiazepínicos como clordiazepóxido e o diazepam exercem as suas ações farmacológicas a partir da interação na interface das subunidades α e γ do receptor GABA_A, sendo que esse sítio de ligação é diferente daquele do agonista endógeno GABA que se liga entre as subunidades α e β , bem como de outros fármacos GABAérgicos como os barbitúricos. Os benzodiazepínicos quando modulam o receptor GABA_A aumenta a capacidade de afinidade pelo GABA e conseqüentemente aumenta o tempo de abertura dos canais de cloro associado ao receptor. Esses eventos resultam na hiperpolarização ou estabilização do potencial de membrana e uma diminuição na excitabilidade neuronal (GRIEBEL; HOLMES, 2013; SIGEL; ERNST, 2018). Como a ligação requer um resíduo específico de histidina na subunidade α , os benzodiazepínicos atuam principalmente nos receptores que possuem as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 5$. Os benzodiazepínicos são heterogêneos em suas afinidades pelos diferentes subtipos de receptores GABA_A e conseqüentemente são observadas diferenças nos seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, o efeito ansiolítico está associado por maior afinidade pela subunidade $\alpha 2$ (MCEOWN; TREIT, 2013; STEPHENS; KING, 2013).

Figura 8: Estruturas químicas de benzodiazepínicos com efeito ansiolítico.



Fonte: Autoria própria

Os benzodiazepínicos apresentam eficácia quando utilizado em curto prazo no transtorno de pânico, mas tem sido substituído por outros compostos como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina que podem ser encarados como a primeira linha de tratamento. Similarmente, os benzodiazepínicos são eficazes somente no tratamento em curto prazo do transtorno de ansiedade generalizada e como há frequentemente uma coexistência da ansiedade com depressão, os antidepressivos além dos benzodiazepínicos têm sido considerados como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (MENDEZ-DAVID et al., 2013 MATSUZAWA-YANAGIDA et al., 2007; VARDANYAN;

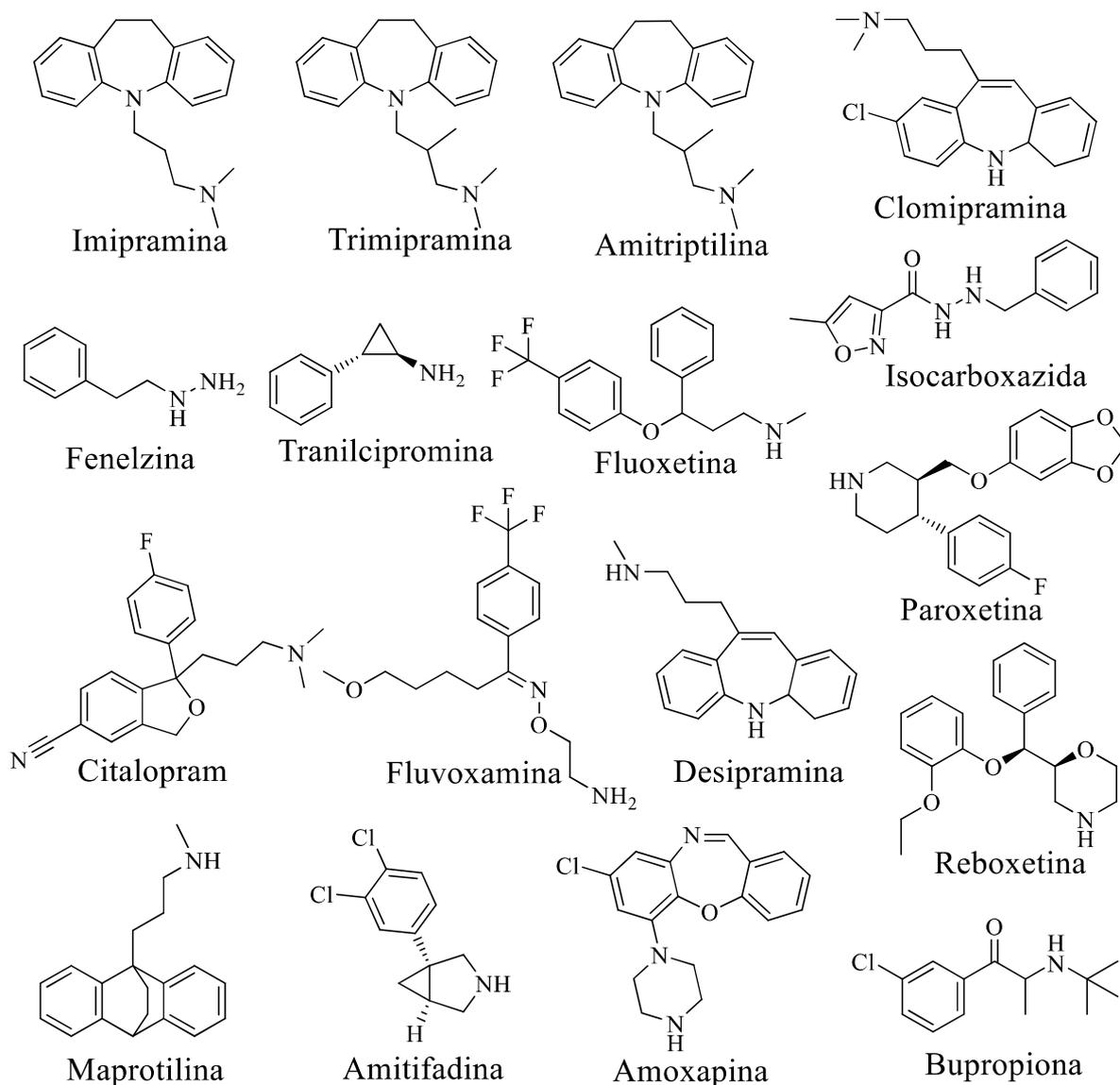
HRUBY, 2016). Adicionalmente, o uso dos benzodiazepínicos podem causar vários efeitos colaterais como sedação prolongada, comprometimento da cognição e do desempenho psicomotor, ataxia, dependência e abstinência (ISLAM et al., 2016; SAKE et al., 2018).

Medicamentos que modulam a atividade de aminas biogênicas são usadas para tratar a depressão. Antidepressivos tricíclicos (imipramina, trimipramina e amitriptilina), inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO - isocarboxazida, fenelzina e tranilcipromina), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs - fluoxetina, paroxetina, citalopram e fluvoxamina) e inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRNs - desipramina, reboxetina e maprotilina) são usados como antidepressivos, sendo que fármacos que inibem duplamente a captação de serotonina e noradrenalina (ISRS/ISRN) estão entre os mais recentes (**Figura 9**) (KOSE; CETIN, 2018). Além disso, inibidores de recaptação tripla (ISRS/ISRN e Inibidores seletivos de recaptação de dopamina) como Amitifadina (**Figura 9**) que também é conhecida como DOV 21,947 ou EB-1010 têm sido avaliados em estudos não clínicos e clínicos (JIN et al., 2015; ZHANG et al., 2016). O tratamento farmacológico para depressão foi estabelecido pelo aumento da ação dos neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, dopamina e noradrenalina), sendo que recentemente tem sido direcionado para outros alvos cerebrais como os receptores NMDA (N-metil-D- aspartato), melatonina e GABA (FARZAEI; HAJIALYANI; NASERI, 2019; GENG et al., 2019; LI; ISHIKAWA; SHIGA, 2018; RÉUS et al., 2016).

O exato mecanismo de ação pelos quais os antidepressivos descritos na **Figura 9** atuam nos sintomas da depressão ainda precisam ser melhor compreendidos. Antidepressivos que atuam na neurotransmissão monoaminérgica provocam uma ação inicial dentro da sinapse que impactam diretamente nas vias de sinalização intracelular e das moléculas que atuam como segundo mensageiro que podem culminar em mudanças na expressão gênica, neurogênese como hipocampal e plasticidade sináptica para que possa ser verificado um determinado ação terapêutico. Os efeitos farmacológicos dos antidepressivos ainda são complexos e o agrupamento padrão dos antidepressivos em vários grupos baseado em seu principal mecanismo de ação individual sobre os neurotransmissores monoaminérgicos é bastante simples e por isso tem sido questionado (CHO et al., 2016; KAO et al., 2018; INIESTA et al., 2018; AN; LU, 2016). No entanto, pode ser útil na prática quando os efeitos clínicos dos antidepressivos são bem amplos e superpostos em que muitas vezes reflete a afinidade de vários medicamentos por receptores de monoaminas dos neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos. Adicionalmente, pode ser útil na compreensão dos efeitos adversos apresentados pelos antidepressivos durante o tratamento farmacológico.

Conforme o parágrafo anterior, bem como a **Figura 5**, a neurotransmissão monoaminérgica é complexo e abrange vários neurotransmissores, receptores pré-sinápticos e pós-sinápticos, transportadores e enzimas que determinam a disponibilidade e os efeitos dos neurotransmissores monoaminérgicos específicos. Estudos que analisam o potencial farmacológico dos antidepressivos tradicionalmente se concentram principalmente na eficácia buscando uma diminuição de 50% nos sintomas depressivos (AN; LU, 2016). Com o uso cada vez menor, os primeiros antidepressivos foram desenvolvidos na década de 1950 (tricíclicos e os inibidores da MAO) e ainda permanecem como fármacos eficazes em que induz o aumento dos níveis de monoaminas (catecolaminas), bem como reduz o seu metabolismo ou inibe a sua recaptação (BRENT, 2016). Entretanto, os primeiros antidepressivos estão sendo substituídos por fármacos com ações mais seletivas (ZHANG et al., 2016). Assim, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina estão entre os principais fármacos prescritos para depressão. No entanto, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina podem produzir durante o tratamento vários efeitos colaterais de intensidade relativamente baixa quando considerado a disseminação da serotonina em todo o corpo como disfunção sexual, ganho de peso, náusea e dores de cabeça (ZHAO et al., 2018).

Alguns antidepressivos descritos na **Figura 9** como amoxapina, bupropiona, clomipramina e maprotilina quando usados em doses acima do indicado como terapêuticas podem causar um desequilíbrio entre a ação inibitória da neurotransmissão GABAérgica e excitatória da neurotransmissão glutamatérgica resultando em crises epiléticas em indivíduos que não têm epilepsia (IKEDA et al., 1989; JUDGE; RENTMEESTER, 2011; KANNER, 2013; PRESKORN; FAST, 1992). Diferentemente do que foi destacado anteriormente para compostos que podem causar crises epiléticas, inibidores seletivos da recaptação de serotonina como fluoxetina e paroxetina são desprovidos dessa capacidade e apresentam até propriedades antiepiléticos (BOROWICZ et al., 2007; PERIČIĆ et al., 2005).

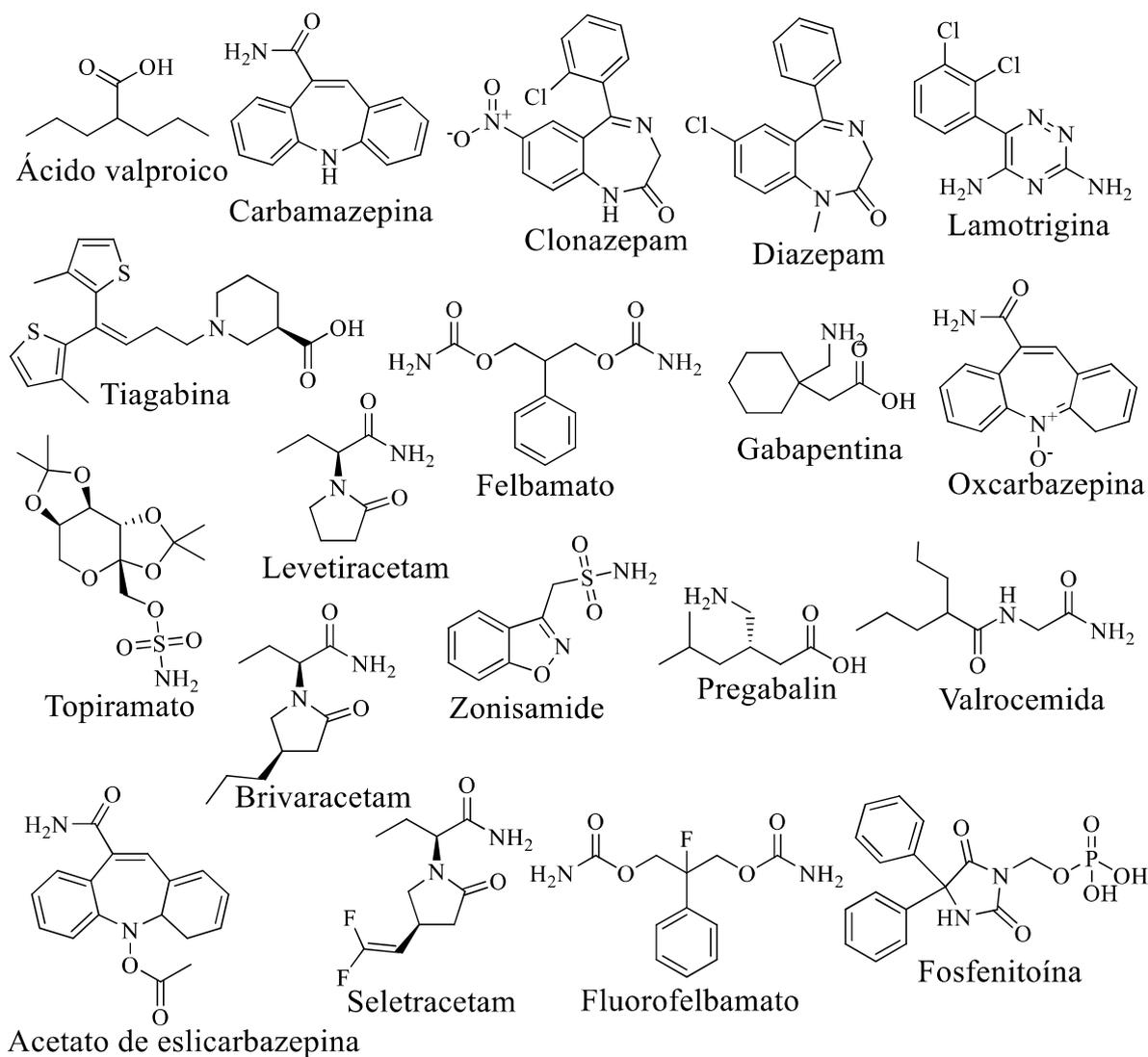
Figura 9: Estruturas químicas de antidepressivos.

Fonte: Autoria própria

O tratamento farmacológico das crises epilépticas iniciou com barbitúricos e em seguida foi a vez dos derivados midazolidina-2,4-diona e pirrolidina-2,5-diona. Posteriormente, o ácido valproico passou a ser o medicamento de escolha para crises epilépticas inicialmente generalizadas. Depois disso, a carbamazepina e alguns benzodiazepínicos (clonazepam e diazepam) foram indicados para o tratamento das crises epilépticas. As substâncias descritas anteriormente e que estão descritas na **Figura 10** foram os pilares para o tratamento da epilepsia até a década de 1990 quando apareceu uma nova geração de fármaco da classe dos anticonvulsivantes que inclui o lamotrigina, tiagabina, felbamato, gabapentina, oxcarbazepina, topiramato, levetiracetam, zonisamida e pregabalina (BIALER, 2012; LÖSCHER et al., 2013).

Além disso, existe um outro grupo de compostos denominados formalmente de terceira geração que inclui novos derivados do ácido valproico (valrocedina), oxcarbazepina (acetato de eslicarbazepina), levetiracetam (brivaracetam, seletracetam); felbamato (fluorofelbamato) e da fenitoína (fosfenitoína), bem como compostos com estruturas químicas completamente nova (**Figura 10**). Esses compostos podem oferecer como características farmacológicas menos interações medicamentosas, mecanismos de ações únicas e um maior espectro de atividade (BIALER; WHITE, 2010; CHAMBERS; SCHAEFER, 2015; ŁUSZCZKI, 2009).

Figura 10: Estruturas químicas de compostos antiepiléticos usados para tratar a epilepsia.



Fonte: Autoria própria

A forma mais comum de tratamento para os diferentes tipos de crises epilépticas consiste na administração de vários compostos antiepiléticos e apesar da disponibilidade atual de mais de 15 medicamentos, 30% dos pacientes sofrem ainda de crises epilépticas refratárias

(GUPTE-SINGH et al., 2018; SALANOVA, 2018). Adicionalmente, os diferentes mecanismos de ação dos compostos antiepilépticos podem causar vários efeitos indesejados conforme destacado na **Tabela 1**. Assim, há uma necessidade contínua pela busca de compostos antiepilépticos com eficácia mais seletiva e melhor tolerabilidade e nessas condições, os produtos naturais derivados de plantas como os terpenos demonstram várias atividades farmacológicas como antidepressivo, ansiolítico, analgésico, antinociceptivo e anti-inflamatório em estudos tanto clínicos quanto não clínicos (NUUTINEN et al., 2018).

Tabela 1: Efeitos adversos de vários compostos antiepilépticos.

Antiepilépticos	Efeitos adversos	
	Neurológico	Outro (s)
Ácido valproico	Perda de memória e tremor	Hepatotoxicidade e teratogênico
Carbamazepina	Perda de memória e tontura	Náuseas, vômitos e teratogênico
Clonazepam	Sonolência, perda de memória e depressão	Sinusite
Fenitoína	Sonolência e perda de memória	Hiperplasia gengival e teratogênico
Fenobarbital	Sonolência e perda de memória	Erupção cutânea
Gabapentina	Sonolência e ataxia	Dores musculares, náuseas e diarreia
Lamotrigina	Sonolência e perda de memória, ataxia, tontura e dor de cabeça	Rinite, náuseas e teratogênico
Levetiracetam	Sonolência, tontura e depressão	Erupção cutânea
Oxcarbazepina	Sonolência, fadiga e perda de memória	Náuseas, vômitos
Pregabalina	Dificuldade de concentração, ataxia e fadiga	Boca seca, edema e ganho de peso
Topiramato	Sonolência, tontura, fadiga e dificuldades de aprendizagem	Anorexia, perda de peso e nefrolitíase

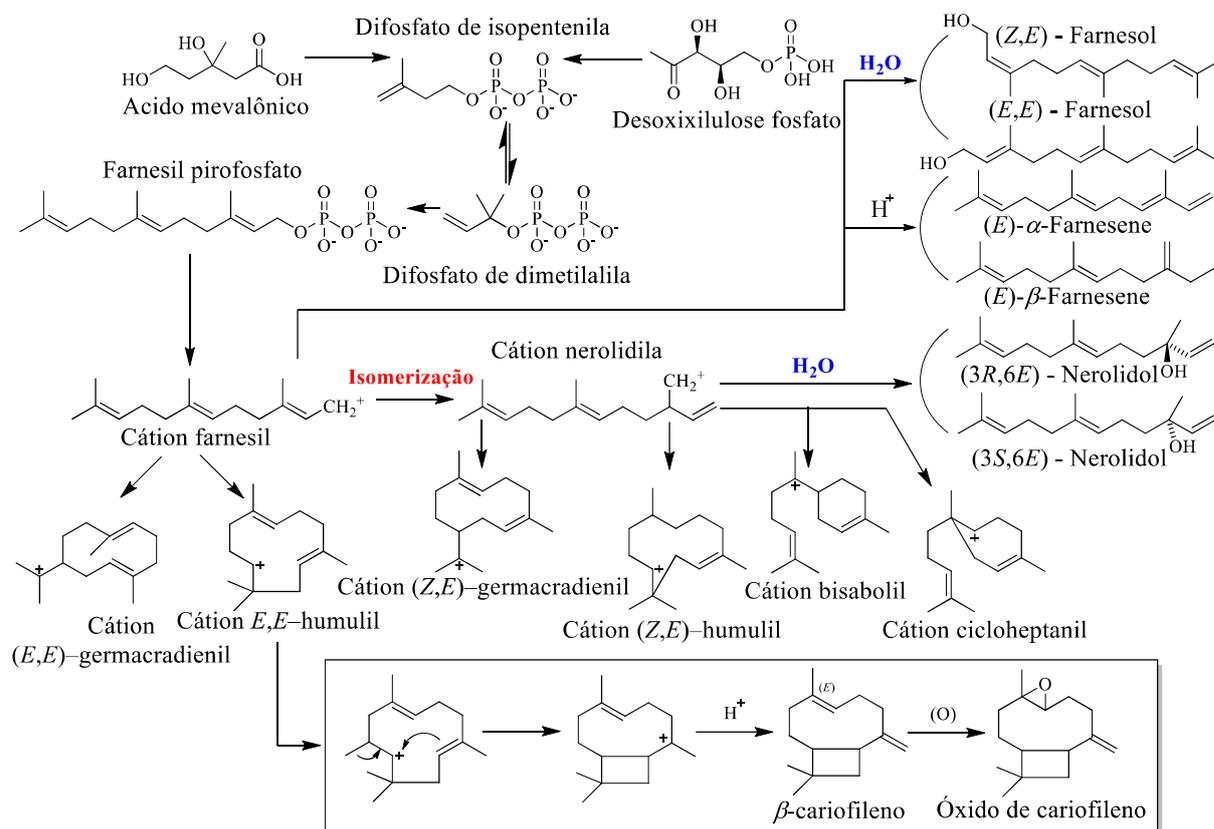
Fonte: Fricke-Galindo et al. (2018); Perucca; Gilliam (2012)

3.5. Terpenos

Sendo principalmente hidrocarbonetos, os terpenos $(C_5H_8)_n$ são amplamente encontrados como constituintes de óleos essenciais e são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), triterpenos (6 unidades) e tetraterpenos (8 unidades de isopreno). Especificamente, os sesquiterpenos são divididos em grupos quando considerado a sua estrutura química como acíclicas ou cíclicas (LIAO et al., 2016).

A biossíntese dos sesquiterpenos pode acontecer tanto pela via do ácido mevalônico quanto pela via do desoxixilulose fosfato (1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato) conforme destacado na **Figura 11** (CHAPPELL; COATES, 2010; ROHDICH et al., 2003). Os compostos bioquimicamente ativos isopentenil difosfato ou difosfato de isopentenila e seu isômero difosfato de dimetilalila nas das duas vias sofrem combinações químicas com o precursor sesquiterpênico farnesil pirofosfato. A ionização no carbono 2 do farnesil pirofosfato e a alterações estereoquímicas (configuração *E* ou *Z*) da ligação dupla mais próximo do difosfato resulta na formação de cátions farnesílicos (*E* e *Z*) e do cátion nerolidila. Modificações químicas devido à redução, oxidação e ciclização a partir dos cátions farnesílicos e nerolidila irão formar diversos sesquiterpenos acíclicos e cíclicos.

Figura 11: Via geral para biossíntese dos sesquiterpenos com formação do β -cariofileno.



Fonte: Autoria própria

Entre os sesquiterpenos que são formados conforme a **Figura 11** por ciclização do farnesil pirofosfato, pode ser destacado o β -cariofileno [(1R,4E,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno] que está entre os principais constituintes encontrados em alimentos vegetais como orégano (*Origanum vulgare* Linn.), canela (*Cinnamomum spp.*),

pimenta (*Piper nigrum* Linn.) e cravo (*Eugenia caryophyllata* Thumb.) (GERTSCH et al., 2008; BUCHBAUER; ILIC, 2013). Além disso, o β -cariofileno compreende um dos principais princípios ativos de óleos essenciais da *Cannabis sativa* Linn, *Ocimum gratissimum* Linn, *Lantana camara* Linn, *Cordia verbenaceae* DC (sinônimo *Varronia curassavica* Jacq), *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil, *Croton campestris* A. St. Hil, *Vernonia cinerea* Less, *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort, *Murraya paniculata* Linn. e de várias espécies da *Copaifera* (ALMEIDA et al., 2013; DIAS et al., 2012; FRICKE et al., 1995; GALDINO et al., 2012; JOSHI, 2014; KHAN et al., 2016; OLIVEIRA-TINTINO et al., 2018; SELESTINO et al., 2017).

Esse sesquiterpeno bicíclico está na lista dos aditivos alimentares e agentes aromatizantes aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (FDA, *Code of Federal Regulations*/n°. 21CFR172.515) e estudos em modelos animais demonstraram atividades farmacológicas que incluem o tratamento do alcoolismo (AL MANSOURI et al., 2014), anti-hiperglicêmico (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016), efeito hipolipidêmico (BALDISSERA et al., 2016), previne a doença hepática gordurosa não alcoólica (KAMIKUBO et al., 2016), neuroprotetor (ASSIS et al., 2014; SANTOS et al., 2017), antidepressivo, ansiolítico (BAHI et al., 2014), anticonvulsivante (LIU et al., 2015), anticâncer (JUNG et al., 2015; FIDYT et al., 2016), analgésico (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016), antinociceptivo (PAULA-FREIRE et al., 2014), efeito anti-melanogênico (YANG et al., 2015), anti-inflamatório (CHO et al., 2015), antioxidante (AMES-SIBIN et al., 2018; DAHHAM et al., 2015) e atua como agonista seletivo do receptor canabinóide do tipo 2 (CB₂) (ASKARI; SHAFIEE-NICK, 2019; BENTO et al., 2011; SHARMA et al., 2016). Devido as suas características aromáticas, o β -cariofileno pode ser utilizado em cosméticos (SKÖLD et al., 2006).

Adicionalmente, estudos além do farmacológico destacaram ausência de toxicidade sub-crônica, nenhuma evidência de mutagenicidade no teste de Ames e no teste de micronúcleo em limfócitos humanos, o que reforça que a utilização do β -cariofileno encontrados em vegetais pode conferir potenciais benefícios para a saúde sem apresentar indícios de toxicidade (DI SOTTO et al., 2010; FGE, 2015; SCHMITT et al., 2016). Apesar das mais diversas atividades farmacológicas destacadas no parágrafo anterior, o β -cariofileno como hidrocarboneto insaturado apresenta limitações relacionadas a sua baixa solubilidade em água, é volátil e sofre fácil oxidação quando exposto à luz e oxigênio. Essas características físico-químicas resultam em baixa biodisponibilidade do β -cariofileno e conseqüentemente pode limitar a sua aplicação farmacêutica (SKÖLD et al., 2006; PANDIT; AQIL; SULTANA, 2014).

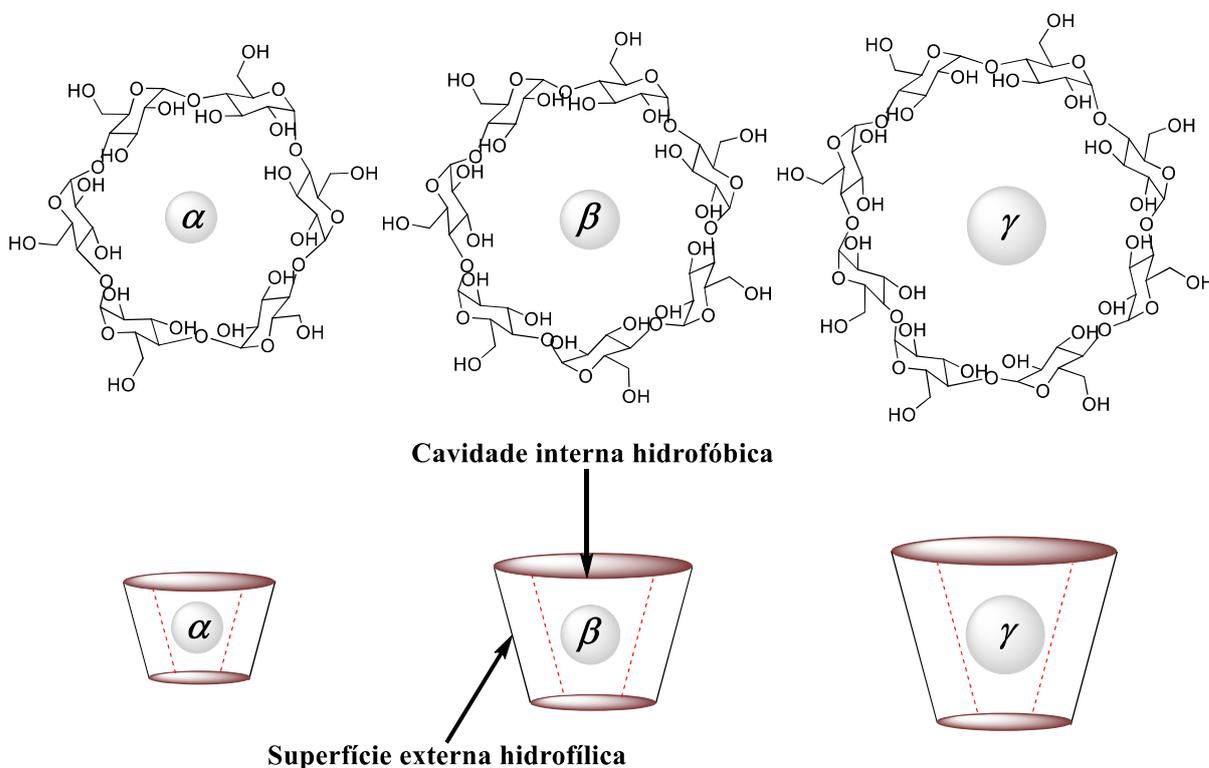
Entre as abordagens biotecnológicas para reverter algumas dessas limitações estão o uso de lipossomas e as complexações com ciclodextrinas que demonstram uma ampla aplicação por melhorar a solubilidade aquosa, dissolução, estabilidade e potencial farmacológico de compostos como os terpenos (DUCHÊNE; BOCHOT, 2016). Nessas circunstâncias, pode ser destacado os estudos de complexação com ciclodextrinas do farnesol (SILVA et al., 2017), α -bisabolol (OLIVEIRA et al., 2017), carvacrol (SOUZA et al., 2018), linalool (CAMARGO et al., 2018), borneol (CEBORSKA, 2017), limoneno (COSTA et al., 2019), mentol (YILDIZ et al., 2018), timol (CELEBIOGLU; YILDIZ, 2018), α -terpineol (OLIVEIRA et al., 2016) e β -cariofileno (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016). Ciclodextrinas naturais como a β -ciclodextrina ou modificadas como a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP γ CD) e metil- β -ciclodextrina (M β CD) que estão destacadas na **Tabela 3** podem promover o aumento da solubilidade aquosa e estabilidade química dos terpenos (LIU et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

3.6. Ciclodextrinas

3.6.1. Potencial aplicação farmacológica das ciclodextrinas

As ciclodextrinas, que são uma família de oligossacarídeos com estrutura cíclica composta de unidades mínimas de α -D-glicopiranosose, favorece uma gama de aplicações biofarmacêuticas e alimentícias. As unidades de α -D-glicopiranosose são ligadas covalentemente aos átomos de carbono 1 e 4 por ligações α -1,4-glicosídicas para formar as estruturas cíclicas (NIKOLIĆ et al., 2019). Esses oligossacarídeos cíclicos podem ser obtidos por reações de transglicosilação intramolecular (ciclização) envolvendo a degradação do amido pela enzima ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) e as principais ciclodextrinas são α , β e γ que contêm 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosídeo, respectivamente, com grupos hidroxilas primários e secundários localizados nas bordas estreitas e mais largas de uma estrutura em forma de cone truncada (**Figura 12**). A solubilidade aquosa das ciclodextrinas é atribuída aos seus numerosos grupos hidroxilas e a sua forma de cone é devida as unidades de glicopiranosose que existem na conformação da cadeia (SUVARNA; GUJAR; MURAHARI, 2017; VARAN et al., 2017).

Figura 12: Estruturas das ciclodextrinas α , β e γ com 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosídeo, respectivamente.



Fonte: Autoria própria

A cavidade interna hidrofóbica com uma superfície externa hidrofílica possibilita uma ampla interação com moléculas que inclui oligonucleotídeos, íons e proteínas para formar estruturas denominadas de complexo de inclusão, sendo que limitações de complexações envolve restrições estereoquímicas da cavidade interna das ciclodextrinas (SEBAALY et al., 2018). Sendo capaz de formar estruturas de complexação hospedeiras, a solubilidade das ciclodextrinas na água permanece ainda como uma das propriedades mais fascinantes, uma vez que não segue uma tendência contínua com o número de unidades de glicose e conforme destacado na **Tabela 2**, a β -ciclodextrina é menos solúvel que α -ciclodextrina e γ -ciclodextrina. Mesmo assim, as ciclodextrinas possibilitam várias aplicações na farmacologia e adicionalmente é caracterizada na literatura científica por baixa toxicidade e imunogenicidade, bem como de fácil acesso e custo benefício (LI et al., 2016). Derivados de ciclodextrina foram sintetizados para melhorar suas propriedades e mais especificamente a sua atividade farmacológica. Propriedades como cavidade interna hidrofóbica e superfície externa hidrofílica ajudam no encapsulamento de substâncias lipofílicas ou de baixa solubilidade, o que é essencial para a liberação de fármacos através de interações não-covalentes.

Tabela 2: Algumas propriedades físicas e químicas das ciclodextrinas.

Propriedades	Tipos de ciclodextrinas		
	α	β	γ
Número de unidades de glicose	6	7	8
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7–5,3	6,0–6,5	7,5–8,3
Diâmetro da cavidade externa (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade interna (Å)	5,7	7,8	9,5
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427
Altura (Å)	7,9	7,9	7,9
Peso Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água em 25 °C (mg/mL)	145	18,5	232

Fonte: Varan et al. (2017) e Sengupta et al. (2018)

Conforme já destacado, as ciclodextrinas apresentam uma forma similar a um cone truncado oco, sendo que na extremidade mais larga estão presentes grupos hidroxilas secundários que estão ligados a unidades de glicose no carbono 2 e 3. No extremo oposto, que é mais estreito, grupos hidroxilas primários estão situados. Eles estão ligados a átomos de glicose em átomos de carbono 2. Na extremidade mais estreita, a cavidade da ciclodextrina tem menos diâmetro conforme a **Tabela 2**, sendo que isso ocorre porque o grupo hidroxila primário tem rotação livre. Do lado de fora da molécula, grupos CH ligados ao primeiro, segundo e quarto átomos de hidrogênio são vistos enquanto os grupos hidroxilas são vistos na parte externa do cone truncado e formam a camada externa das ciclodextrinas. Grupos CH estão ligados ao terceiro e ao quinto átomo de hidrogênio na camada interna. A estrutura das ciclodextrinas é estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares que as tornam rígidas (SUVARNA; GUJAR; MURAHARI, 2017; VARAN et al., 2017; YANG et al., 2017).

Devido a capacidade de acomodação de vários tipos de moléculas em suas cavidades e atuarem como veículos de solubilização, as ciclodextrinas apresenta várias aplicações biofarmacêuticas. Entre as ciclodextrinas, a α -ciclodextrina apresenta uma cavidade insuficiente para muitas substâncias farmacológicas e a γ -ciclodextrina, apesar de atrair muita atenção devido a sua grande cavidade hidrofóbica, alta solubilidade em água e biodisponibilidade, sua a produção continua ainda sendo de alto custo (QIU et al., 2018). Já a β -ciclodextrina tem sido amplamente utilizada em estudos iniciais de aplicações farmacêuticas devido ao tamanho da sua cavidade ser facilmente acessível e adequado para uma ampla gama de substâncias químicas, bem como a facilidade da produção e no subsequente baixo custo. No entanto, a baixa solubilidade em água e a nefrotoxicidade pode limitar o uso da β -ciclodextrina,

particularmente na liberação de substâncias com administração parenteral. A baixa solubilidade da β -ciclodextrina pode ser atribuído a própria estrutura em que as suas dimensões moleculares são ideais para formação de um anel de ligações de hidrogênio intramoleculares que neutralizam a hidratação da β -ciclodextrina, reduzindo assim sua solubilidade (WANG et al., 2011; LOFTSSON et al., 2015).

Devido a sua forma do cone truncada, uma variedade de substâncias orgânicas pode ser inserida na cavidade das ciclodextrinas formando complexos de inclusão a partir da associação entre a substância encapsulada e a ciclodextrina (CEBORSKA, 2018; KEDIA; DUBEY, 2018). Na cavidade da ciclodextrina, as moléculas de água estão em um ambiente energeticamente desfavorável e quando essas moléculas de água são removidas e substituídas por uma substância encapsulada com tamanho, forma e polaridade adequada à estrutura da ciclodextrina conforme a **Tabela 2**. Assim, o processo para formar complexo de inclusão abrange vários fatores que participam e desempenhando uma função significativa conforme descrita anteriormente, sendo que a associação entre a substância encapsulada e a ciclodextrina pode ser por forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e por ligações de hidrogênio (MURA et al., 2015). O processo de encapsulamento é energeticamente favorável e leva ao aumento da estabilidade do complexo porque induz uma modificação na entalpia e reduz a energia total do sistema. Os complexos são geralmente obtidos pelo método da coprecipitação, em que a molécula ativa é suspensa em conjunto com a ciclodextrina na água, misturados à temperatura ideal, evaporado e depois seco no dessecador (PATIL; WEATHERLY; ARMSTRONG, 2018).

Dentre as vantagens mais importantes para o uso de ciclodextrinas estão a proteção de moléculas encapsuladas de reações de decomposição induzidas por oxidação ou hidrólise, luz, calor, reações químicas com outros compostos orgânicos e reduz a perda de compostos voláteis (FENYVESI et al., 2016). Por uma maior aplicabilidade, derivados das ciclodextrinas (hidrofílicos, hidrofóbicos, iônicos e poliméricos) criados por reações químicas ou enzimáticas são utilizadas para melhorar as propriedades físicas, químicas, biológicas, capacidade de complexação das ciclodextrinas naturais, diminuir odores e sabores desagradáveis de certos fármacos e redução da toxicidade por via parenteral. Considerando que também pode aumentar a solubilidade em água, dissolução e a taxa de liberação de substâncias hidrofóbicos como os óleos essenciais, conseqüentemente, o complexo de inclusão proporciona maior biodisponibilidade e a bioeficácia (FENELON et al., 2018; GUO et al., 2017; MALAQUIAS et al., 2018).

De acordo com a modificação química, as ciclodextrinas podem ser alquilados, hidroxialquilados, esterificados e polimerizados. Atualmente e conforme a **Tabela 3**, os

derivados de ciclodextrinas com várias utilizações farmacêuticas incluem a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), hidroxipropil- γ -ciclodextrina, β -ciclodextrina aleatoriamente metilada, sulfobutil éter β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e as ramificadas como a maltosil- β -ciclodextrina (ERDOĞAR et al., 2018; SINGH et al., 2019). Existem mais de cem tipos de ciclodextrinas que estão disponíveis como substâncias químicas naturais e aproximadamente 1500 derivados de ciclodextrinas foram sintetizados e relatado, sendo que a hidroxipropil- β -ciclodextrina é uma das mais utilizadas por ter maior solubilidade e cavidade de diâmetro adequada (SIKDER et al., 2019).

Tabela 3: Principais derivados das ciclodextrinas (CD).

Ciclodextrinas/derivados	Abreviatura	Características	Via de administração
CD metiladas/derivados hidrófilos			
Metil- β -CD	M- β -CD	Solúveis em água e solventes orgânicos, tensoativos e hemolítica	Oral, dérmica e subcutânea
2,6-di-O-metil- β -CD	DM- β -CD		
2,3,6-tri-O-metil- β -CD	TM- β -CD		
2,6-di-O-metil-3-O-acetil- β -CD	DMA- β -CD	Solúvel em água e baixa atividade hemolítica	
CD hidroxialquilados/derivados hidrófilos			
2-hidroxietil- β -CD	2-HE- β -CD	Mistura amorfa com diferentes graus de substituição, elevada solubilidade em água e baixa toxicidade	Oral, dérmica, intravenosa, e em mucosas
2-hidroxipropil- β -CD	2-HP- β -CD		
3-hidroxipropil- β -CD	3-HP- β -CD		
2,3-dihidroxipropil- β -CD	DHP- β -CD		
CD ramificadas/derivados hidrófilos			
6-O-glicosil- β -CD	G1- β -CD	Elevada solubilidade em água e baixa toxicidade	Oral, dérmica, intravenosa, e em mucosas
6-O-maltosil- β -CD	G2- β -CD		
CD aciladas/derivados hidrófobos			
2,3,6-tri-O-acetil- β CD	TA- β -CD	Baixa solubilidade em água, solúvel em solventes orgânicos; formação de filmes e propriedades adesiva	Oral e dérmica
2,3,6-tri-O-propanoil- β CD	TP- β -CD		
2,3,6-tri-O-butanoil- β CD	TB- β -CD		
2,3,6-tri-O-valeril- β CD	TV- β -CD		
CD aniônicas/derivados ionizáveis			
6-O-carboximetil-O-etil- β CD	CME- β -CD	pKa=3-4, solúvel a pH>4	Oral, dérmica, intravenosa e em mucosas
β -CD sulfatadas	S- β -CD	pKa>1, solúvel em água	
Sulfobutil-éter- β -CD	SBE- β -CD	Elevada solubilidade em água	

Fonte: Erdoğar et al. (2018)

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, C. G.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S.; KRYSTAL, J. H. Ketamine and Rapid-Acting Antidepressants: A Window into a New Neurobiology for Mood Disorder Therapeutics. **Annual Review of Medicine**, v. 66, n. 1, p. 509-523, 2015.
- AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; BAH, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, n. 0, p. 260-268, 2014.
- ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; DA COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.
- AMES-SIBIN, A. P.; BARIZÃO, C. L.; CASTRO-GHIZONI, C. V.; SILVA, F. M. S.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; BRACHT, L.; BERSANI-AMADO, C. A.; MARÇAL-NATALI, M. R.; BRACHT, A.; COMAR, J. F. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 10262-10277, 2018.
- AN, R.; LU, L. Antidepressant use and functional limitations in U.S. older adults. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 80, p. 31-36, 2016.
- American Psychiatric Association (APA). (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.)*. Washington, DC: Author.
- ASKARI, V. R.; SHAFIEE-NICK, R. Promising neuroprotective effects of β -caryophyllene against LPS-induced oligodendrocyte toxicity: A mechanistic study. **Biochemical Pharmacology**, v. 159, p. 154-171, 2019.
- ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C.; DE BEM, A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 279, n. 0, p. 220-231, 2014.
- BAHI, A.; AL MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; OJHA, S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, n. 1, p. 119-124, 2014.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; DOLESKI, P. H.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-9, 2016.
- BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 50-58, 2016.

BAXTER, A. J.; SCOTT, K. M.; VOS, T.; WHITEFORD, H. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 5, p. 897-910, 2012.

BEECHER, K.; BELMER, A.; BARTLETT, S. E. Chapter 6 - Anatomy of the Serotonin Transporter. In: PILOWSKY, P. M. (Ed.). **Serotonin**. Boston: Academic Press, 2019. p.121-133.

BENTO, A. F.; MARCON, R.; DUTRA, R. C.; CLAUDINO, R. F.; COLA, M.; PEREIRA LEITE, D. F.; CALIXTO, J. B. β -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR γ Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153-1166, 2011.

BERG, A. T.; BERKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J. H.; VAN EMDE BOAS, W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T. A.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I. E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D. A.; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S.; KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351-354, 2000.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 68, 2010.

BIALER, M. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 10, p. 887-895, 2012.

BONZANNI, M.; DIFRANCESCO, J. C.; MILANESI, R.; CAMPOSTRINI, G.; CASTELLOTTI, B.; BUCCHI, A.; BARUSCOTTI, M.; FERRARESE, C.; FRANCESCHETTI, S.; CANAFOGLIA, L.; RAGONA, F.; FRERI, E.; LABATE, A.; GAMBARDELLA, A.; COSTA, C.; RIVOLTA, I.; GELLERA, C.; GRANATA, T.; BARBUTI, A.; DIFRANCESCO, D. A novel de novo HCN1 loss-of-function mutation in genetic generalized epilepsy causing increased neuronal excitability. **Neurobiology of Disease**, v. 118, p. 55-63, 2018.

BOROWICZ, K. K.; FURMANEK-KARWOWSKA, K.; SAWICKA, K.; LUSZCZKI, J. J.; CZUCZWAR, S. J. Chronically administered fluoxetine enhances the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model. **European Journal of Pharmacology**, v. 567, n. 1, p. 77-82, 2007.

BRENT, D. A. Antidepressants and Suicidality. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 503-512, 2016.

BRUENIG, D.; MORRIS, C. P.; MEHTA, D.; HARVEY, W.; LAWFORD, B.; YOUNG, R. M.; VOISEY, J. Nitric oxide pathway genes (NOS1AP and NOS1) are involved in PTSD severity, depression, anxiety, stress and resilience. **Gene**, v. 625, p. 42-48, 2017.

BUCHBAUER, G.; ILIC, A. Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. In: RAMAWAT, K. G. e MÉRILLON, J.-M. (Ed.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

CAMARGO, S. B.; SIMÕES, L. O.; MEDEIROS, C. F. D. A.; DE MELO JESUS, A.; FREGONEZE, J. B.; EVANGELISTA, A.; VILLARREAL, C. F.; ARAÚJO, A. A. D. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SILVA, D. F. Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. **Biochemical Pharmacology**, v. 151, p. 38-46, 2018.

CARREÑO GUTIÉRREZ, H.; O'LEARY, A.; FREUDENBERG, F.; FEDELE, G.; WILKINSON, R.; MARKHAM, E.; VAN EEDEN, F.; REIF, A.; NORTON, W. H. J. Nitric oxide interacts with monoamine oxidase to modulate aggression and anxiety-like behaviour. **European Neuropsychopharmacology**, *In Press*, 2017.

CEBORSKA, M. Structural investigation of solid state host/guest complexes of native cyclodextrins with monoterpenes and their simple derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1165, p. 62-70, 2018.

CEBORSKA, M. Structural investigation of the β -cyclodextrin complexes with chiral bicyclic monoterpenes – Influence of the functionality group on the host-guest stoichiometry. **Journal of Molecular Structure**, v. 1145, p. 204-210, 2017.

CELEBIOGLU, A.; YILDIZ, Z. I.; UYAR, T. Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: Enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol. **Food Research International**, v. 106, p. 280-290, 2018.

CHACHLAKI, K.; GARTHWAITE, J.; PREVOT, V. The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 521, 2017.

CHAMBERS, C.; SCHAEFER, C. 2.10 - Epilepsy and antiepileptic medications. In: SCHAEFER, C.; PETERS, P. e MILLER, R. K. (Ed.). **Drugs During Pregnancy and Lactation (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2015. p.251-291.

CHAGRAOUI, A.; THIBAUT, F.; SKIBA, M.; THUILLEZ, C.; BOURIN, M. 5-HT_{2C} receptors in psychiatric disorders: A review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 66, p. 120-135, 2016.

CHANG, R. S.-K.; LEUNG, C. Y. W.; HO, C. C. A.; YUNG, A. Classifications of seizures and epilepsies, where are we? – A brief historical review and update. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 116, n. 10, p. 736-741, 2017.

CHAPPELL, J.; COATES, R. M. 1.16 - Sesquiterpenes. In: LIU, H.-W. e MANDER, L. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier, 2010. p.609-641.

CHAYTOR, A. Chlordiazepoxide. In: ENNA, S. J. e BYLUND, D. B. (Ed.). **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. New York: Elsevier, 2007. p.1-5.

CHO, Y. S.; YEN, C.-N.; SHIM, J. S.; KANG, D. H.; KANG, S. W.; LIU, J. O.; KWON, H. J. Antidepressant indatraline induces autophagy and inhibits restenosis via suppression of mTOR/S6 kinase signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34655, 2016.

CHUA, H. C.; CHEBIB, M. Chapter One - GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. In: GERAGHTY, D. P. e RASH, L. D. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, v.79, 2017. p.1-34.

CLINARD, C. T.; BADER, L. R.; SULLIVAN, M. A.; COOPER, M. A. Activation of 5-HT2a receptors in the basolateral amygdala promotes defeat-induced anxiety and the acquisition of conditioned defeat in *Syrian hamsters*. **Neuropharmacology**, v. 90, p. 102-112, 2015.

CORNETT, E. M.; NOVITCH, M. B.; BRUNK, A. J.; DAVIDSON, K. S.; MENARD, B. L.; URMAN, R. D.; KAYE, A. D. New benzodiazepines for sedation. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 32, n. 2, p. 149-164, 2018.

COSTA, M. D. S.; ROCHA, J. E.; CAMPINA, F. F.; SILVA, A. R. P.; DA CRUZ, R. P.; PEREIRA, R. L. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE MENEZES, I. R. A.; DE S. ARAÚJO, A. A.; DE FREITAS, T. S.; TEIXEIRA, A. M. R.; COUTINHO, H. D. M. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 128, p. 158-161, 2019.

CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3048-3059, 2016. CUKOR, D.; ROSENTHAL ASHER, D. S.; KIMMEL, P. L. 16 - Depression and Neurocognitive Function in Chronic Kidney Disease. In: HIMMELFARB, J. e IKIZLER, T. A. (Ed.). **Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation (Fourth Edition)**. Philadelphia: Elsevier, 2019. p.237-249.e6.

DAHAM, S.; TABANA, Y.; IQBAL, M.; AHAMED, M.; EZZAT, M.; MAJID, A.; MAJID, A. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808, 2015.

DIAS, D. D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; DE SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, n. 0, p. 79-84, 2012.

DIELEMAN, G. C.; HUIZINK, A. C.; TULEN, J. H. M.; UTENS, E. M. W. J.; CREEMERS, H. E.; VAN DER ENDE, J.; VERHULST, F. C. Alterations in HPA-axis and autonomic nervous system functioning in childhood anxiety disorders point to a chronic stress hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 135-150, 2015.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1-2, p. 23-28, 2010.

DONALDSON, Z. R.; PIEL, D. A.; SANTOS, T. L.; RICHARDSON-JONES, J.; LEONARDO, E. D.; BECK, S. G.; CHAMPAGNE, F. A.; HEN, R. Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 291-302, 2014.

DUCHÊNE, D.; BOCHOT, A. Thirty years with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, n. 1, p. 58-72, 2016.

DULANEY, E. S.; GRAUPMANN, V.; GRANT, K. E.; ADAM, E. K.; CHEN, E. Taking on the stress-depression link: Meaning as a resource in adolescence. **Journal of Adolescence**, v. 65, p. 39-49, 2018.

DUMAN, R. S.; AGHAJANIAN, G. K.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J. H. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, v. 22, p. 238, 2016.

DUNN, R. W.; REED, T. A. W.; COPELAND, P. D.; FRYE, C. A. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 7, p. 899-904, 1998.

ERDOĞAR, N.; VARAN, G.; VARAN, C.; BILENSOY, E. Chapter 19 - Cyclodextrin-based polymeric nanosystems. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems**: William Andrew Publishing, 2018. p.715-748.

Flavouring Group Evaluation 78 (FGE.78) - Consideration of Aliphatic and alicyclic and aromatic hydrocarbons evaluated by JECFA (63rd meeting) structurally related to aliphatic and aromatic hydrocarbons evaluated by EFSA in FGE.25 - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC). EFSA J. 7, 931-n/a, 2015.

FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 139, p. 73-79, 2018.

FARZAEI, M. H.; HAJIALYANI, M.; NASERI, R. Chapter 2.12 - Melatonin. In: NABAVI, S. M. e SILVA, A. S. (Ed.). **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**: Academic Press, 2019. p.99-105.

FENELON, V. C.; MIYOSHI, J. H.; MANGOLIM, C. S.; NOCE, A. S.; KOGA, L. N.; MATIOLI, G. Different strategies for cyclodextrin production: Ultrafiltration systems, CGTase immobilization and use of a complexing agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 19-27, 2018.

FENYVESI, E.; SZENTE, L. 18 - Nanoencapsulation of flavors and aromas by cyclodextrins. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Encapsulations**: Academic Press, 2016. p.769-792.

FERRAGUTI, F. Metabotropic glutamate receptors as targets for novel anxiolytics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 38, p. 37-42, 2018.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZAŁA, L.; SZUMNY, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, Hoboken, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FILIPPIS, B.; LYON, L.; TAYLOR, A.; LANE, T.; BURNET, P. W. J.; HARRISON, P. J.; BANNERMAN, D. M. The role of group II metabotropic glutamate receptors in cognition and anxiety: Comparative studies in GRM2^{-/-}, GRM3^{-/-} and GRM2/3^{-/-} knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 19-32, 2015.

FISHER, R. S.; BOAS, W. V. E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL JR., J. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M. 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.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; D'SOUZA, C.; FRENCH, J. A.; HAUT, S. R.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; SCHULZE-BONHAGE, A.; SOMERVILLE, E.; SPERLING, M.; YACUBIAN, E. M.; ZUBERI, S. M. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 531-542, 2017.

FRICKE, C.; RIECK, A.; HARDT, I. H.; KÖNIG, W. A.; MUHLE, H. Identification of (+)- β -caryophyllene in essential oils of liverworts by enantioselective gas chromatography. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1119-1121, 1995.

FRICKE-GALINDO, I.; JUNG-COOK, H.; LLERENA, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, M. Pharmacogenetics of adverse reactions to antiepileptic drugs. **Neurología (English Edition)**, v. 33, n. 3, p. 165-176, 2018.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; FLORENTINO, I. F.; LINO, R. C.; FAJEMIROYE, J. O.; CHAIBUB, B. A.; DE PAULA, J. R.; DE LIMA, T. C. M.; COSTA, E. A. 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.

GENG, C.-A.; YANG, T.-H.; HUANG, X.-Y.; MA, Y.-B.; ZHANG, X.-M.; CHEN, J.-J. Antidepressant potential of *Uncaria rhynchophylla* and its active flavanol, catechin, targeting melatonin receptors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 39-46, 2019.

GHOSAL, S.; HARE, B. D.; DUMAN, R. S. Prefrontal cortex GABAergic deficits and circuit dysfunction in the pathophysiology and treatment of chronic stress and depression. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 1-8, 2017.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary

cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GÖREN, M. Z.; KÜÇÜKIBRAHIMOĞLU, E.; BERKMAN, K.; TERZIOĞLU, B. Fluoxetine Partly Exerts its Actions Through GABA: A Neurochemical Evidence. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 9, p. 1559-1565, 2007.

GOVONI, S.; LANNI, C. Monoamines☆. In: (Ed.). **Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology**: Elsevier, 2017.

GOZUBATIK-CELIK, G.; OZKARA, C.; ULUSOY, C.; GUNDUZ, A.; DELIL, S.; YENI, N.; TUZUN, E. Anti-Neuronal Autoantibodies in Both Drug Responsive and Resistant Focal Seizures with Unknown Cause. **Epilepsy Research**, v. 135, p. 131-136, 2017.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 9, p. 667-687, 2013.

GULATI, K.; RAI, N.; RAY, A. Chapter Seven - Nitric Oxide and Anxiety. In: LITWACK, G. (Ed.). **Vitamins and Hormones**: Academic Press, v.103, 2017. p.169-192.

GULATI, S.; CHAKRABARTY, B. Dietary therapy in childhood epilepsy, an overview. **International Journal of Epilepsy**, v. 1, n. 1, p. 27-35, 2014.

GUO, Z.; WU, F.; SINGH, V.; GUO, T.; REN, X.; YIN, X.; SHAO, Q.; YORK, P.; PATTERSON, L. H.; ZHANG, J. Host-guest kinetic interactions between HP- β -cyclodextrin and drugs for prediction of bitter taste masking. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 140, p. 232-238, 2017.

GUPTA-SINGH, K.; WILSON, J. P.; BARNER, J. C.; RICHARDS, K. M.; RASCATI, K. L.; HOVINGA, C. Patterns of antiepileptic drug use in patients with potential refractory epilepsy in Texas Medicaid. **Epilepsy & Behavior**, v. 87, p. 108-116, 2018.

HASHIMOTO, K. Chapter Three - Metabolomics of Major Depressive Disorder and Bipolar Disorder: Overview and Future Perspective. In: MAKOWSKI, G. S. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v.84, 2018. p.81-99.

HASSELL, J. E.; YAMASHITA, P. S. M.; JOHNSON, P. L.; ZANGROSSI, H.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Chapter 15 - Stress, Panic, and Central Serotonergic Inhibition. In: FINK, G. (Ed.). **Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology**. San Diego: Academic Press, 2017. p.153-164.

HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression — A central role for the serotonin transporter? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 147, p. 1-11, 2015.

HASLER, G.; NEUMEISTER, A.; VAN DER VEEN, J. W.; TUMONIS, T.; BAIN, E. E.; SHEN, J.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. Normal Prefrontal Gamma-Aminobutyric Acid Levels in Remitted Depressed Subjects Determined by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 12, p. 969-973, 2005.

HASLER, G.; VAN DER VEEN, J.; TUMONIS, T.; MEYERS, N.; SHEN, J.; DREVETS, W. C. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and γ -aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 193-200, 2007.

HAY, S. I.; ABAJOBIR, A. A.; ABATE, K. H.; ABBAFATI, C.; ABBAS, K. M.; ABD-ALLAH, F.; ABDULKADER, R. S.; ABDULLE, A. M.; ABEBO, T. A.; ABERA, S. F.; ABOYANS, V.; ABU-RADDAD, L. J.; ACKERMAN, I. N.; ADEDEJI, I. A.; ADETOKUNBOH, O.; AFSHIN, A.; AGGARWAL, R.; AGRAWAL, S.; AGRAWAL, A.; AHMED, M. B.; AICHOOR, M. T. E.; AICHOOR, A. N.; AICHOOR, I.; AIYAR, S.; AKINYEMIJU, T. F.; AKSEER, N.; AL LAMI, F. H.; ALAHDAB, F.; AL-ALY, Z.; ALAM, K.; ALAM, N.; ALAM, T.; ALASFOOR, D.; ALENE, K. A.; ALI, R.; ALIZADEH-NAVAEI, R.; ALKAABI, J. M.; ALKERWI, A. A.; ALLA, F.; ALLEBECK, P.; ALLEN, C.; AL-MASKARI, F.; ALMAZROA, M. A.; AL-RADDADI, R.; ALSHARIF, U.; ALSOWAIDI, S.; ALTHOUSE, B. M.; ALTIRKAWI, K. A.; ALVIS-GUZMAN, N.; AMARE, A. T.; AMINI, E.; AMMAR, W.; AMOAKO, Y. A.; ANSHA, M. G.; ANTONIO, C. A. T.; ANWARI, P.; ÄRNLÖV, J.; ARORA, M.; ARTAMAN, A.; ARYAL, K. K.; ASGEDOM, S. W.; ATEY, T. M.; ATNAFU, N. T.; AVILA-BURGOS, L.; AVOKPAHO, E. F. G. A.; AWASTHI, A.; AWASTHI, S.; AZARPAZHOOH, M. R.; AZZOPARDI, P.; BABALOLA, T. K.; BACHA, U.; BADAWI, A.; BALAKRISHNAN, K.; BANNICK, M. S.; BARAC, A.; BARKER-COLLO, S. L.; BÄRNIGHAUSEN, T.; BARQUERA, S.; BARRERO, L. H.; BASU, S.; BATTISTA, R.; BATTLE, K. E.; BAUNE, B. T.; BAZARGAN-HEJAZI, S.; BEARDSLEY, J.; BEDI, N.; BÉJOT, Y.; BEKELE, B. B.; BELL, M. L.; BENNETT, D. A.; BENNETT, J. R.; BENSENOR, I. M.; BENSON, J.; BERHANE, A.; BERHE, D. F.; BERNABÉ, E.; BETSU, B. D.; BEURAN, M.; BEYENE, A. S.; BHANSALI, A.; BHATT, S.; BHUTTA, Z. A.; BIADGILIGN, S.; BICER, B. K.; BIENHOFF, K.; BIKBOV, B.; BIRUNGI, C.; BIRYUKOV, S.; BISANZIO, D.; BIZUAYEHU, H. M.; BLYTH, F. M.; BONEYA, D. J.; BOSE, D.; BOU-ORM, I. R.; BOURNE, R. R. A.; BRAININ, M.; BRAYNE, C.; BRAZINOVA, A.; BREITBORDE, N. J. K.; BRIANT, P. S.; BRITTON, G.; BRUGHA, T. S.; BUCHBINDER, R.; BULTO, L. N. B.; BUMGARNER, B. R.; BUTT, Z. A.; CAHUANA-HURTADO, L.; CAMERON, E.; CAMPOS-NONATO, I. R.; CARABIN, H.; CÁRDENAS, R.; CARPENTER, D. O.; CARRERO, J. J.; CARTER, A.; CARVALHO, F.; CASEY, D.; CASTAÑEDA-ORJUELA, C. A.; CASTLE, C. D.; CATALÁ-LÓPEZ, F.; CHANG, J.-C.; CHARLSON, F. J.; CHATURVEDI, P.; CHEN, H.; CHIBALABALA, M.; CHIBUEZE, C. E.; CHISUMPA, V. H.; CHITHEER, A. A.; CHOWDHURY, R.; CHRISTOPHER, D. J.; CIOBANU, L. G.; CIRILLO, M.; COLOMBARA, D.; COOPER, L. T.; COOPER, C.; CORTESI, P. A.; CORTINOVIS, M.; CRIQUI, M. H.; CROMWELL, E. A.; CROSS, M.; CRUMP, J. A.; DADI, A. F.; DALAL, K.; DAMASCENO, A.; DANDONA, L.; DANDONA, R.; DAS NEVES, J.; DAVITOIU, D. V.; DAVLETOV, K.; DE COURTEN, B.; DE LEO, D.; DE STEUR, H.; DEFO, B. K.; DEGENHARDT, L.; DEIPARINE, S.; DELLAVALLE, R. P.; DERIBE, K.; DERIBEW, A.; DES JARLAIS, D. C.; DEY, S.; DHARMARATNE, S. D.; DHILLON, P. K.; DICKER, D.; DJALAINIA, S.; DO, H. P.; DOKOVA, K.; DOKU, D. T.; DORSEY, E. R.; DOS SANTOS, K. P. B.; DRISCOLL, T. R.; DUBEY, M.; DUNCAN, B. B.; EBEL, B. E.; ECHKO, M.; EL-KHATIB, Z. Z.; ENAYATI, A.; ENDRIES, A. Y.; ERMAKOV, S. P.; ERSKINE, H. E.; ESHETIE, S.; ESHRATI, B.; ESTEGHAMATI, A.; ESTEP, K.; FANUEL, F. B. B.; FARAG, T.; FARINHA, C. S. E. S.; FARO, A.; FARZADFAR, F.; FAZELI, M. S.; FEIGIN, V. L.; FEIGL, A. B.; FERESHTEHNEJAD, S.-M.; FERNANDES, J. C.; FERRARI, A. J.; FEYISSA, T. R.; FILIP, I.; FISCHER, F.; FITZMAURICE, C.; FLAXMAN, A. D.; FOIGT, N.; FOREMAN, K. J.; FRANKLIN, R. C.;

FROSTAD, J. J.; FULLMAN, N.; FÜRST, T.; FURTADO, J. M.; FUTRAN, N. D.;
 GAKIDOU, E.; GARCIA-BASTEIRO, A. L.; GEBRE, T.; GEBREGERGS, G. B.;
 GEBREHIWOT, T. T.; GELEIJNSE, J. M.; GELETO, A.; GEMECHU, B. L.; GESESEW,
 H. A.; GETHING, P. W.; GHAJAR, A.; GIBNEY, K. B.; GILLUM, R. F.; GINAWI, I. A.
 M.; GISHU, M. D.; GIUSSANI, G.; GODWIN, W. W.; GOEL, K.; GOENKA, S.;
 GOLDBERG, E. M.; GONA, P. N.; GOODRIDGE, A.; GOPALANI, S. V.; GOSSELIN, R.
 A.; GOTAY, C. C.; GOTO, A.; GOULART, A. C.; GRAETZ, N.; GUGNANI, H. C.;
 GUPTA, P. C.; GUPTA, R.; GUPTA, T.; GUPTA, V.; GUPTA, R.; GUTIÉRREZ, R. A.;
 HACHINSKI, V.; HAFEZI-NEJAD, N.; HAILU, A. D.; HAILU, G. B.; HAMADEH, R. R.;
 HAMIDI, S.; HAMMAMI, M.; HANDAL, A. J.; HANKEY, G. J.; HAO, Y.; HARB, H. L.;
 HARERI, H. A.; HARO, J. M.; HARUN, K. M.; HARVEY, J.; HASSANVAND, M. S.;
 HAVMOELLER, R.; HAY, R. J.; HEDAYATI, M. T.; HENDRIE, D.; HENRY, N. J.;
 HEREDIA-PI, I. B.; HEYDARPOUR, P.; HOEK, H. W.; HOFFMAN, H. J.; HORINO, M.;
 HORITA, N.; HOSGOOD, H. D.; HOSTIUC, S.; HOTEZ, P. J.; HOY, D. G.; HTET, A. S.;
 HU, G.; HUANG, J. J.; HUYNH, C.; IBURG, K. M.; IGUMBOR, E. U.; IKEDA, C.;
 IRVINE, C. M. S.; ISLAM, S. M. S.; JACOBSEN, K. H.; JAHANMEHR, N.;
 JAKOVLJEVIC, M. B.; JAMES, P.; JASSAL, S. K.; JAVANBAKHT, M.; JAYARAMAN,
 S. P.; JEEMON, P.; JENSEN, P. N.; JHA, V.; JIANG, G.; JOHN, D.; JOHNSON, C. O.;
 JOHNSON, S. C.; JONAS, J. B.; JÜRISSE, M.; KABIR, Z.; KADEL, R.; KAHSAY, A.;
 KAMAL, R.; KAR, C.; KARAM, N. E.; KARCH, A.; KAREMA, C. K.; KARIMI, S. M.;
 KARIMKHANI, C.; KASAEIAN, A.; KASSA, G. M.; KASSAW, N. A.; KASSEBAUM, N.
 J.; KASTOR, A.; KATIKIREDDI, S. V.; KAUL, A.; KAWAKAMI, N.; KEIYORO, P. N.;
 KEMMER, L.; KENGNE, A. P.; KEREN, A.; KESAVACHANDRAN, C. N.; KHADER, Y.
 S.; KHALIL, I. A.; KHAN, E. A.; KHANG, Y.-H.; KHOJA, A. T.; KHOSRAVI, A.;
 KHUBCHANDANI, J.; KIADALIRI, A. A.; KIELING, C.; KIM, Y. J.; KIM, D.;
 KIMOKOTI, R. W.; KINFU, Y.; KISA, A.; KISSIMOVA-SKARBEB, K. A.; KISSOON, N.;
 KIVIMAKI, M.; KNUDSEN, A. K.; KOKUBO, Y.; KOLTE, D.; KOPEC, J. A.; KOSEN, S.;
 KOTSAKIS, G. A.; KOUL, P. A.; KOYANAGI, A.; KRAVCHENKO, M.; KROHN, K. J.;
 KUMAR, G. A.; KUMAR, P.; KYU, H. H.; LAGER, A. C. J.; LAL, D. K.; LALLOO, R.;
 LALLUKKA, T.; LAMBERT, N.; LAN, Q.; LANSINGH, V. C.; LARSSON, A.; LEASHER,
 J. L.; LEE, P. H.; LEIGH, J.; LESHARGIE, C. T.; LEUNG, J.; LEUNG, R.; LEVI, M.; LI,
 Y.; LI, Y.; LIANG, X.; LIBEN, M. L.; LIM, S. S.; LINN, S.; LIU, P. Y.; LIU, A.; LIU, S.;
 LIU, Y.; LODHA, R.; LOGROSCINO, G.; LOOKER, K. J.; LOPEZ, A. D.; LORKOWSKI,
 S.; LOTUFO, P. A.; LOZANO, R.; LUCAS, T. C. D.; LUNEVICIUS, R.; LYONS, R. A.;
 MACARAYAN, E. R. K.; MADDISON, E. R.; MAGDY ABD EL RAZEK, H. M. A.;
 MAGDY ABD EL RAZEK, M.; MAGIS-RODRIGUEZ, C.; MAHDAVI, M.; MAJDAN, M.;
 MAJZADEH, R.; MAJEED, A.; MALEKZADEH, R.; MALHOTRA, R.; MALTA, D. C.;
 MAMUN, A. A.; MANGUERRA, H.; MANHERTZ, T.; MANTOVANI, L. G.; MAPOMA,
 C. C.; MARCH, L. M.; MARCZAK, L. B.; MARTINEZ-RAGA, J.; MARTINS, P. H. V.;
 MARTINS-MELO, F. R.; MARTOPULLO, I.; MÄRZ, W.; MATHUR, M. R.; MAZIDI, M.;
 MCALINDEN, C.; MCGAUGHEY, M.; MCGRATH, J. J.; MCKEE, M.; MEHATA, S.;
 MEIER, T.; MELES, K. G.; MEMIAH, P.; MEMISH, Z. A.; MENDOZA, W.; MENGESHA,
 M. M.; MENGISTIE, M. A.; MENGISTU, D. T.; MENSAH, G. A.; MERETOJA, T. J.;
 MERETOJA, A.; MEZGEBE, H. B.; MICHA, R.; MILLEAR, A.; MILLER, T. R.; MINNIG,
 S.; MIRAREFIN, M.; MIRRAKHIMOV, E. M.; MISGANAW, A.; MISHRA, S. R.;
 MITCHELL, P. B.; MOHAMMAD, K. A.; MOHAMMADI, A.; MOHAMMED, M. S. K.;
 MOHAMMED, K. E.; MOHAMMED, S.; MOHAN, M. B. V.; MOKDAD, A. H.;
 MOLLENKOPF, S. K.; MONASTA, L.; MONTAÑEZ HERNANDEZ, J. C.; MONTICO,
 M.; MORADI-LAKEH, M.; MORAGA, P.; MORAWSKA, L.; MORI, R.; MORRISON, S.
 D.; MOSES, M.; MOUNTJOY-VENNING, C.; MRUTS, K. B.; MUELLER, U. O.;

MULLER, K.; MURDOCH, M. E.; MURTHY, G. V. S.; MURTHY, S.; MUSA, K. I.;
 NACHEGA, J. B.; NAGEL, G.; NAGHAVI, M.; NAHEED, A.; NAIDOO, K. S.; NANGIA,
 V.; NASHER, J. T.; NATARAJAN, G.; NEGASA, D. E.; NEGOI, R. I.; NEGOI, I.;
 NEWTON, C. R.; NGUNJIRI, J. W.; NGUYEN, C. T.; NGUYEN, Q. L.; NGUYEN, T. H.;
 NGUYEN, G.; NGUYEN, M.; NICHOLS, E.; NINGRUM, D. N. A.; NONG, V. M.;
 NORHEIM, O. F.; NORRVING, B.; NOUBIAP, J. J. N.; NYANDWI, A.; OBERMEYER, C.
 M.; O'DONNELL, M. J.; OGBO, F. A.; OH, I.-H.; OKORO, A.; OLADIMEJI, O.;
 OLAGUNJU, A. T.; OLAGUNJU, T. O.; OLSEN, H. E.; OLUSANYA, B. O.; OLUSANYA,
 J. O.; ONG, K.; OPIO, J. N.; OREN, E.; ORTIZ, A.; OSBORNE, R. H.; OSGOOD-
 ZIMMERMAN, A.; OSMAN, M.; OTA, E.; OWOLABI, M. O.; PA, M.; PACELLA, R. E.;
 PANDA, B. K.; PANDIAN, J. D.; PAPACHRISTOU, C.; PARK, E.-K.; PARRY, C. D.;
 PARSAEIAN, M.; PATIL, S. T.; PATTEN, S. B.; PATTON, G. C.; PAUDEL, D.;
 PAULSON, K.; PEARCE, N.; PEREIRA, D. M.; PEREZ, K. M.; PERICO, N.; PESUDOV,
 K.; PETERSON, C. B.; PETRI, W. A.; PETZOLD, M.; PHILLIPS, M. R.; PHIPPS, G.;
 PIGOTT, D. M.; PILLAY, J. D.; PINHO, C.; PIRADOV, M. A.; PLASS, D.; PLETCHER,
 M. A.; POPOVA, S.; POULTON, R. G.; POURMALEK, F.; PRABHAKARAN, D.;
 PRASAD, N.; PURCELL, C.; PURWAR, M.; QORBANI, M.; QUINTANILLA, B. P. A.;
 RABIEE, R. H. S.; RADFAR, A.; RAFAY, A.; RAHIMI, K.; RAHIMI-MOVAGHAR, A.;
 RAHIMI-MOVAGHAR, V.; RAHMAN, M. H. U.; RAHMAN, M. A.; RAHMAN, M.; RAI,
 R. K.; RAJSIC, S.; RAM, U.; RANABHAT, C. L.; RANGASWAMY, T.; RANKIN, Z.;
 RAO, P. V.; RAO, P. C.; RAWAF, S.; RAY, S. E.; REINER, R. C.; REINIG, N.; REITSMA,
 M.; REMUZZI, G.; RENZANO, A. M. N.; RESNIKOFF, S.; REZAEI, S.; RIBEIRO, A. L.;
 RIVAS, J. C.; ROBA, H. S.; ROBINSON, S. R.; ROJAS-RUEDA, D.; ROKNI, M. B.;
 RONFANI, L.; ROSHANDEL, G.; ROTH, G. A.; ROTHENBACHER, D.; ROY, A.;
 RUBAGOTTI, E.; RUHAGO, G. M.; SAADAT, S.; SAFDARIAN, M.; SAFIRI, S.; SAGAR,
 R.; SAHATHEVAN, R.; SAHRAIAN, M. A.; SALAMA, J.; SALEH, M. M.; SALOMON, J.
 A.; SALVI, S. S.; SAMY, A. M.; SANABRIA, J. R.; SANCHEZ-NIÑO, M. D.;
 SANTOMAURO, D.; SANTOS, J. V.; SANTOS, I. S.; SANTRIC MILICEVIC, M. M.;
 SARTORIUS, B.; SATPATHY, M.; SAWHNEY, M.; SAXENA, S.; SCHELONKA, K.;
 SCHMIDT, M. I.; SCHNEIDER, I. J. C.; SCHÖTTKER, B.; SCHUTTE, A. E.;
 SCHWEBEL, D. C.; SCHWENDICKE, F.; SEEDAT, S.; SEPANLOU, S. G.; SERVAN-
 MORI, E. E.; SHAHEEN, A.; SHAIKH, M. A.; SHAMSIPOUR, M.; SHARMA, R.;
 SHARMA, J.; SHE, J.; SHI, P.; SHIBUYA, K.; SHIELDS, C.; SHIFA, G. T.; SHIFERAW,
 M. S.; SHIGEMATSU, M.; SHIRI, R.; SHIRKOOHI, R.; SHIRUDE, S.; SHISHANI, K.;
 SHOMAN, H.; SIABANI, S.; SIBAI, A. M.; SIGFUSDOTTIR, I. D.; SILBERBERG, D. H.;
 SILVA, D. A. S.; SILVA, J. P.; SILVEIRA, D. G. A.; SINGH, J. A.; SINGH, O. P.; SINGH,
 N. P.; SINGH, V.; SINHA, D. N.; SKIADARESI, E.; SLEPAK, E. L.; SMITH, D. L.;
 SMITH, M.; SOBAIH, B. H. A.; SOBNGWI, E.; SOLJAK, M.; SORENSEN, R. J. D.;
 SOUSA, T. C. M.; SPOSATO, L. A.; SREERAMAREDDY, C. T.; SRINIVASAN, V.;
 STANAWAY, J. D.; STATHOPOULOU, V.; STEEL, N.; STEIN, D. J.; STEINER, C.;
 STEINKE, S.; STOKES, M. A.; STOVNER, L. J.; STRUB, B.; SUBART, M.; SUFIYAN,
 M. B.; SUNGUYA, B. F.; SUR, P. J.; SWAMINATHAN, S.; SYKES, B. L.; SYLTE, D.;
 SZOEKE, C. E. I.; TABARÉS-SEISDEDOS, R.; TADAKAMADLA, S. K.; TAFFERE, G.
 R.; TAKALA, J. S.; TANDON, N.; TANNE, D.; TAREKEGN, Y. L.; TAVAKKOLI, M.;
 TAVEIRA, N.; TAYLOR, H. R.; TEGEGNE, T. K.; TEHRANI-BANIHASHEMI, A.;
 TEKELAB, T.; TERKAWI, A. S.; TEFAYE, D. J.; TESSSEMA, B.; THAKUR, J. S.;
 THAMSUWAN, O.; THEADOM, A. M.; THEIS, A. M.; THOMAS, K. E.; THOMAS, N.;
 THOMPSON, R.; THRIFT, A. G.; TOBE-GAI, R.; TOBOLLIK, M.; TONELLI, M.;
 TOPOR-MADRY, R.; TORTAJADA, M.; TOUVIER, M.; TRAEBERT, J.; TRAN, B. X.;
 TROEGER, C.; TRUELSEN, T.; TSOI, D.; TUZCU, E. M.; TYMESON, H.; TYROVOLAS,

S.; UKWAJA, K. N.; UNDURRAGA, E. A.; UNEKE, C. J.; UPDIKE, R.; UTHMAN, O. A.; UZOCHUKWU, B. S. C.; VAN BOVEN, J. F. M.; VARUGHESE, S.; VASANKARI, T.; VEERMAN, L. J.; VENKATESH, S.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VIDAVALUR, R.; VIJAYAKUMAR, L.; VIOLANTE, F. S.; VISHNU, A.; VLADIMIROV, S. K.; VLASSOV, V. V.; VOLLSET, S. E.; VOS, T.; WADILO, F.; WAKAYO, T.; WALLIN, M. T.; WANG, Y.-P.; WEICHENTHAL, S.; WEIDERPASS, E.; WEINTRAUB, R. G.; WEISS, D. J.; WERDECKER, A.; WESTERMAN, R.; WHITEFORD, H. A.; WIJERATNE, T.; WILLIAMS, H. C.; WIYSONGE, C. S.; WOLDEYES, B. G.; WOLFE, C. D. A.; WOODBROOK, R.; WOOLF, A. D.; WORKICHO, A.; XAVIER, D.; XU, G.; YADGIR, S.; YAGHOUBI, M.; YAKOB, B.; YAN, L. L.; YANO, Y.; YE, P.; YIHDEGO, M. G.; YIMAM, H. H.; YIP, P.; YONEMOTO, N.; YOON, S.-J.; YOTEBIENG, M.; YOUNIS, M. Z.; YU, C.; ZAIDI, Z.; ZAKI, M. E. S.; ZEGEYE, E. A.; ZENEBE, Z. M.; ZHANG, X.; ZHENG, Y.; ZHOU, M.; ZIPKIN, B.; ZODPEY, S.; ZOECKLER, L.; ZUHLKE, L. J.; MURRAY, C. J. L. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2013;2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1260-1344, 2017.

HEIBERG, I. L.; WEGENER, G.; ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1, p. 479-484, 2002.

HOLLAS, M. A.; BEN AISSA, M.; LEE, S. H.; GORDON-BLAKE, J. M.; THATCHER, G. R. J. Pharmacological manipulation of cGMP and NO/cGMP in CNS drug discovery. **Nitric Oxide**, v. 82, p. 59-74, 2019.

HORVÁTH, J.; SZÖGI, T.; MÜLLER, G.; SZEGEDI, V. The anxiolytic buspirone shifts coping strategy in novel environmental context of mice with different anxious phenotype. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 32-38, 2013.

HUANG, T.-L.; LIN, C.-C. Chapter Seven - Advances in Biomarkers of Major Depressive Disorder. In: MAKOWSKI, G. S. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v.68, 2015. p.177-204.

HYN, S. I.; HAMILTON, S. P. The Genetics of Major Depression: Moving Beyond the Monoamine Hypothesis. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 125-140, 2010.

IBARRA-LECUE, I.; PILAR-CUÉLLAR, F.; MUGURUZA, C.; FLORENSA-ZANUY, E.; DÍAZ, Á.; URIGÜEN, L.; CASTRO, E.; PAZOS, A.; CALLADO, L. F. The endocannabinoid system in mental disorders: Evidence from human brain studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 97-107, 2018.

IKEDA, M.; KNAPP, R. J.; MALATYNSKA, E.; YAMAMURA, H. I. Amoxapine inhibition of GABA-stimulated chloride conductance: investigations of potential sites of activity. **Life Sciences**, v. 45, n. 20, p. 1903-1910, 1989.

INIESTA, R.; HODGSON, K.; STAHL, D.; MALKI, K.; MAIER, W.; RIETSCHEL, M.; MORS, O.; HAUSER, J.; HENIGSBERG, N.; DERNOVSEK, M. Z.; SOUERY, D.; DOBSON, R.; AITCHISON, K. J.; FARMER, A.; MCGUFFIN, P.; LEWIS, C. M.; UHER,

R. Antidepressant drug-specific prediction of depression treatment outcomes from genetic and clinical variables. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5530, 2018.

ISLAM, M. M.; NIELSEN, S.; MCRAE, I. S.; HABER, P. S.; DEMIRKOL, A.; MURNION, B.; WILSON, H.; CONIGRAVE, K. M. Chapter 28 - Prescribing and Dispensing of Benzodiazepines: Implications for Dependence and Misuse. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse**. San Diego: Academic Press, 2016. p.283-292.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 79-90, 2018.

JIN, Z.-L.; GAO, N.; LI, X.-R.; TANG, Y.; XIONG, J.; CHEN, H.-X.; XUE, R.; LI, Y.-F. The antidepressant-like pharmacological profile of Yuanzhi-1, a novel serotonin, norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 544-556, 2015.

JONES, M.; JORGE, R. E. Chapter 11 - Depression and Other Neuropsychiatric Issues Following Stroke. In: WILSON, R. e RAGHAVAN, P. (Ed.). **Stroke Rehabilitation**: Elsevier, 2019. p.155-168.

JOSHI, R. K. Sesquiterpene rich essential oil of *Vernonia cinerea* Less. from India. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 129-130, 2014.

JOUNG, H.-Y.; JUNG, E.-Y.; KIM, K.; LEE, M.-S.; HER, S.; SHIM, I. The differential role of NOS inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 2, p. 176-181, 2012.

JUDGE, B. S.; RENTMEESTER, L. L. Antidepressant Overdose–induced Seizures. **Neurologic Clinics**, v. 29, n. 3, p. 565-580, 2011.

JUNG, J. I.; KIM, E. J.; KWON, G. T.; JUNG, Y. J.; PARK, T.; KIM, Y.; YU, R.; CHOI, M.-S.; CHUN, H. S.; KWON, S.-H.; HER, S.; LEE, K. W.; PARK, J. H. Y. β -Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in high-fat diet–induced obese C57BL/6N mice. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 9, p. 1028-1039, 2015.

KAHL, K. G.; STAPEL, B.; FRIELING, H. Link between depression and cardiovascular diseases due to epigenomics and proteomics: Focus on energy metabolism. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 89, p. 146-157, 2019.

KALOUDA, T.; PITSIKAS, N. The nitric oxide donor molsidomine induces anxiolytic-like behaviour in two different rat models of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 138, p. 111-116, 2015.

KAMIKUBO, R.; KAI, K.; TSUJI-NAITO, K.; AKAGAWA, M. β -Caryophyllene attenuates palmitate-induced lipid accumulation through AMPK signaling by activating CB2 receptor in human HepG2 hepatocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 10, p. 2228-2242, 2016.

KANNER, A. M. The treatment of depressive disorders in epilepsy: What all neurologists should know. **Epilepsia**, v. 54, n. s1, p. 3-12, 2013.

KANG, J.-Q. Defects at the crossroads of GABAergic signaling in generalized genetic epilepsies. **Epilepsy Research**, v. 137, p. 9-18, 2017.

KAO, C.-F.; LIU, Y.-L.; YU, Y. W. Y.; YANG, A. C.; LIN, E.; KUO, P.-H.; TSAI, S.-J. Gene-based analysis of genes related to neurotrophic pathway suggests association of BDNF and VEGFA with antidepressant treatment-response in depressed patients. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6983, 2018.

KANNER, A. M. The treatment of depressive disorders in epilepsy: What all neurologists should know. **Epilepsia**, v. 54, n. s1, p. 3-12, 2013.

KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Chapter 22 - Nanoencapsulation of Essential Oils: A Possible Way for an Eco-Friendly Strategy to Control Postharvest Spoilage of Food Commodities From Pests. In: TRIPATHI, D. K.; AHMAD, P.; SHARMA, S.; CHAUHAN, D. K. e DUBEY, N. K. (Ed.). **Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms**: Academic Press, 2018. p.501-522.

KHAN, M.; MAHMOOD, A.; ALKHATHLAN, H. Z. Characterization of leaves and flowers volatile constituents of Lantana camara growing in central region of Saudi Arabia. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 764-774, 2016.

KOSE, S.; CETIN, M. Triple reuptake inhibitors (TRIs): do they promise us a rose garden? **Psychiatry and Clinical Psychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 119-122, 2018.

KRASS, M.; WEGENER, G.; VASAR, E.; VOLKE, V. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. **Behavioural Brain Research**, v. 218, n. 1, p. 57-63, 2011.

KRISHNAN, K. R. R. Chapter 30 - Stress, Mood, and Pathways to Depression. In: CONN, P. M. (Ed.). **Conn's Translational Neuroscience**. San Diego: Academic Press, 2017. p.663-678.

KUMAR, A.; GARG, R.; GAUR, V.; KUMAR, P. Venlafaxine involves nitric oxide modulatory mechanism in experimental model of chronic behavior despair in mice. **Brain Research**, v. 1311, p. 73-80, 2010.

LAVERTY, D.; DESAI, R.; UCHAŃSKI, T.; MASIULIS, S.; STEC, W. J.; MALINAUSKAS, T.; ZIVANOV, J.; PARDON, E.; STEYAERT, J.; MILLER, K. W.; ARICESCU, A. R. Cryo-EM structure of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABAA receptor in a lipid bilayer. **Nature**, v. 565, n. 7740, p. 516-520, 2019.

LEE, S. Y. Media coverage of celebrity suicide caused by depression and increase in the number of people who seek depression treatment. **Psychiatry Research**, v. 271, p. 598-603, 2019.

LIAO, P.; HEMMERLIN, A.; BACH, T. J.; CHYE, M.-L. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 697-713, 2016.

LI, P.; SONG, J.; NI, X.; GUO, Q.; WEN, H.; ZHOU, Q.; SHEN, Y.; HUANG, Y.; QIU, P.; LIN, S.; HU, H. Comparison in toxicity and solubilizing capacity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with different degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1, p. 347-356, 2016.

LI, H.; ISHIKAWA, C.; SHIGA, T. Effects of postnatal handling on adult behavior and brain mRNA expression of serotonin receptor, brain-derived neurotrophic factor and GABA-A receptor subunit. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 68, p. 17-25, 2018.

LI, H.; GE, S.; GREENE, B.; DUNBAR-JACOB, J. Depression in the context of chronic diseases in the United States and China. **International Journal of Nursing Sciences**, *In Press*, 2018.

LILLESAAR, C.; GASPAR, P. Chapter 3 - Serotonergic Neurons in Vertebrate and Invertebrate Model Organisms (Rodents, Zebrafish, *Drosophila melanogaster*, *Aplysiacalifornica*, *Caenorhabditis elegans*). In: PILOWSKY, P. M. (Ed.). **Serotonin**. Boston: Academic Press, 2019. p.49-80.

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T.; LIU, F.; ZHUANG, K.; LUO, K.; YANG, L. Neuroprotective Effects of Trans-Caryophyllene Against Kainic Acid Induced Seizure Activity and Oxidative Stress in Mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

LOFTSSON, T.; MOYA-ORTEGA, M. D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 544-555, 2016.

LÖSCHER, W.; KLITGAARD, H.; TWYMAN, R. E.; SCHMIDT, D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 757, 2013.

LOTFALIANY, M.; BOWE, S. J.; KOWAL, P.; ORELLANA, L.; BERK, M.; MOHEBBI, M. Depression and chronic diseases: Co-occurrence and communality of risk factors. **Journal of Affective Disorders**, v. 241, p. 461-468, 2018.

LUSCHER, B.; FUCHS, T. Chapter Five - GABAergic Control of Depression-Related Brain States. In: RUDOLPH, U. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, v.73, 2015. p.97-144.

LUSCHER, B.; SHEN, Q.; SAHIR, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 16, p. 383, 2010.

ŁUSZCZKI, J. J. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 2, p. 197-216, 2009.

LUTZ, B.; MARSICANO, G.; MALDONADO, R.; HILLARD, C. J. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 705, 2015.

MAJERCSIK, E.; HALLER, J.; LEVELEKI, C.; BARANYI, J.; HALÁSZ, J.; RODGERS, R. J. The effect of social factors on the anxiolytic efficacy of buspirone in male rats, male mice, and men. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1187-1199, 2003.

MALAQUIAS, L. F. B.; SÁ-BARRETO, L. C. L.; FREIRE, D. O.; SILVA, I. C. R.; KARAN, K.; DURIG, T.; LIMA, E. M.; MARRETO, R. N.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. Taste masking and rheology improvement of drug complexed with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin by hot-melt extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 185, p. 19-26, 2018.

MASIULIS, S.; DESAI, R.; UCHAŃSKI, T.; SERNA MARTIN, I.; LAVERTY, D.; KARIA, D.; MALINAUSKAS, T.; ZIVANOV, J.; PARDON, E.; KOTECHA, A.; STEYAERT, J.; MILLER, K. W.; ARICESCU, A. R. GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. **Nature**, v. 565, n. 7740, p. 454-459, 2019.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 11, p. e442, 2006.

MATSUZAWA-YANAGIDA, K.; NARITA, M.; NAKAJIMA, M.; KUZUMAKI, N.; NIIKURA, K.; NOZAKI, H.; TAKAGI, T.; TAMAI, E.; HAREYAMA, N.; TERADA, M.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Usefulness of Antidepressants for Improving the Neuropathic Pain-Like State and Pain-Induced Anxiety through Actions at Different Brain Sites. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 1952, 2007.

MCEOWN, K.; TREIT, D. α 2 GABAA receptor sub-units in the ventral hippocampus and α 5 GABAA receptor sub-units in the dorsal hippocampus mediate anxiety and fear memory. **Neuroscience**, v. 252, p. 169-177, 2013.

MENDEZ-DAVID, I.; DAVID, D. J.; DARCET, F.; WU, M. V.; Kerdine-Römer, S.; Gardier, A. M.; Hen, R. Rapid Anxiolytic Effects of a 5-HT4 Receptor Agonist Are Mediated by a Neurogenesis-Independent Mechanism. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 1366, 2013.

METHUKU, K. R.; LI, X.; CERNE, R.; GLEASON, S. D.; SCHKERYANTZ, J. M.; TIRUVEEDHULA, V. V. N. P. B.; GOLANI, L. K.; LI, G.; POE, M. M.; RAHMAN, M. T.; COOK, J. M.; FISHER, J. L.; WITKIN, J. M. An antidepressant-related pharmacological signature for positive allosteric modulators of α 2/3-containing GABAA receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 170, p. 9-13, 2018.

MORENO-CASTILLA, P.; RODRIGUEZ-DURAN, L. F.; GUZMAN-RAMOS, K.; BARCENAS-FEMAT, A.; ESCOBAR, M. L.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. **Neurobiology of Aging**, v. 41, p. 187-199, 2016.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226-238, 2015.

NIKOLIĆ, V.; ILIĆ-STOJANOVIĆ, S.; PETROVIĆ, S.; TAČIĆ, A.; NIKOLIĆ, L. Chapter 21 - Administration Routes for Nano Drugs and Characterization of Nano Drug Loading. In: MOHAPATRA, S. S.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; MISHRA, R. K. e THOMAS, S. (Ed.). **Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery**: Elsevier, 2019. p.587-625.

NUUTINEN, T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 198-228, 2018.

OHNO, Y. Chapter 18 - Serotonin Receptors as the Therapeutic Target for Central Nervous System Disorders. In: PILOWSKY, P. M. (Ed.). **Serotonin**. Boston: Academic Press, 2019. p.369-390.

OLSEN, R. W. GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. **Neuropharmacology**, v. 136, p. 10-22, 2018.

OLIVEIRA, F. D. S.; FREITAS, T. S. D.; CRUZ, R. P. D.; COSTA, M. D. S.; PEREIRA, R. L. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ANDRADE, T. D. A.; MENEZES, P. D. P.; SOUSA, B. M. H. D.; NUNES, P. S.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, I. R. A. D.; ARAÚJO, A. A. D. S.; COUTINHO, H. D. M. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 1111-1118, 2017.

OLIVEIRA, M. G. B.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; CARVALHO, Y. M. B. G.; SILVA, J. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; SHANMUGAM, S.; THANGARAJ, P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 254, p. 54-62, 2016.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. D. M.; PESSOA, R. T.; FERNANDES, M. N. M.; ALCÂNTARA, I. S.; DA SILVA, B. A. F.; DE OLIVEIRA, M. R. C.; MARTINS, A. O. B. P. B.; DA SILVA, M. D. S.; TINTINO, S. R.; RODRIGUES, F. F. G.; DA COSTA, J. G. M.; DE LIMA, S. G.; KERNTOPF, M. R.; DA SILVA, T. G.; DE MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82-95, 2018.

ORFANIDOU, M. A.; LAFIONIATIS, A.; TREVLOPOULOU, A.; TOUZLATZI, N.; PITSIKAS, N. Acute and repeated exposure with the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) differentially modulate responses in a rat model of anxiety. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 56-60, 2017.

OSTADHADI, S.; SHAKIBA, S.; NOROUZI-JAVIDAN, A.; NIKOUI, V.; ZOLFAGHARI, S.; CHAMANARA, M.; DEHPOUR, A.-R. The role of nitric oxide–cGMP pathway in selegiline antidepressant-like effect in the mice forced swim test. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 5, p. 1015-1022, 2018.

World Health Organization (OMS). Depression and other common mental disorders: global health estimates. 2017.

ORSINI, A.; ZARA, F.; STRIANO, P. Recent advances in epilepsy genetics. **Neuroscience Letters**, v. 667, p. 4-9, 2018.

OTTE, C.; GOLD, S. M.; PENNINX, B. W.; PARIANTE, C. M.; ETKIN, A.; FAVA, M.; MOHR, D. C.; SCHATZBERG, A. F. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16065, 2016.

PALMER, A. M.; ALAVIJEH, M. S. Translational CNS medicines research. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19, p. 1068-1078, 2012.

PANDIT, J.; AQIL, M.; SULTANA, Y. 14 - Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Encapsulations**: Academic Press, 2016. p.597-640.

PATEL, S.; HILL, M. N.; CHEER, J. F.; WOTJAK, C. T.; HOLMES, A. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 56-66, 2017.

PATIL, R. A.; WEATHERLY, C. A.; ARMSTRONG, D. W. Chapter 11 - Chiral Gas Chromatography. In: POLAVARAPU, P. L. (Ed.). **Chiral Analysis (Second Edition)**: Elsevier, 2018. p.468-505.

PAULA-FREIRE, L. I. G.; ANDERSEN, M. L.; GAMA, V. S.; MOLSKA, G. R.; CARLINI, E. L. A. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 356-362, 2014.

PERIČIĆ, D.; LAZIĆ, J.; ŠVOB ŠTRAC, D. Anticonvulsant effects of acute and repeated fluoxetine treatment in unstressed and stressed mice. **Brain Research**, v. 1033, n. 1, p. 90-95, 2005.

PERUCCA, P.; GILLIAM, F. G. Adverse effects of antiepileptic drugs. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 9, p. 792-802, 2012.

PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2018.

PITSIKAS, N. The metabotropic glutamate receptors: Potential drug targets for the treatment of anxiety disorders? **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 181-184, 2014.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. Lights and shadows. **Nitric Oxide**, v. 77, p. 6-11, 2018.

PRESKORN, S.; FAST, G. A. **Tricyclic antidepressant-induced seizures and plasma drug concentration.** 1992. 160-2. *The Journal of Clinical Psychiatry* 53(5):160-2,1992.

QIU, C.; WANG, J.; FAN, H.; BAI, Y.; TIAN, Y.; XU, X.; JIN, Z. High-efficiency production of γ -cyclodextrin using β -cyclodextrin as the donor raw material by cyclodextrin opening reactions using recombinant cyclodextrin glycosyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 75-80, 2018.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ARAÚJO, A. A. S.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; SILVA, G. F.; CARVALHO, F. M. S.; BROGDEN, N. K.; SLUKA, K. A. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Sciences**, v. 149, p. 34-41, 2016.

REDDY, D. S.; VOLKMER, R. Neurocysticercosis as an infectious acquired epilepsy worldwide. **Seizure**, v. 52, p. 176-181, 2017/11/01/ 2017. ISSN 1059-1311. Disponível em: < RÉUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; TUON, T.; TITUS, S. E.; IGNÁCIO, Z. M.; RODRIGUES, A. L. S.; QUEVEDO, J. Chapter Five - Glutamatergic NMDA Receptor as Therapeutic Target for Depression. In: DONEV, R. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**: Academic Press, v.103, 2016. p.169-202.

RIAZA BERMUDO-SORIANO, C.; PEREZ-RODRIGUEZ, M. M.; VAQUERO-LORENZO, C.; BACA-GARCIA, E. New perspectives in glutamate and anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 752-774, 2012.

ROBILLARD, R.; CARPENTER, J. S.; ROGERS, N. L.; FARES, S.; GRIERSON, A. B.; HERMENS, D. F.; NAISMITH, S. L.; MULLIN, S. J.; FEILDS, K.-L.; GLOZIER, N.; SCOTT, E. M.; HICKIE, I. B. Circadian rhythms and psychiatric profiles in young adults with unipolar depressive disorders. **Translational psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 213-213, 2018.

ROHDICH, F.; ZEPECK, F.; ADAM, P.; HECHT, S.; KAISER, J.; LAUPITZ, R.; GRÄWERT, T.; AMSLINGER, S.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1586-1591, 2003.

RUSCIO, A. M.; HALLION, L. S.; LIM, C. C. W.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; AL-HAMZAWI, A.; ALONSO, J.; ANDRADE, L. H.; BORGES, G.; BROMET, E. J.; BUNTING, B.; CALDAS DE ALMEIDA, J. M.; DEMYTTENAERE, K.; FLORESCU, S.; DE GIROLAMO, G.; GUREJE, O.; HARO, J. M.; HE, Y.; HINKOV, H.; HU, C.; DE JONGE, P.; KARAM, E. G.; LEE, S.; LEPINE, J.-P.; LEVINSON, D.; MNEIMNEH, Z.; NAVARRO-MATEU, F.; POSADA-VILLA, J.; SLADE, T.; STEIN, D. J.; TORRES, Y.; UDA, H.; WOJTYNIAK, B.; KESSLER, R. C.; CHATTERJI, S.; SCOTT, K. M. Cross-sectional Comparison of the Epidemiology of DSM-5 Generalized Anxiety Disorder Across the Globe. **JAMA psychiatry**, v. 74, n. 5, p. 465-475, 2017.

SAKE, F.T.N.; WONG, K.; BARTLETT, D. J.; SAINI, B. Benzodiazepine use risk: Understanding patient specific risk perceptions and medication beliefs. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, 2018.

SALAŁ, K.; PODKOWA, A.; KOWALCZYK, P.; KULIG, K.; DZIUBINA, A.; FILIPEK, B.; LIBROWSKI, T. Anticonvulsant active inhibitor of GABA transporter subtype 1, tiagabine, with activity in mouse models of anxiety, pain and depression. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 465-472, 2015.

SALANOVA, V. Chapter 21 - Parietal lobe epilepsy. In: VALLAR, G. e COSLETT, H. B. (Ed.). **Handbook of Clinical Neurology**: Elsevier, v.151, 2018. p.413-425.

SANACORA, G.; MASON, G. F.; ROTHMAN, D. L.; ET AL. Reduced cortical γ -aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, n. 11, p. 1043-1047, 1999.

SANTOS, N. A. G.; MARTINS, N. M.; SISTI, F. M.; FERNANDES, L. S.; FERREIRA, R. S.; DE FREITAS, O.; SANTOS, A. C. The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neuritogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 261, p. 86-95, 2017.

SANTOS, P. S.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; MEDEIROS, J. V. R.; NUNES, S. C. C.; CARVALHO, R. A.; PAIS, A. C. C.; VEIGA, F. J. B.; NUNES, L. C. C.; FIGUEIRAS, A. Methyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex with β -Caryophyllene: Preparation, Characterization, and Improvement of Pharmacological Activities. **ACS omega**, v. 2, n. 12, p. 9080-9094, 2017.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M. B.; FRENCH, J.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; JAIN, S.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; NORDLI, D. R.; PERUCCA, E.; TOMSON, T.; WIEBE, S.; ZHANG, Y.-H.; ZUBERI, S. M. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017.

SCHMITGEN, M. M.; DEPPING, M. S.; BACH, C.; WOLF, N. D.; KUBERA, K. M.; VASIC, N.; HIRJAK, D.; SAMBATARO, F.; WOLF, R. C. Aberrant cortical neurodevelopment in major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 243, p. 340-347, 2019.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 558-567, 2016.

SEBAALY, C.; CHARCOSSET, C.; FOURMENTIN, S.; GREIGE-GERGES, H. Chapter 6 - Potential Applications of Cyclodextrin Inclusion Complexes, Liposomes, and Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposome in Food Industry and Packaging. In: GRUMEZESCU, A. M. e HOLBAN, A. M. (Ed.). **Role of Materials Science in Food Bioengineering**: Academic Press, 2018. p.187-234.

SELESTINO NETA, M. C.; VITTORAZZI, C.; GUIMARÃES, A. C.; MARTINS, J. D. L.; FRONZA, M.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 190-197, 2017.

SENGUPTA, P. K.; BHATTACHARJEE, S.; CHAKRABORTY, S.; BHOWMIK, S. Chapter 15 - Encapsulation of pharmaceutically active dietary polyphenols in cyclodextrin-based nanovehicles: Insights from spectroscopic studies. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications**: William Andrew Publishing, 2018. p.623-645.

SHARMA, C.; M. AL KAABI, J.; M. NURULAIN, S.; N. GOYAL, S.; AMJAD KAMAL, M.; OJHA, S. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 21, p. 3237-3264, 2016.

SHEN, Q.; LAL, R.; LUELLEN, B. A.; EARNHEART, J. C.; ANDREWS, A. M.; LUSCHER, B. γ -Aminobutyric Acid-Type A Receptor Deficits Cause Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity and Antidepressant Drug Sensitivity Reminiscent of Melancholic Forms of Depression. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 6, p. 512-520, 2010.

SIKDER, M. T.; RAHMAN, M. M.; JAKARIYA, M.; HOSOKAWA, T.; KURASAKI, M.; SAITO, T. Remediation of water pollution with native cyclodextrins and modified cyclodextrins: A comparative overview and perspectives. **Chemical Engineering Journal**, v. 355, p. 920-941, 2019.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A.-T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical β -caryophyllene - air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538-545, 2006.

SILVA, J. C.; DE MORAES ALCANTARA, L. F.; DIAS SOARES, J. M.; E SILVA, M. G.; DE LAVOR, É. M.; ANDRADE, V. M.; DOS PASSOS MENEZES, P.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A.; LEITE, L. H. I.; DE MENEZES, I. R. A.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, R. C. M.; QUINTANS, J. S. S.; SILVA ALMEIDA, J. R. G.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with farnesol, an acyclic sesquiterpene alcohol, produces orofacial antinociceptive profile in experimental protocols. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 193-204, 2017.

SIGEL, E.; ERNST, M. The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 7, p. 659-671, 2018.

SINGHAL, N. S.; NUMIS, A. L.; LEE, M. B.; CHANG, E. F.; SULLIVAN, J. E.; AUGUSTE, K. I.; RAO, V. R. Responsive neurostimulation for treatment of pediatric drug-resistant epilepsy. **Epilepsy & behavior case reports**, v. 10, p. 21-24, 2018.

SINGH, N.; SAHU, O. 4 - Sustainable cyclodextrin in textile applications. In: SHAHID UL, I. e BUTOLA, B. S. (Ed.). **The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology**: Woodhead Publishing, 2019. p.83-105.

SITUMORANG, J. H.; LIN, H.-H.; LO, H.; LAI, C.-C. Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) at medulla in tachycardia induced by repeated administration of ethanol in conscious rats. **Journal of biomedical science**, v. 25, n. 1, p. 8-8, 2018.

SOUZA, A. C. A.; ABREU, F. F.; DINIZ, L. R. L.; GRESPAN, R.; DESANTANA, J. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; CORREA, C. B.;

TEIXEIRA, S. A.; MUSCARÁ, M. N.; COSTA, S. K. P.; CAMARGO, E. A. The inclusion complex of carvacrol and β -cyclodextrin reduces acute skeletal muscle inflammation and nociception in rats. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 6, p. 1139-1145, 2018.

STEEL, Z.; MARNANE, C.; IRANPOUR, C.; CHEY, T.; JACKSON, J. W.; PATEL, V.; SILOVE, D. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. **International journal of epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 476-493, 2014.

STEPHENS, D. N.; KING, S. L. Chapter 59 - Neuropharmacology of Benzodiazepines. In: MILLER, P. M. (Ed.). **Biological Research on Addiction**. San Diego: Academic Press, 2013. p.605-614.

TEGEDER, I. Nitric oxide mediated redox regulation of protein homeostasis. **Cellular Signalling**, v. 53, p. 348-356, 2019.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122-1144, 2017.

VARAN, G.; VARAN, C.; ERDOĞAR, N.; HİNCAL, A. A.; BILENSOY, E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 457-469, 2017.

VARDANYAN, R.; HRUBY, V. Chapter 5 - Anxiolytics (Tranquilizers). In: VARDANYAN, R. e HRUBY, V. (Ed.). **Synthesis of Best-Seller Drugs**. Boston: Academic Press, 2016. p.77-86.

VIEIRA, D. S. S.; NAFFAH-MAZACORATTI, M. G.; ZUKERMAN, E.; SENNE SOARES, C. A.; ALONSO, E. O.; FAULHABER, M. H. W.; CAVALHEIRO, E. A.; PERES, M. F. P. Cerebrospinal fluid GABA levels in chronic migraine with and without depression. **Brain Research**, v. 1090, n. 1, p. 197-201, 2006.

VOLKE, V.; WEGENER, G.; VASAR, E. Augmentation of the NO-cGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 54, n. 4, p. 653-660, 2003.

VOLLENWEIDER, F. X.; KOMETER, M. The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 642, 2010.

WALIA, V.; GARG, C.; GARG, M. NO-sGC-cGMP signaling influence the anxiolytic like effect of lithium in mice in light and dark box and elevated plus maze. **Brain Research**, v. 1704, p. 114-126, 2019.

WANG, H.; XIE, X.; ZHANG, F.; ZHOU, Q.; TAO, Q.; ZOU, Y.; CHEN, C.; ZHOU, C.; YU, S. Evaluation of cholesterol depletion as a marker of nephrotoxicity in vitro for novel β -cyclodextrin derivatives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1387-1393, 2011.

- WATERS, L.; MANCHESTER, K. R.; MASKELL, P. D.; HAEGEMAN, C.; HAIDER, S. The use of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) model to predict GABA-A receptor binding of newly emerging benzodiazepines. **Science & Justice**, v. 58, n. 3, p. 219-225, 2018.
- WILLIAMS, L. M. Precision psychiatry: a neural circuit taxonomy for depression and anxiety. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 472-480, 2016.
- WORKMAN, J. L.; TRAINOR, B. C.; FINY, M. S.; NELSON, R. J. Inhibition of neuronal nitric oxide reduces anxiety-like responses to pair housing. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 1, p. 109-115, 2008.
- YANG, C. H.; HUANG, Y. C.; TSAI, M. L.; CHENG, C. Y.; LIU, L. L.; YEN, Y. W.; CHEN, W. L. Inhibition of melanogenesis by β -caryophyllene from lime mint essential oil in mouse B16 melanoma cells. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 5, p. 550-554, 2015.
- YANG, X.-Z.; ZHANG, C.-Y.; WANG, Q.-J.; GUO, Y.-Z.; DONG, C.; YAN, E.-K.; LIU, W.-J.; ZHENG, X.-W.; YIN, D.-C. Utilization of Cyclodextrins and Its Derivative Particles as Nucleants for Protein Crystallization. **Crystal Growth & Design**, v. 17, n. 12, p. 6189-6200, 2017.
- YILDIZ, Z. I.; CELEBIOGLU, A.; KILIC, M. E.; DURGUN, E.; UYAR, T. Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol. **Journal of Food Engineering**, v. 224, p. 27-36, 2018.
- YILDIZ, F.; ULAK, G.; ERDEN, B. F.; GACAR, N. Anxiolytic-Like Effects of 7-Nitroindazole in the Rat Plus-Maze Test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 2, p. 199-202, 2000.
- ZHANG, F.; SHAO, J.; TIAN, J.; ZHONG, Y.; YE, L.; MENG, X.; LIU, Q.; WANG, H. Antidepressant-like Effects of LPM580153, A Novel Potent Triple Reuptake Inhibitor. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24233, 2016.
- ZHAO, X.; LIU, Q.; CAO, S.; PANG, J.; ZHANG, H.; FENG, T.; DENG, Y.; YAO, J.; LI, H. A meta-analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) use during prenatal depression and risk of low birth weight and small for gestational age. **Journal of Affective Disorders**, v. 241, p. 563-570, 2018.
- ZHOU, Q.-G.; ZHU, X.-H.; NEMES, A. D.; ZHU, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders. **IBRO Reports**, v. 5, p. 116-132, 2018.
- ŻMUDZKA, E.; SAŁACIAK, K.; SAPA, J.; PYTKA, K. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life Sciences**, v. 210, p. 106-124, 2018.

Toxicologia não clínica do β -cariofileno, um canabinoide dietético: Ausência de efeitos adversos em camundongos *Swiss* fêmeas

Artigo publicado: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*
Qualis B1

1

Toxicologia não clínica do β -cariofileno, um canabinoide dietético: Ausência de efeitos adversos em camundongos *Swiss* fêmeas

Resumo

O β -cariofileno é um aditivo alimentar que está presente em plantas alimentares e que apresenta um amplo potencial farmacológico. No entanto, informações toxicológicas ainda são necessárias e seu uso é baseado no fato de que esse sesquiterpeno bicíclico é diariamente consumido como alimento vegetal em quantidades muito maiores do que como um aditivo alimentar. Assim, o presente estudo avaliou a toxicidade de dose única (aguda/14 dias) e de doses repetidas (28 dias) do β -cariofileno administrado por via oral em camundongos *Swiss* fêmeas analisando alterações no peso corporal, consumo de alimento, ingestão de água, parâmetros hematológicos e bioquímicos, peso de órgãos após necropsia, biomarcadores de estresse oxidativo e histopatologia de vários tecidos. O estudo de toxicidade aguda (300 e 2000 mg/kg) e em doses repetidas (300 e 2000 mg/kg) foram realizados de acordo com a diretriz 423 e 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), respectivamente. Ausência de sintomas clínicos adversos e mortalidade em qualquer animal submetido ao estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas foram verificados. Além disso, não foram observadas alterações significativas no peso corporal, consumo de alimento e água, biomarcadores de estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase, peroxidação lipídica, nitrito e glutathiona reduzida), parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito) e bioquímicos (glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol e triglicerídeos) quando comparado com o grupo controle do estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas. Portanto, os resultados do presente estudo fornecem uma compreensão do perfil de toxicidade do β -cariofileno que pode ser considerado um composto com toxicidade superior a 2000 mg/kg de peso corporal.

Palavras-chave: β -cariofileno, sesquiterpeno bicíclico, toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas.

1. INTRODUÇÃO

O β -cariofileno (β -humuleno) é um sesquiterpeno bicíclico com importante papel na química dos sesquiterpenóides e que está entre os principais sesquiterpenos encontrados em alimentos vegetais como orégano (*Origanum vulgare* Linn.), canela (*Cinnamomum spp.*), pimenta (*Piper nigrum* Linn.) e cravo (*Eugenia caryophyllata* Thumb) (GERTSCH et al., 2008; BUCHBAUER; ILIC, 2013). O β -cariofileno compreende um dos principais princípios ativos dos óleos essenciais da *Cannabis sativa* Linn, *Ocimum gratissimum* Linn, *Lantana camara* Linn, *Cordia verbenaceae* DC (sinônimo *Varronia curassavica* Jacq), *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil, *Croton campestris* A. St. Hil, *Vernonia cinerea* Less, *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort, *Murraya paniculata* Linn. e de várias espécies da *Copaifera* (DIAS et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; SELESTINO et al., 2017).

Além disso, o β -cariofileno está na lista dos aditivos alimentares e agentes aromatizantes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA, nº. 21CFR172.515) e estudos em modelos animais demonstraram atividades farmacológicas que incluem o tratamento do alcoolismo (AL MANSOURI et al., 2014), anti-hiperglicêmico (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016), efeito hipolipidêmico (BALDISSERA et al., 2016), previne a doença hepática gordurosa não alcoólica (KAMIKUBO et al., 2016), neuroprotetor (ASSIS et al., 2014; SANTOS et al., 2017), antidepressivo, ansiolítico (BAHI et al., 2014), anticonvulsivante (LIU et al., 2015), anticâncer (JUNG et al., 2015; FIDYT et al., 2016), analgésico (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016), antinociceptivo (PAULA-FREIRE et al., 2014), efeito anti-melanogênico (YANG et al., 2015), anti-inflamatório (CHO et al., 2015) e atua como agonista seletivo do receptor canabinoide do tipo 2 (CB₂) (SHARMA et al., 2016). Devido as suas características aromáticas, o β -cariofileno pode ser utilizado em cosméticos (SKÖLD et al., 2006).

Além do potencial farmacológico descrito, o β -cariofileno continua sendo alvo de novas pesquisas farmacológicas em que poucas informações toxicológicas têm sido relatadas e, portanto, seu uso é baseado principalmente no fato de que esse sesquiterpeno bicíclico é diariamente consumido como alimento vegetal em quantidades muito maiores do que como um aditivo alimentar. A realização de experimentos contínuos que visam avaliar possíveis efeitos adversos é de suma importância e, nesse contexto, Schmitt et al. (2016) relatou recentemente um estudo que demonstra ausência de toxicidade subcrônica (90 dias) do β -cariofileno em ratos *Wistar*.

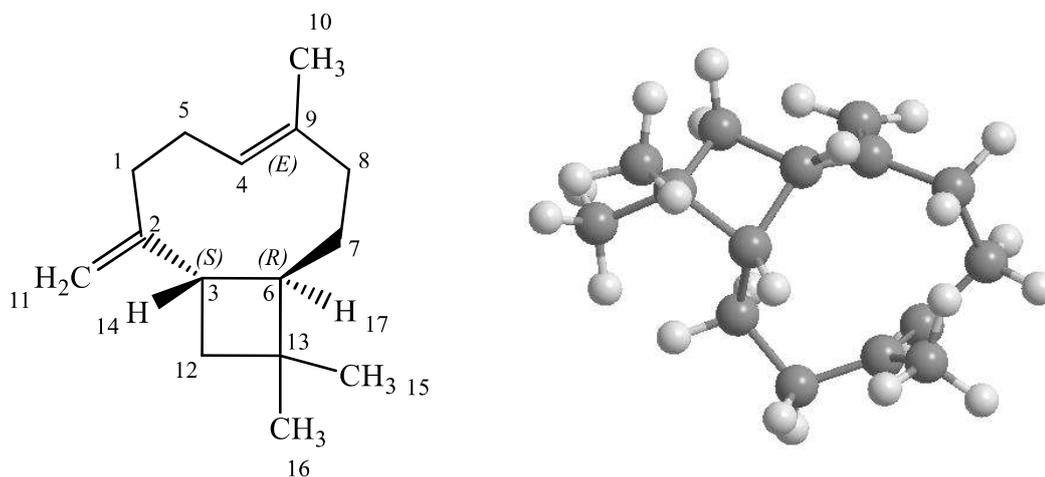
Com o objetivo de ampliar o conhecimento e aprimorar o perfil toxicológico do β -cariofileno, o presente estudo avaliou a toxicidade aguda e em doses repetidas em camundongos *Swiss* analisando parâmetros relacionados às alterações do peso corporal, consumo de alimento, ingestão de água, parâmetros hematológicos e bioquímicos, peso de órgãos após necropsia, biomarcadores de estresse oxidativo e histopatologia de vários tecidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

β -cariofileno e compostos químicos

O β -cariofileno [Formula molecular: $C_{15}H_{24}$, peso molecular: 204,36 g/mol, CAS: 87-44-5; pureza $\geq 98,5\%$ (**Figura 1**)], Tween 80, pirogalol, sulfanilamida, ácido fosfórico, dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina, nitrato de sódio, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico), ácido tiobarbitúrico e peróxido de hidrogenio foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções dos compostos químicos utilizados no presente estudo foram preparadas e usados no dia dos experimentos.

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno [(1R,4E,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno].



Fonte: Autoria própria.

Animais e condições experimentais

Os camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 gramas) utilizados foram obtidos a partir do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos em temperatura controlada (24 ± 1 °C) em ciclo de 12 horas

claro/escuro (ligado as 9:00 e desligado 21:00 horas) e com livre acesso à água filtrada disponível em garrafas graduadas e comida (*pellets* de ração Purina). Todos os animais utilizados foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) com o máximo de cinco animais por gaiola e inicialmente aclimatados no Laboratório de pesquisa em produtos naturais e neuroquímica experimental (LAPNNEX) por dez dias antes da realização dos experimentos.

O máximo de esforços foi feito para minimizar tanto o sofrimento quanto o número de animais utilizados, sendo que cada experimento realizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI#012/15) e realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (BRASIL, 2016).

Estudo da toxicidade aguda (14 dias)

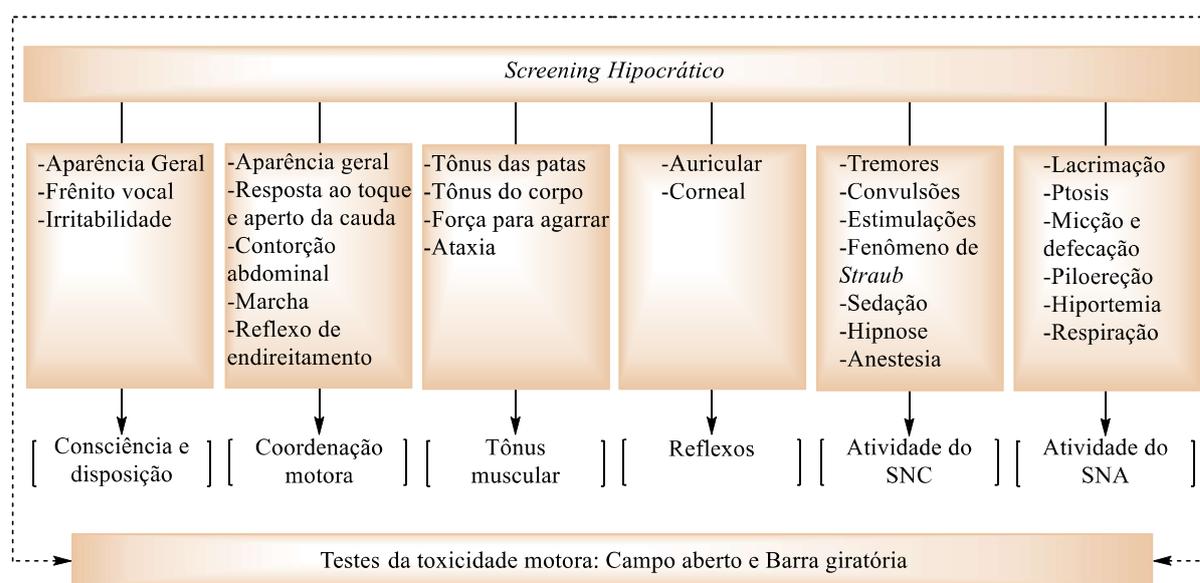
O estudo da toxicidade aguda foi realizado de acordo com a diretriz 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (OECD, 2001). O β -cariofileno foi emulsificado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via oral apenas uma única vez nas doses de 300 (n=6) e 2000 mg/kg (n=6) para avaliação detalhada dos sinais clínicos de toxicidade (Exemplos: aparência geral, ataxia, frêmito vocal, irritabilidade, tônus do corpo, tremores, salivação, lacrimejamento, ptose palpebral, convulsões e movimentos anormais) e mortalidade dos animais (SILVA et al., 2016). O grupo controle (n=6) recebeu apenas veículo com o mesmo volume (10 mL/kg) e pela mesma via que os outros grupos experimentais. Todos os grupos de animais foram rigorosamente monitorados diariamente para um total de 14 dias.

Estudo da toxicidade em doses repetidas (28 dias)

O estudo de toxicidade em doses repetidas foi realizado de acordo com a diretriz 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (OECD, 2008). O β -cariofileno foi emulsificado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado diariamente uma vez ao dia durante 28 dias por via oral nas doses de 300 (n=7) e 2000 (n=7) mg/kg para avaliação dos sinais clínicos de toxicidade descrito na toxicidade aguda e mortalidade dos animais. As doses de 300 e 2000 mg/kg foram estabelecidas a partir da diretriz 407 da OECD. O grupo controle recebeu apenas veículo com o mesmo volume (10

mL/kg) e pela mesma via que os outros grupos experimentais. Todos os grupos de animais foram rigorosamente monitorados continuamente por 1 hora após as dosagens e periodicamente durante as primeiras 24 horas para um total de 28 dias (**Figura 2**).

Figura 2: Protocolo experimental para avaliação da toxicidade aguda em camundongos e em doses repetidas.



Fonte: Autoria própria.

Testes da toxicidade motora

Atividade locomotora e coordenação motora

Na avaliação da atividade exploratória espontânea, os animais submetidos ao tratamento por via oral com β -cariofileno (300 e 2000 mg/kg) foram colocados um por vez no campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 × 30 × 15 cm) e dividido em nove quadrados de áreas iguais. Os parâmetros observados durante 5 minutos foram o número de quadrados cruzados com as quatro patas, número de comportamento de autolimpeza (groomings) e o número de levantamentos (rearings) (MACHADO et al., 2015). A coordenação motora e relaxamento muscular dos animais foram avaliados pelo número de quedas e o tempo de permanência durante 180 segundos em uma barra giratória de 25 mm de diâmetro com rotação de 17 rpm (SILVA et al., 2016).

Dados fisiológicos

O peso corporal, consumo ração, ingestão de água, formação de urina e fezes de cada animal foram registrados diariamente do início ao décimo quarto dia durante o período de

tratamento com β -cariofileno para a toxicidade aguda. No estudo de doses repetidas, os dados fisiológicos foram registrados diariamente do início do tratamento ao vigésimo oitavo dia.

Urinálise

Amostras de urina de 4 horas de animais tratados com β -cariofileno no estudo de toxicidade aguda foram colhidas para análise semi-qualitativa de bilirrubina, urobilinogênio, cetonas, glicose, proteína, sangue, nitrito, leucócitos, pH e densidade utilizando tiras de urina (Uriquest Plus/Labtest). No estudo de toxicidade em doses repetidas, amostras de urina da última semana foram colhidas e analisadas usando o mesmo princípio das reações químicas da tira reagente Uriquest. Análise da cor de urina foi realizada com amostras de urina fresca. O volume da urina foi colhido diariamente.

Necropsia, análise macroscópica e peso dos órgãos

Após o período final de tratamento com β -cariofileno no estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas, os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g [8,75mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (10 mg/mL)] conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education* descrito por Flecknell (1996) e Kohn (1997). Sucedida a eutanásia, foi feita avaliação macroscópica da superfície externa do corpo, cavidades (torácica, abdominal e craniana) e dos órgãos (alterações de posição, forma, tamanho, cor e consistência). Após a necropsia, o peso absoluto e relativo do cérebro, pulmões, fígado, coração, baço e rins foram determinados. O peso relativo foi calculado utilizando a fórmula: $\text{Peso relativo do órgão (\%)} = (\text{peso do órgão/peso do camundongo}) \times 100$.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do ventrículo direito dos animais anestesiados e acondicionados em tubos com anticoagulante para determinação dos parâmetros hematológicos e em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro e determinação dos parâmetros bioquímicos. Os parâmetros de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos [volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)] foram determinados por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematologia (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em

cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (SANTANA et al., 2013). Os parâmetros bioquímicos foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST® para a determinação da glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol e triglicerídeos.

Avaliação histopatológica

Órgãos como o cérebro, rim, fígado, pulmão e coração foram preservados em formol 10 % para avaliação histopatológica. As secções foram preparadas a partir dos tecidos embebidos em parafina e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram observadas utilizando microscópio óptico.

Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim

Uma parte do fígado e rim dos animais submetidos ao estudo de toxicidade em doses repetidas foram colhidos após eutanásia e homogeneizado (10%, p/v) em solução gelada de tampão fosfato de sódio 50 Mm (pH 7,4). Os homogenatos de cada órgão foram centrifugados em 8000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes separados para determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo.

Atividade da Catalase e Superóxido dismutase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de decomposição do H₂O₂ utilizando espectrofotometria (240 nm) e os resultados foram expressos em unidades de atividade da catalase por miligrama de proteína (U/mg proteína) (AEBI, 1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol e os resultados determinados por espectrofotometria (420 nm) foram expressos em unidades de atividade da SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína) (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os níveis de proteína foram determinados pelo método de Lowry et al. (1951).

Níveis de peroxidação lipídica, nitrito e glutathiona reduzida

A peroxidação lipídica foi avaliada indiretamente pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme o procedimento experimental descrito por Freitas et al. (2009) e os resultados determinado utilizando espectrofotometria (532 nm) foram expressos em nmol de TBARS por grama de tecido (nmol/g de tecido). Os níveis de nitrito

foram determinados usando reagente de Griess (1% de sulfanilamida em ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina) conforme o procedimento experimental descrito por Almeida et al. (2012) e os resultados determinado por espectrofotometria (540 nm) foram expressos em μM a partir de uma curva padrão de nitrito usando nitrato de sódio (NaNO_2). A glutathiona reduzida (GSH) foi avaliada usando DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) conforme o procedimento experimental descrito por Freitas et al. (2009) e os resultados obtidos por espectrofotometria (412 nm) foram expressos em nmol de GSH por grama de tecido (nmol/g de tecido).

Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média). Os resultados do peso corporal foram analisados utilizando *two-way* ANOVA seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post hoc*. A estatística dos outros resultados foi realizada utilizando *one way* ANOVA seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post hoc*. Diferenças significativas entre os grupos avaliados foram considerados quando $p < 0,05$ (*GraphPad Prism* 6.01).

RESULTADOS

Observações clínicas e toxicidade motora

Ausência de sintomas clínicos adversos e mortalidade foram verificadas em todos os animais submetidos ao estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas (Tabela 1). Além disso, os resultados descritos na Tabela 2 demonstrou que o β -cariofileno não comprometeu a atividade locomotora e coordenação motora quando comparado com o grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 1: Efeitos do β -cariofileno em animais durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

Toxicidade	Doses (mg/kg)	M/T	Mortalidade (%)	Latência para Mortalidade (min)	Sintomas de Toxicidade
14 dias					
	CN	0/6	0	–	Nenhum
	300	0/6	0	–	Nenhum
	2000	0/6	0	–	Nenhum
28 dias					
	CN	0/7	0	–	Nenhum
	300	0/7	0	–	Nenhum
	2000	0/7	0	–	Nenhum

Legenda: (CN) Controle, (M) Animais Mortos, (T) Animais totais.

Tabela 2: Efeitos do β -cariofileno (β -CFN) na toxicidade motora em animais submetidos ao estudo de (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

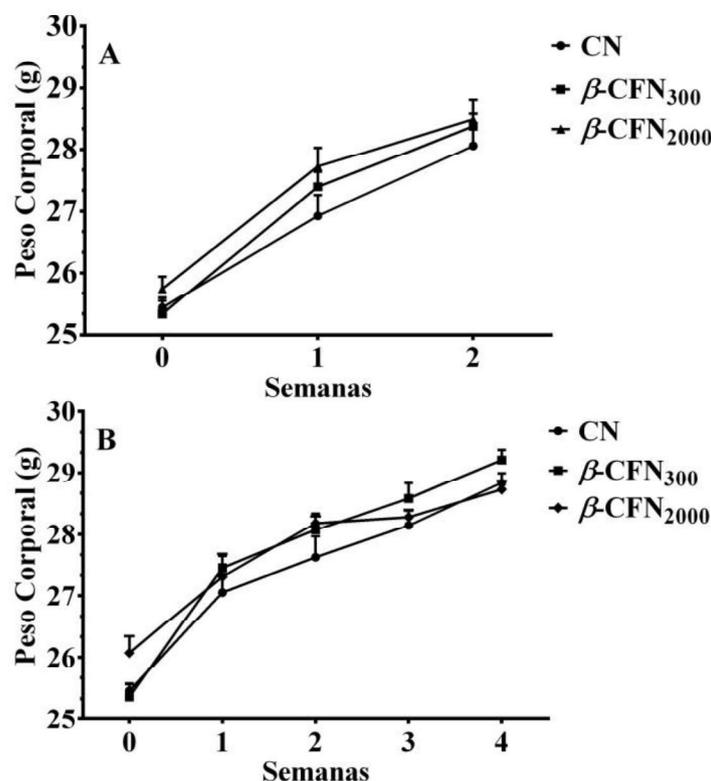
Doses (mg/kg)	Toxicidade motora						
	Atividade locomotora			Coordenação motora			
	Groomings	Rearings	Cruzamentos	Bolo fecal	Tempo de Permanência (s)	N° de quedas	
Toxicidade aguda							
CN	4,83 ± 0,70	14,50 ± 1,97	57,17 ± 2,94	3,83 ± 0,60	175,60 ± 4,40	0,16 ± 0,16	
β -CFN ₃₀₀	5,16 ± 0,54	17,83 ± 3,58	64,33 ± 2,15	4,16 ± 0,52	175,40 ± 4,60	0,16 ± 0,16	
β -CFN ₂₀₀₀	6,83 ± 0,47	15,00 ± 2,73	62,50 ± 1,97	3,16 ± 0,40	170,80 ± 5,82	0,33 ± 0,21	
Toxicidade em doses repetidas							
1ª Semana							
CN	7,66 ± 1,25	14,17 ± 1,38	54,17 ± 3,50	3,33 ± 0,82	178,10 ± 1,92	0,07 ± 0,07	
β -CFN ₃₀₀	6,16 ± 0,94	19,00 ± 3,75	61,33 ± 4,50	3,16 ± 0,74	174,80 ± 2,73	0,14 ± 0,09	
β -CFN ₂₀₀₀	8,50 ± 1,23	17,01 ± 3,22	60,83 ± 3,89	2,16 ± 0,47	173,90 ± 3,26	0,21 ± 0,11	
2ª Semana							
CN	4,33 ± 0,49	11,83 ± 1,27	54,50 ± 4,56	3,50 ± 0,42	176,30 ± 2,54	0,14 ± 0,09	
β -CFN ₃₀₀	7,83 ± 1,35	16,67 ± 4,15	62,33 ± 4,15	3,66 ± 0,33	175,90 ± 2,79	0,14 ± 0,09	
β -CFN ₂₀₀₀	6,67 ± 0,95	17,20 ± 2,30	58,83 ± 5,18	4,00 ± 0,81	175,80 ± 2,82	0,21 ± 0,15	
3ª Semana							
CN	6,16 ± 0,80	15,00 ± 2,93	58,50 ± 2,23	5,16 ± 0,70	176,40 ± 2,44	0,21 ± 0,11	
β -CFN ₃₀₀	8,33 ± 0,88	22,17 ± 3,45	60,33 ± 4,68	2,83 ± 0,40	177,50 ± 2,48	0,14 ± 0,14	
β -CFN ₂₀₀₀	7,50 ± 0,99	11,50 ± 1,12	55,17 ± 4,04	3,50 ± 0,42	175,70 ± 2,92	0,14 ± 0,09	
4ª Semana							
CN	8,33 ± 0,66	17,10 ± 0,89	57,00 ± 5,26	4,00 ± 0,68	175,60 ± 3,01	0,21 ± 0,15	
β -CFN ₃₀₀	7,50 ± 0,84	21,17 ± 2,84	66,33 ± 3,21	3,66 ± 0,49	174,10 ± 3,12	0,21 ± 0,11	
β -CFN ₂₀₀₀	6,66 ± 0,83	18,83 ± 1,77	58,52 ± 4,24	4,83 ± 0,30	173,50 ± 3,47	0,35 ± 0,20	

Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média ± E.P.M.

Peso corporal

Alterações no peso corporal absoluto dos grupos de animais tratados por via oral com β -cariofileno e o grupo controle estão apresentados na **Figura 3**. Na dose de 300 e 2000 mg/kg do β -cariofileno, os animais não apresentaram variações significativas no peso quando comparado com o grupo controle até o 14^a dia da toxicidade aguda (**Figura 3A**) e até o 28^a dia da toxicidade em doses repetidas ($p>0,05$) (**Figura 3B**).

Figura 3: Resultados do peso corporal de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) no estudo de toxicidade aguda (**Figura 3A**) e em doses repetidas (**Figura 3B**).



Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média \pm E.P.M.

Consumo de ração, água e formação de urina e fezes

De acordo com os resultados descritos na **Tabela 3** para a toxicidade aguda e em doses repetidas, os animais tratados por via oral com β -cariofileno nas doses de 300 e 2000 mg/kg não apresentaram alterações significativas no consumo de ração, água, formação de fezes e urina quando comparado com os grupos controles ($p>0,05$).

Tabela 3: Resultados do consumo de ração, água, formação de urina e fezes de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

Dados Fisiológicos	Toxicidade aguda				Toxicidade Doses repetidas			
	1ª semana	2ª semana	1ª semana	2ª semana	3ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
Ração (g/animal/dia)								
CN	8,41 \pm 0,48	8,45 \pm 0,37	8,29 \pm 0,95	8,04 \pm 0,95	8,80 \pm 1,15	8,80 \pm 1,15	8,80 \pm 1,15	8,73 \pm 0,42
β -CFN ₃₀₀	8,01 \pm 0,46	8,56 \pm 0,48	8,06 \pm 0,87	9,31 \pm 1,32	8,90 \pm 0,19	8,90 \pm 0,19	8,90 \pm 0,19	9,17 \pm 1,08
β -CFN ₂₀₀₀	7,91 \pm 0,65	8,50 \pm 0,79	7,66 \pm 0,65	8,73 \pm 1,24	9,09 \pm 1,21	9,09 \pm 1,21	9,09 \pm 1,21	8,06 \pm 0,83
Água (mL/animal/dia)								
CN	9,55 \pm 0,48	9,67 \pm 0,69	9,44 \pm 0,29	10,56 \pm 0,11	8,89 \pm 0,96	8,89 \pm 0,96	8,89 \pm 0,96	9,00 \pm 1,26
β -CFN ₃₀₀	8,94 \pm 0,22	9,80 \pm 0,45	9,67 \pm 0,70	8,55 \pm 0,94	8,38 \pm 0,67	8,38 \pm 0,67	8,38 \pm 0,67	9,89 \pm 0,40
β -CFN ₂₀₀₀	9,22 \pm 0,78	9,54 \pm 0,86	10,56 \pm 0,82	9,60 \pm 0,46	8,74 \pm 0,38	8,74 \pm 0,38	8,74 \pm 0,38	9,04 \pm 0,81
Fezes (g/animal/dia)								
CN	2,18 \pm 0,19	2,34 \pm 0,16	2,16 \pm 0,23	1,78 \pm 0,18	1,96 \pm 0,20	1,96 \pm 0,20	1,96 \pm 0,20	1,59 \pm 0,09
β -CFN ₃₀₀	2,01 \pm 0,15	2,29 \pm 0,08	1,97 \pm 0,32	1,96 \pm 0,39	1,76 \pm 0,09	1,76 \pm 0,09	1,76 \pm 0,09	1,80 \pm 0,38
β -CFN ₂₀₀₀	2,05 \pm 0,29	2,22 \pm 0,23	1,91 \pm 0,18	1,83 \pm 0,34	1,82 \pm 0,20	1,82 \pm 0,20	1,82 \pm 0,20	1,66 \pm 0,19
Urina (mL/animal/dia)								
CN	1,02 \pm 0,08	1,11 \pm 0,07	1,16 \pm 0,10	1,14 \pm 0,11	1,31 \pm 0,07	1,31 \pm 0,07	1,31 \pm 0,07	1,36 \pm 0,06
β -CFN ₃₀₀	1,06 \pm 0,10	1,21 \pm 0,04	1,14 \pm 0,12	1,31 \pm 0,19	1,36 \pm 0,04	1,36 \pm 0,04	1,36 \pm 0,04	1,32 \pm 0,13
β -CFN ₂₀₀₀	1,04 \pm 0,02	1,09 \pm 0,08	1,17 \pm 0,12	1,27 \pm 0,08	1,29 \pm 0,08	1,29 \pm 0,08	1,29 \pm 0,08	1,40 \pm 0,18

Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média \pm E.P.M.

Peso absoluto e relativo dos órgãos

O peso médio absoluto e relativo dos órgãos de animais tratados com β -cariofileno e do grupo controle estão demonstrados na **Tabela 4**. Em ambos os estudos de toxicidade, nenhuma alteração significativa foi observada em qualquer órgão dos animais tratados com β -cariofileno quando comparado com os grupos controles ($p>0,05$). Além disso, uma análise macroscópica dos órgãos internos (baço, fígado, rins, coração, cérebro e pulmões) não mostrou hemorragias, hematomas, edemas, necrose, alterações de posição, forma, tamanho, cor e consistência quando comparado com os grupos controles, sugerindo que o β -cariofileno não induz desordem morfológica nos estudos de toxicidade aguda e em doses repetidas.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Conforme os resultados descritos na **Tabela 5**, os grupos de animais que foram tratados com β -cariofileno nas doses de 300 e 2000 mg/kg não apresentaram alterações significativas nos valores dos parâmetros hematológicos quando comparado com os grupos controles ($p>0,05$). Semelhança na obtenção dos resultados foi demonstrada para os parâmetros bioquímicos, uma vez que não foi observado diferenças significativas relacionados à atividade hepática (ALT e AST), atividade renal (ureia e creatinina) e biomarcadores metabólicos (glicose, triglicerídeos e colesterol) nos grupos de animais tratados com β -cariofileno quando comparado com os grupos controles ($p>0,05$) (**Tabela 5**).

Urinálise

Na avaliação da urina dos animais submetidos aos estudos de toxicidade aguda e em doses repetidas, não foram detectadas alterações relacionadas com a administração das doses do β -cariofileno (β -CFN) indicativo de toxicidade quando comparado com os animais dos grupos controle (**Tabela 6**, $p>0,05$).

Histopatologia

Os resultados histopatológicos de órgãos dos animais tratados com β -cariofileno (300 e 2000 mg/kg) após o estudo de toxicidade em doses repetidas estão apresentados na **Tabela 7**. Alterações patológicas não foram detectadas no fígado, rim, coração e pulmão quando comparado com os grupos controles.

Tabela 4: Resultados do peso absoluto e relativo dos órgãos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

Órgãos	Toxicidade aguda			Toxicidade em doses repetidas		
	CN	β -CFN ₃₀₀	β -CFN ₂₀₀₀	CN	β -CFN ₃₀₀	β -CFN ₂₀₀₀
Peso absoluto (g)						
Baço	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,06
Fígado	1,35 ± 0,06	1,43 ± 0,05	1,38 ± 0,04	1,29 ± 0,05	1,32 ± 0,03	1,40 ± 0,09
Rins	0,33 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,40 ± 0,06
Coração	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Cérebro	0,42 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,48 ± 0,03
Pulmões	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,03
Peso relativo (%)						
Peso corporal (g)						
Baço	28,06 ± 0,31	28,37 ± 0,19	28,48 ± 0,32	28,83 ± 0,16	29,21 ± 0,17	28,73 ± 0,14
Fígado	0,48 ± 0,04	0,51 ± 0,08	0,54 ± 0,04	0,43 ± 0,11	0,62 ± 0,05	0,62 ± 0,23
Rins	4,80 ± 0,21	5,05 ± 0,20	4,86 ± 0,14	4,48 ± 0,18	4,52 ± 0,12	4,89 ± 0,33
Coração	1,17 ± 0,05	1,35 ± 0,07	1,32 ± 0,07	1,29 ± 0,11	1,20 ± 0,10	1,41 ± 0,22
Cérebro	0,46 ± 0,04	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,55 ± 0,11	0,50 ± 0,04	0,44 ± 0,04
Pulmões	1,53 ± 0,03	1,46 ± 0,05	1,37 ± 0,07	1,57 ± 0,12	1,54 ± 0,07	1,69 ± 0,12
	0,69 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,05	0,71 ± 0,09	0,63 ± 0,04	0,74 ± 0,12

Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média ± E.P.M.

Tabela 5: Resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

Parâmetros	Toxicidade aguda			Toxicidade em doses repetidas		
	CN	β -CFN ₃₀₀	β -CFN ₂₀₀₀	CN	β -CFN ₃₀₀	β -CFN ₂₀₀₀
Hematológicos						
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,19 \pm 0,26	8,76 \pm 0,16	9,08 \pm 0,16	7,62 \pm 0,28	7,95 \pm 0,19	8,25 \pm 0,04
Hemoglobina (g/dL)	15,23 \pm 0,62	13,08 \pm 0,33	13,86 \pm 0,31	11,13 \pm 0,62	11,88 \pm 0,34	12,08 \pm 0,53
Hematócrito (%)	45,85 \pm 0,71	42,02 \pm 0,54	43,60 \pm 0,67	40,63 \pm 1,63	42,40 \pm 0,72	42,87 \pm 0,64
VCM (fL)	54,68 \pm 1,99	48,17 \pm 1,22	47,20 \pm 0,58	51,33 \pm 0,49	52,67 \pm 0,66	52,50 \pm 0,76
CHCM (g/dL ³)	31,18 \pm 0,69	32,07 \pm 0,82	31,50 \pm 0,23	27,98 \pm 0,36	29,03 \pm 0,87	27,88 \pm 0,58
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	733,30 \pm 75,50	740,0 \pm 44,82	722,0 \pm 27,36	651,50 \pm 31,81	690,0 \pm 28,50	657,3 \pm 53,11
Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8,49 \pm 0,70	6,41 \pm 1,13	7,20 \pm 0,16	3,30 \pm 0,45	3,59 \pm 0,62	2,34 \pm 0,24
Linfócitos (%)	80,50 \pm 1,11	74,17 \pm 2,18	73,60 \pm 2,31	70,17 \pm 0,49	76,83 \pm 1,90	81,67 \pm 1,43
Monócitos (%)	5,16 \pm 0,94	8,33 \pm 0,94	6,80 \pm 0,58	4,50 \pm 0,84	5,33 \pm 0,66	3,00 \pm 0,57
Neutrófilos (%)	11,67 \pm 1,35	12,50 \pm 1,47	14,60 \pm 1,40	21,67 \pm 2,97	17,17 \pm 1,22	18,33 \pm 2,24
Eosinófilos (%)	2,16 \pm 0,40	3,66 \pm 0,49	3,20 \pm 0,58	4,16 \pm 1,22	3,50 \pm 0,42	2,42 \pm 0,28
Bioquímicos						
Glicose (mg/dL)	132,20 \pm 10,86	135,50 \pm 8,72	121,30 \pm 12,56	119,10 \pm 3,57	116,40 \pm 3,37	125,8 \pm 4,59
Ureia (mg/dL)	26,87 \pm 3,21	30,50 \pm 0,95	28,50 \pm 2,26	32,52 \pm 2,29	29,80 \pm 2,46	24,58 \pm 3,41
Creatinina (mg/dL)	0,30 \pm 0,06	0,15 \pm 0,08	0,18 \pm 0,05	0,18 \pm 0,04	0,16 \pm 0,03	0,14 \pm 0,01
Ácido úrico (mg/dL)	2,85 \pm 0,36	2,31 \pm 0,11	2,17 \pm 0,20	2,51 \pm 0,21	2,27 \pm 0,21	2,08 \pm 0,34
ALT (U/mL)	45,17 \pm 3,59	44,17 \pm 1,88	44,83 \pm 2,72	52,30 \pm 4,25	45,63 \pm 2,12	48,46 \pm 3,88
AST (U/mL)	120,30 \pm 8,44	134,20 \pm 11,01	125,30 \pm 5,13	124,2 \pm 10,51	137,0 \pm 9,28	142,4 \pm 10,30
Colesterol (mg/dL)	65,33 \pm 6,39	54,83 \pm 3,91	59,40 \pm 7,22	55,83 \pm 3,07	45,50 \pm 2,37	52,20 \pm 7,12
Triglicérides (mg/dL)	88,33 \pm 2,87	92,25 \pm 3,01	94,20 \pm 5,10	106,2 \pm 3,61	94,01 \pm 3,46	100,30 \pm 5,02

Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). (VCM) volume corpuscular médio, (CHCM) concentração de hemoglobina corpuscular média, (AST) aspartato aminotransferase, (ALT) alanina aminotransferase. Os valores representam a média \pm E.P.M.

Tabela 6A: Resultados da urinalise dos grupos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

Doses (mg/kg)	N° de animais	Urinalise					
		Bilirrubina (-)	Urobilinogênio (N)	Cetonas (-)	Glicose (N)	Proteínas (T)	Sangue (-)
Toxicidade aguda							
CN	6	6	6	6	6	2	3 1 6
β -CFN ₃₀₀	6	6	6	6	6	2	3 1 6
β -CFN ₂₀₀₀	6	6	6	6	6	1	3 2 6
Toxicidade em doses repetidas							
CN	7	7	7	7	7	1	3 3 7
β -CFN ₃₀₀	7	7	7	7	7	2	2 3 7
β -CFN ₂₀₀₀	7	7	7	7	7	1	2 4 7

Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média \pm E.P.M.

Bilirrubina: (-) Negativo

Cetonas: (-) Negativo

Glicose: (N) Normal = < 50 mg/dL

Proteínas: (T) Traços = < 30 mg/dL, 30 = 30 mg/dL, 100 = 30 mg/dL.

Sangue: (-) Negativo

Tabela 6B: Resultados da urinalise dos grupos de animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

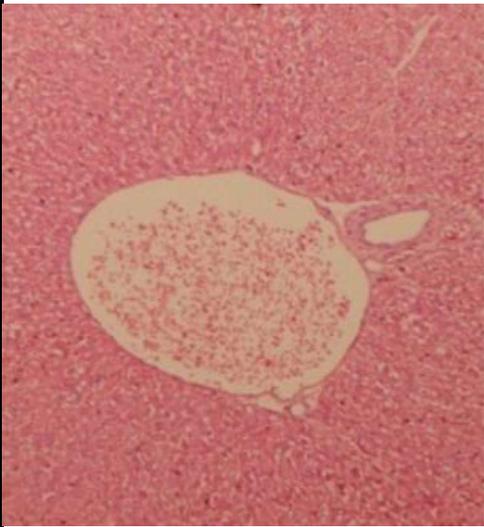
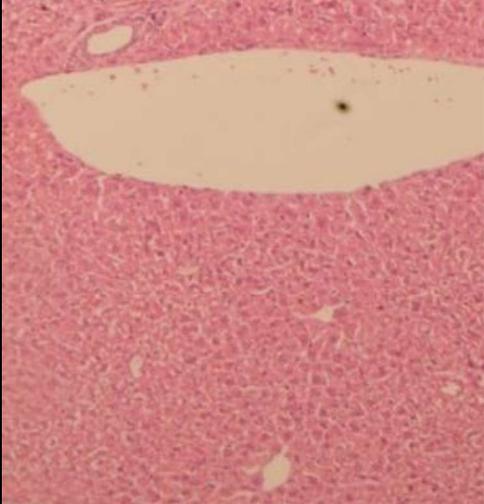
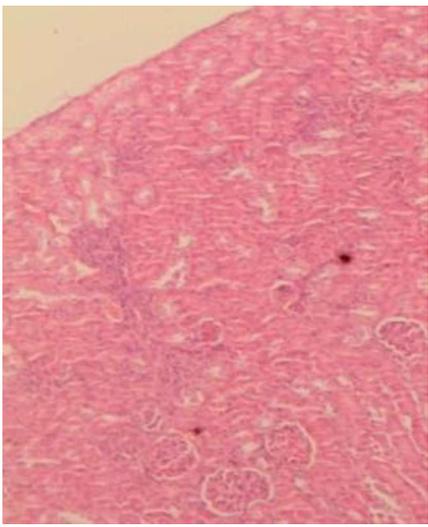
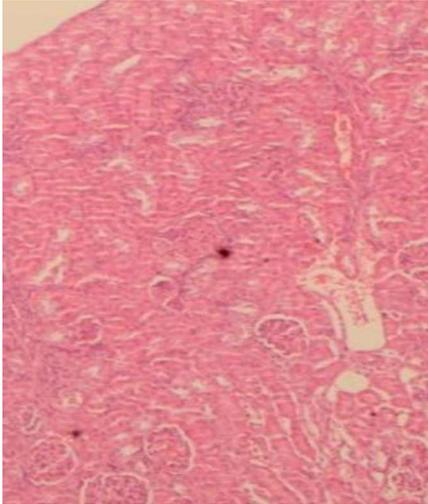
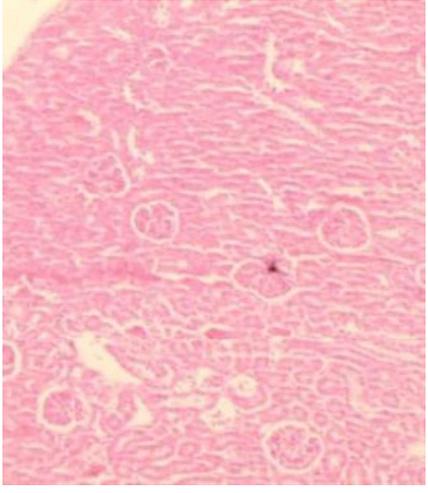
Doses (mg/kg)	N° de animais	Urinalise							
		Nitrito		pH		Densidade*	Leucócitos	Cor	
		(-)	(6)	(6,5)	(7)				(8)
Toxicidade aguda									
CN	6	6	2	2	1	1	1.016 ± 0.004	6	6
β -CFN ₃₀₀	6	6	2	1	2	1	1.018 ± 0.004	6	6
β -CFN ₂₀₀₀	6	6	4	1	1	0	1.021 ± 0.003	6	6
Toxicidade em doses repetidas									
CN	7	7	1	2	3	1	1.017 ± 0.002	7	7
β -CFN ₃₀₀	7	7	3	3	1	0	1.021 ± 0.003	7	7
β -CFN ₂₀₀₀	7	7	3	2	1	1	1.025 ± 0.003	7	7

Legenda: Toxicidade aguda: (CN) Controle (n=6), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=6), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=6). Toxicidade em doses repetidas: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média ± E.P.M.

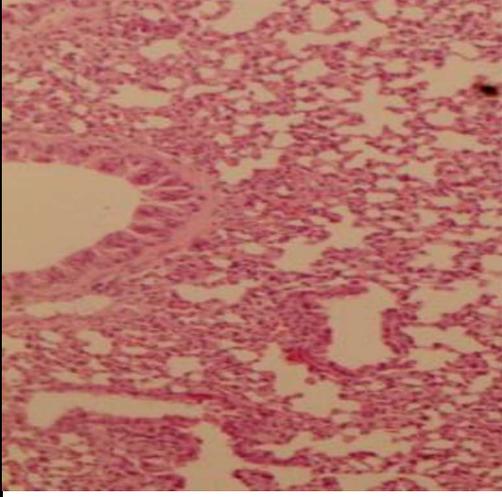
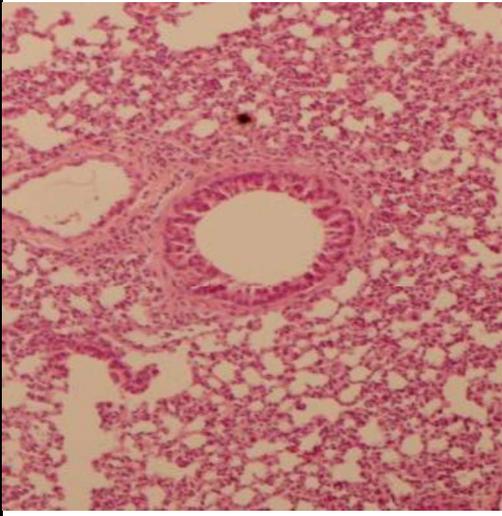
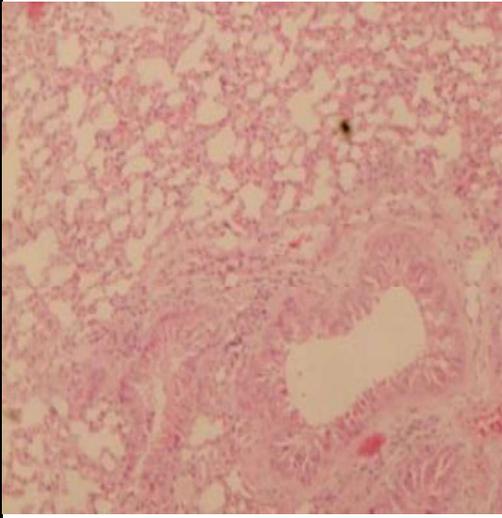
Nitrito: (-) Negativo

Leucócitos: (-) Negativo

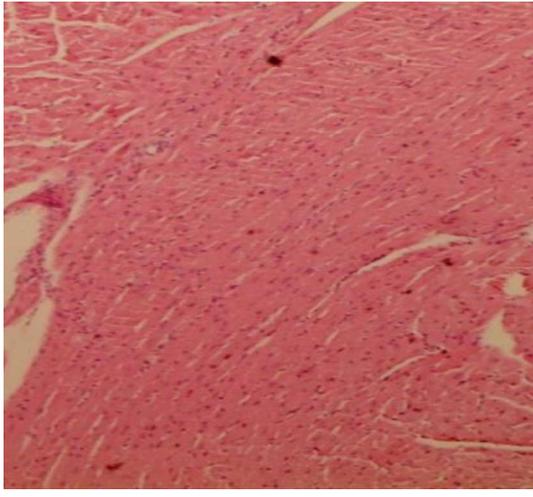
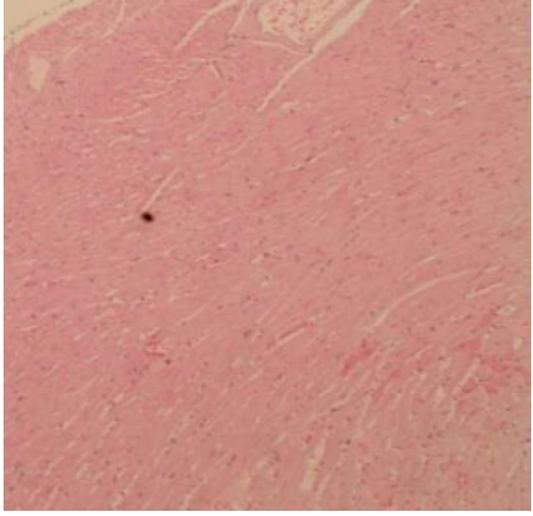
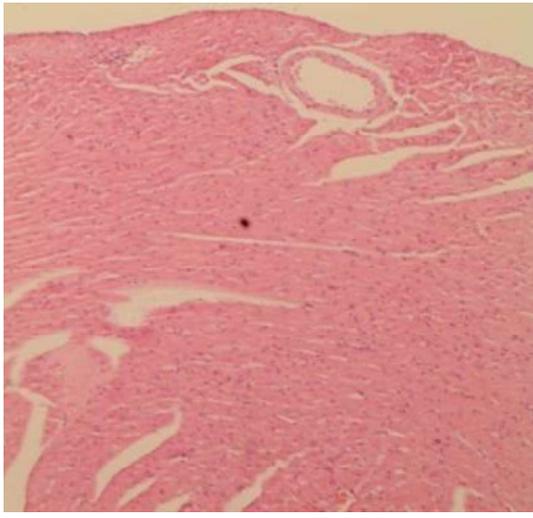
Tabela 7: Análise histopatológica de órgãos dos animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) na toxicidade em doses repetidas (H e E x 100).

Organs	Histopatologia		
	CN	β -CFN ₃₀₀	β -CFN ₂₀₀₀
Fígado			
Rins			

Pulmões



Coração

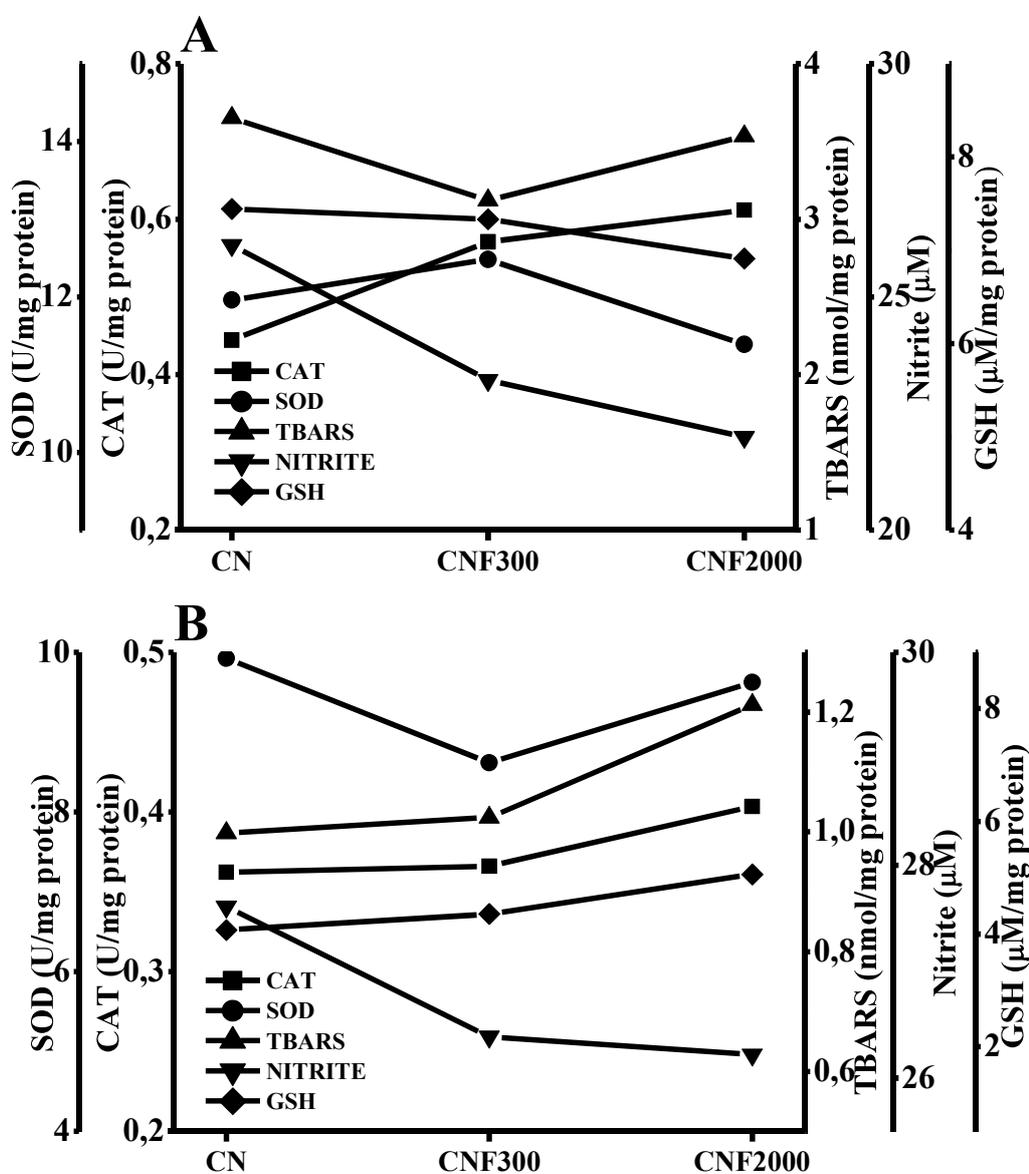


Barra de escala = 50 μ m

Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim

As análises do estresse oxidativo nos fígados e rins dos animais submetidos ao estudo de toxicidade em doses repetidas demonstram ausência de alterações significativas relacionadas com a administração das doses do β -cariofileno quando comparado com os resultados dos grupos controles (Figura 4A-B, $p>0,05$).

Figura 4: Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim dos animais tratados com β -cariofileno (β -CFN) após o estudo de toxicidade em doses repetidas (28 dias).



Legenda: (CN) Controle (n=7), (β -CFN₃₀₀) dose de 300 mg/kg (n=7), (β -CFN₂₀₀₀) dose de 2000 mg/kg (n=7). Os valores representam a média \pm E.P.M.

DISCUSSÃO

Conforme já destacado na introdução, o β -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico que está presente em várias plantas alimentares e que há uma expansão dos estudos farmacológicos por vários grupos de pesquisas e poucos têm abordado parâmetros toxicológicos em modelos animais. Sendo um composto com potencial terapêutico variado, o tratamento em modelos animais com o β -cariofileno abrange uma gama de doses e de tempo em que não são discutidos efeitos clínicos de toxicidade. Assim, o desenvolvimento de pesquisas para clarificar o seu perfil toxicológico é de grande importância e o presente estudo apresenta os resultados da toxicidade em dose única e em doses repetidas do β -cariofileno em camundongos *Swiss* fêmeas.

O estudo de Schmitt et al. (2016) relatou que o tratamento de ratos *Wistar* com β -cariofileno por via oral não induziu susceptibilidade toxicológica em relação a diferença sexual. Além disso, conforme demonstrado por Dewi et (2014) e indicado na diretriz 423 da OECD (OECD, 2001), a toxicidade em um sexo (fêmea) é geralmente considerado suficiente. Assim, o presente estudo foi realizado somente em camundongos *Swiss* fêmeas. Os resultados obtidos demonstraram que a administração das doses de 300 e 2000 mg/kg do β -cariofileno por via oral não induziu qualquer efeito adverso como ptose, contorções abdominais, reflexo de endireitamento, irritabilidade, piloereção, tremores e convulsões. Além disso, não foi registrado qualquer morte no estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas durante o período de exposição com do β -cariofileno. Assim, a toxicidade do β -cariofileno pode ser classificado na categoria 5 (toxicidade superior a 2000 mg/kg de peso corporal) do Sistema globalmente harmonizado de classificação (GHS) da diretriz 423 da OECD (OECD, 2001). Segundo Hart e Wong (1971), a toxicidade aguda oral do β -cariofileno em ratos resultou na dose letal média (DL₅₀) maior que 5000 mg/kg. Os resultados da toxicidade em doses repetidas no presente estudo estão de acordo com a avaliação toxicológica subcrônica (90 dias) realizada por Schmitt et al. (2016) que relatou a falta de sintomas indicativo de toxicidade e morte em ratos *Wistar* tratados por via oral com β -cariofileno nas doses de 150, 450 e 700 mg/kg/dia.

Considerando a característica lipofílica e a capacidade de atravessar a hematoencefálica, o presente estudo realizou uma avaliação da atividade neurocomportamental como parte do estudo de toxicidade. Os resultados obtidos demonstraram que a administração do β -cariofileno (300 e 2000 mg/kg) em camundongos *Swiss* fêmeas não interferiu na atividade exploratória espontânea e não provocou relaxamento muscular quando comparado com o grupo controle da toxicidade aguda e em doses repetidas. Sendo assim, os resultados obtidos demonstraram que uma alta dose do β -cariofileno não causa efeitos neurocomportamentais adversos. A ausência

de neurotoxicidade em doses inferiores foi verificado em estudos em que o β -cariofileno foi anticonvulsivante [100 mg/kg, (LIU et al., 2015)], antinociceptivo [20, 40 e 80 mg/kg (PAULA-FREIRE et al., 2014)], antidepressivo e ansiolítico [50 mg/kg, (BAHI et al., 2014)] em roedores.

Segundo Silva et al. (2016), o surgimento de alterações no peso de animais em estudos para avaliação da toxicidade aguda e subcrônica são considerados importantes indicadores de efeitos adversos metabólicos de uma determinada substância. No presente estudo, uma variação não significativa de até 5% no aumento de peso corporal dos animais em tratamento durante o estudo de toxicidade em doses repetidas foi observada na **Figura 3** quando comparado com o grupo controle, sugerindo que o β -cariofileno não compromete a absorção adequada dos nutrientes. Como demonstrado por Tambe et al. (1996), o β -cariofileno administrado por via oral (1-150 mg/kg) em ratos não induziu lesões na mucosa gástrica e ainda inibiu danos induzidos por líquidos alcoólicos. Além do resultado demonstrado na **Figura 3**, os grupos de camundongos *Swiss* fêmeas tratados com β -cariofileno não apresentaram alterações significativas no consumo de ração, ingestão de água, formação de urina e fezes quando comparado com o grupo controle do estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas. As variações nos dados fisiológicos (peso corporal e consumo ração) obtidos por Schmitt et al. (2016) em ratos *Wistar* de ambos os sexos também demonstraram não ser significativas quando comparado com o grupo controle.

Alterações significativas do peso absoluto e relativo dos órgãos de animais podem ser consideradas uma importante evidência de toxicidade segundo Silva et al. (2016) e é importante ressaltar que as atividades farmacológicas do β -cariofileno estão relacionadas principalmente aos órgãos como cérebro (BAHI et al., 2014; LOU et al., 2016; TIAN et al., 2016) e fígado (CALLEJA et al., 2013; BALDISSERA et al., 2016; KAMIKUBO et al., 2016). Assim, é importante que o β -cariofileno não prejudique o funcionamento desses órgãos. Em relação aos resultados da **Tabela 4** que mostram os pesos absolutos e relativos dos camundongos *Swiss* fêmeas, não houve diferença estatística quando comparado com os animais do grupo controle no estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas, confirmando os outros resultados já discutidos que demonstraram ausência de comprometimento toxicológico. Além disso, uma análise macroscópica dos órgãos internos (baço, fígado, rins, coração, cérebro e pulmões) não mostrou alterações de posição, tamanho, cor, forma e consistência quando comparado com os grupos controles. Assim como demonstrado no presente estudo, o resultado de Schmitt et al. (2016) confirmou que o β -cariofileno (150-700 mg/kg/dia) não induziu toxicidade pela avaliação do peso absoluto e relativo de órgãos como fígado, cérebro, rins e coração de ratos de ambos os sexos.

O sistema hematopoiético é bastante susceptível aos compostos com propriedades tóxicas e por isso serve como um importante indicador do estado fisiológico e patológico de animais em estudos toxicológicos (RAMAIAH; BOUNOUS; ELMORE, 2013). No presente estudo, após o tratamento com β -cariofileno em várias doses, não foram demonstradas alterações significativas ($p>0,05$) nos parâmetros hematológicos descritos na **Tabela 5** quando comparado com os grupos controles dos estudos de toxicidade em dose única e em doses repetidas. Assim, é sugerido que o sesquiterpeno bicíclico em estudo não apresenta hematoxicidade conforme já demonstrado no estudo de toxicidade subcrônica realizado por Schmitt et al. (2016) em ratos *Wistar*. Além da avaliação hematológica, os indicadores bioquímicos séricos da função hepática (ALT e AST), função renal (ureia e creatinina) e dos indicadores metabólicos (glicose, triglicerídeos e colesterol) demonstram que as variações nos resultados não foram significativas quando comparado com os valores dos grupos controles. O resultado da toxicidade subcrônica em ratos *Wistar* de ambos os sexos obtido por Schmitt et al. (2016) demonstrou redução significativa de parâmetros bioquímicos como ALT, AST e ureia, mas que não foi considerado um indicativo de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade associada ao tratamento de 90 dias.

Além dos resultados da **Tabela 5**, a ausência indicativa de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade durante o metabolismo do β -cariofileno pode justificar a manutenção do equilíbrio redox do fígado e rim (**Figura 4**). A compreensão dos resultados descritos na **Figura 4** é importante do ponto de vista terapêutico, uma vez que o metabolismo do β -cariofileno é pouco explorado e porque possui efeitos protetores em modelo animal de lesão hepática e renal associado com o estresse oxidativo (HORVÁTH et al., 2012; CALLEJA et al., 2013).

Os resultados discutidos da toxicidade em dose única e em doses repetidas aprimoram a compreensão do perfil toxicológico do β -cariofileno. Em conjunto com os experimentos que demonstraram um amplo potencial terapêutico (SHARMA et al., 2016), ausência de toxicidade subcrônica (SCHMITT et al., 2016), bem como nenhuma evidência de mutagenicidade no teste de Ames (FGE, 2015) e no teste de micronúcleo em linfócitos humanos (DI SOTTO et al., 2010), o presente estudo reforça que a utilização do β -cariofileno encontrados em vegetais pode conferir potenciais benefícios para a alimentação e a saúde sem apresentar indícios de toxicidade.

CONCLUSÃO

Portanto, os resultados do presente estudo fornecem uma compreensão do perfil de toxicidade do β -cariofileno. De acordo com os resultados da toxicidade aguda realizado

segundo a diretriz 423 da OECD, o β -cariofileno pode ser classificado como um composto com toxicidade superior a 2000 mg/kg de peso corporal. Além do estudo em dose única com camundongos *Swiss* fêmeas, os resultados em doses repetidas mostraram que não houve alterações que indicassem toxicidade, modificações no peso corporal e dos órgãos internos, consumo de alimento e água, bem como, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. [13] Catalase *in vitro*. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 105, 1984. p.121-126.
- AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; BAH, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, n. 1, p. 260-268, 2014.
- ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, n. 2, p. 56-62, 2012.
- ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.
- ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C.; DE BEM, A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 279, p. 220-231, 2014.
- BAH, A.; AL MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; OJHA, S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, n. 2, p. 119-124, 2014.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; DOLESKI, P. H.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-9, 2016.
- BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 50-58, 2016.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução normativa Nº 30, de 2 de fevereiro de 2016: Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA, 2016. 50 p.

BUCHBAUER, G.; ILIC, A. Biological Activities of Selected Mono and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. In: RAMAWAT, K. G. MÉRILLON, J.M. (Ed.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.4109-4159.

CALLEJA, M. A.; VIEITES, J. M.; MONTERO-METERDEZ, T.; TORRES, M. I.; FAUS, M. J.; GIL, A.; SUÁREZ, A. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, UK, v. 109, n. 3, p. 394-401, 2013.

CHO, H.I.; HONG, J.-M.; CHOI, J.W.; CHOI, H.-S.; HWAN KWAK, J.; LEE, D.U.; KOOK LEE, S.; LEE, S.M. β -Caryophyllene alleviates d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the TLR4 and RAGE signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 613-621, 2015.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1–2, p. 23-28, 2010.

DIAS, D. D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; DE SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79-84, 2012.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZADAŁA, L.; SZUMNY, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, Hoboken, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FLECKNELL, P. A. 3 - Anaesthesia. In: FLECKNELL, P. A. (Ed.). **Laboratory Animal Anaesthesia (Second Edition)**. London: Academic Press, 1996. p.15-73.

FREITAS, R. M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 2, p. 140-144, 2009.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

HORVÁTH, B.; MUKHOPADHYAY, P.; KECHRID, M.; PATEL, V.; TANCHIAN, G.; WINK, D. A.; GERTSCH, J.; PACHER, P. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1325-1333, 2012.

JUNG, J. I.; KIM, E. J.; KWON, G. T.; JUNG, Y. J.; PARK, T.; KIM, Y.; YU, R.; CHOI, M.S.; CHUN, H. S.; KWON, S.-H.; HER, S.; LEE, K. W.; PARK, J. H. Y. β -Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in

high-fat diet-induced obese C57BL/6N mice. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 9, p. 1028-1039, 2015.

KAMIKUBO, R.; KAI, K.; TSUJI-NAITO, K.; AKAGAWA, M. β -Caryophyllene attenuates palmitate-induced lipid accumulation through AMPK signaling by activating CB2 receptor in human HepG2 hepatocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 10, p. 2228-2242, 2016.

KOHN, D. F.; WIXCON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, G. J. Preface. In: BENSON, D. F. K. K. W. J. W. J. (Ed.). **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 978-9.

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T.; LIU, F.; ZHUANG, K.; LUO, K.; YANG, L. Neuroprotective Effects of Trans-Caryophyllene Against Kainic Acid Induced Seizure Activity and Oxidative Stress in Mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

LOU, J.; CAO, G.; LI, R.; LIU, J.; DONG, Z.; XU, L. β -Caryophyllene Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1291-1304, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; MACHADO, K. C.; ISLAM, M. T.; JUNIOR, A. L. G.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273-279, 2015.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

OECD, Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method: Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing, 2001.

OECD, Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing, 2008.

PAULA-FREIRE, L. I. G.; ANDERSEN, M. L.; GAMA, V. S.; MOLSKA, G. R.; CARLINI, E. L. A. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 356-362, 2014.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ARAÚJO, A. A. S.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; SILVA, G. F.; CARVALHO, F. M. S.; BROGDEN, N. K.; SLUKA, K. A. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Sciences**, v. 149, p. 34-41, 2016.

RAMAIAH, L.; BOUNOUS, D. I.; ELMORE, S. A. Chapter 50 - Hematopoietic System. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G. (Ed.). **Haschek and Rousseau's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)**. Boston: Academic Press, 2013. p.1863-1933.

SANTANA, L. C. L. R.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Propriedades físico-químicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 742-750, 2013.

SANTOS, N. A. G.; MARTINS, N. M.; SISTI, F. M.; FERNANDES, L. S.; FERREIRA, R. S.; DE FREITAS, O.; SANTOS, A. C. The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neurogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 261, p. 86-95, 2017.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 558-567, 2016.

SELESTINO NETA, M. C.; VITTORAZZI, C.; GUIMARÃES, A. C.; MARTINS, J. D. L.; FRONZA, M.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 190-197, 2017.

SHARMA, C.; M. AL KAABI, J.; M. NURULAIN, S.; N. GOYAL, S.; AMJAD KAMAL, M.; OJHA, S. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 21, p. 3237-3264, 2016.

SILVA, A. P. D. S. C. L.; OLIVEIRA, G. L. S.; MEDEIROS, S. C.; SOUSA, A. M. L.; LOPES, L. D. S.; DAVID, J. M.; JUNIOR, J. S. D. C.; DE FREITAS, R. M. Pre-clinical toxicology of garcinielliptone FC, a tautomeric pair of polyprenylated benzophenone, isolated from *Platonia insignis* Mart seeds. **Phytomedicine**, v. 23, n. 5, p. 477-482, 2016.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A.-T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical β -caryophyllene - air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538-545, 2006.

TAMBE, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y.; TANAKA, S. Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, β -Caryophyllene. **Planta Med**, v. 62, n. 05, p. 469-470, 1996.

YANG, C. H.; HUANG, Y. C.; TSAI, M. L.; CHENG, C. Y.; LIU, L. L.; YEN, Y. W.; CHEN, W. L. Inhibition of melanogenesis by β -caryophyllene from lime mint essential oil in mouse B16 melanoma cells. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 5, p. 550-554, 2015.

Diferentes modulações neuromoleculares do β -cariofileno nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes

Artigo submetido: *Life Sciences*

Qualis B1

2

Diferentes modulações neuromoleculares do β -cariofileno nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes

O β -cariofileno [(β -humuleno ou (-)-trans-cariofileno)] é um hidrocarboneto volátil de estrutura incomum com várias atividades neurocomportamentais, em que existe a necessidade de avaliações experimentais contínuas para determinar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos farmacológicos do β -cariofileno (β -CNF) em relação a doenças neurológicas como ansiedade, depressão e epilepsia. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos neurocomportamentais do β -CNF usando modelo animal no teste do campo aberto, rota rod, labirinto em cruz elevado, alimentação suprimida pela novidade, suspensão pela cauda e nado forçado, bem como os modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida. Os resultados obtidos fornecem um suporte adicional na compreensão dos mecanismos neuromoleculares subjacentes às propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes em camundongos *Swiss* fêmeas do β -CNF administrado por via oral (100, 200 e 400 mg/kg). Os resultados demonstraram que as atividades neurofarmacológicas do β -CNF podem envolver os receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, uma vez que o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com flumazenil (reconhecido antagonista do receptor benzodiazepínico) ou bicuculina (antagonista do receptor GABA_A) reestabeleceu os parâmetros de ansiedade no labirinto em cruz elevado, bem como os resultados de redução da latência para consumir o alimento no teste da alimentação suprimida pela novidade. No mesmo teste usando outro grupo de animais, as propriedades farmacológicas do β -CNF podem estar relacionadas a inibição da síntese de óxido nítrico, uma vez que o pré-tratamento com L-arginina reverteu significativamente os resultados ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivantes do β -CNF (200 mg/kg). Adicionalmente, os resultados obtidos sugerem que os receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{2A} e 5-HT₃ não estão envolvidos nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes do β -CNF. Assim, os resultados descritos no presente estudo fornecem um suporte adicional na compreensão dos mecanismos neuromoleculares subjacentes às propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes do β -CNF.

Palavras-chave: β -cariofileno, efeitos neurocomportamentais, receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, via L-arginina-óxido nítrico.

INTRODUÇÃO

O β -cariofileno [$(\beta$ -humuleno ou (-)-trans-cariofileno)] é um hidrocarboneto volátil de estrutura incomum, que apresenta um anel ciclobuteno fundido em *trans* com um anel de nove membros, com importante papel na química dos sesquiterpenóides e que está entre os majoritários sesquiterpenos encontrados em quantidades variáveis nos alimentos vegetais como pimenta (*Piper nigrum* Linn.), cravo (*Eugenia caryophyllata* Thumb.), canela (*Cinnamomum spp.*) e orégano (*Origanum vulgare* Linn.) (GERTSCH et al., 2008; YANG et al., 2012; BUCHBAUER; ILIC, 2013). Estudos com isômeros de cariofileno descreveram o β -cariofileno como um dos principais constituintes químicos encontrados em óleos essenciais da *Croton campestris* A. St. Hil, *Cannabis sativa* Linn, *Ocimum gratissimum* Linn, *Lantana camara* Linn, *Cordia verbenaceae* DC (sinônimo de *Varronia curassavica* Jacq), *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil, *Vernonia cinerea* Less, *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort, *Murraya paniculata* Linn. e de várias espécies da *Copaifera* (DIAS et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; SELESTINO et al., 2017).

Esse sesquiterpeno bicíclico é um agente aromatizante e um aditivo alimentar aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA, Code of Federal Regulations/nº. 21CFR172.515). Experimentos farmacológicos em vários modelos animais destacaram atividades no tratamento da neuropatia periférica (SEGAT et al., 2017), alcoolismo (AL MANSOURI et al., 2014), doença hepática gordurosa não alcoólica (KAMIKUBO et al., 2016), aterosclerose hipercolesterolêmica (BALDISSERA et al., 2016), encefalomielite autoimune experimental (FONTES et al., 2017), hiperglicemia mediada pelo estresse oxidativo e inflamação (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016), doença de Alzheimer (HU et al., 2017) e para o tratamento da ansiedade e depressão (BAHI et al., 2014). Estudos preliminares realizado pelo Laboratório de farmacologia da dor (LAFDOR-Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM/UFPI) demonstraram ausência de toxicidade em doses repetidas (OLIVEIRA et al., 2018). Além disso, o β -cariofileno atua como agonista seletivo do receptor canabinoide do tipo 2 (CB₂) (SHARMA et al., 2016).

Adicionalmente, estudos neurológicos não clínicos com o β -cariofileno demonstraram potencial efeito na diminuição da excitotoxicidade mediada pelo glutamato (ASSIS et al., 2014), atividade anticonvulsivante contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol (OLIVEIRA et al., 2016), neuroproteção contra os efeitos tóxicos do peptídeo β -amiloide (CHENG et al., 2014) e pela inibição da neurodegeneração dopaminérgica e resposta neuroinflamatória (OJHA et al., 2016). Além disso, os resultados descritos por Bahi et al. (2014) sugerem que a regulação

do receptor canabinoide do tipo 2 pelo β -cariofileno pode ser um alvo terapêutico para o tratamento de ansiedade e depressão. Esses estudos em conjunto destacam a necessidade de avaliações experimentais contínuas para determinar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos farmacológicos do β -cariofileno em relação a doenças neurológicas como ansiedade, depressão e epilepsia.

Doenças do sistema nervoso central como ansiedade, depressão e epilepsia são caracterizados por compartilharem vários mecanismos moleculares em comuns e o envolvimento da via L-arginina/NO nos estudos neurocomportamentais com o β -cariofileno ainda continua sendo pouco discutido. Na via L-arginina/NO, a óxido nítrico sintase atua na sinalização a jusante da ativação dos receptores NMDA (N-metil-D- aspartato) e pode ser encontrado amplamente distribuído no cérebro (córtex pré-frontal, locus coeruleus, amígdala, núcleos da rafe e hipocampo) modulando a liberação de vários neurotransmissores como o glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e 5-HT (5-hidroxitriptamina) (BRUENIG et al., 2017; SARGINSON et al., 2014). Adicionalmente, vários experimentos não clínicos destacam que o sistema GABAérgico e sistema serotoninérgico que podem ser modulados pelo via L-arginina/NO estão envolvidos na fisiopatologia da ansiedade, depressão e epilepsia (MÖHLER, 2012; ŽMUDZKA et al., 2018).

Com o objetivo de ampliar e aprimorar o conhecimento da ação farmacológica do β -cariofileno, o presente estudo avaliou os efeitos neurocomportamentais usando o modelo animal do teste do campo aberto, rota rod, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose (*splash test*), bem como os modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina e pentilenotetrazol. Os possíveis mecanismos neurofarmacológicos do β -cariofileno mediado por receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, serotoninérgicos (5-HT_{2A} e 5-HT₃) e a via da L-arginina-óxido nítrico (NO) foram avaliados.

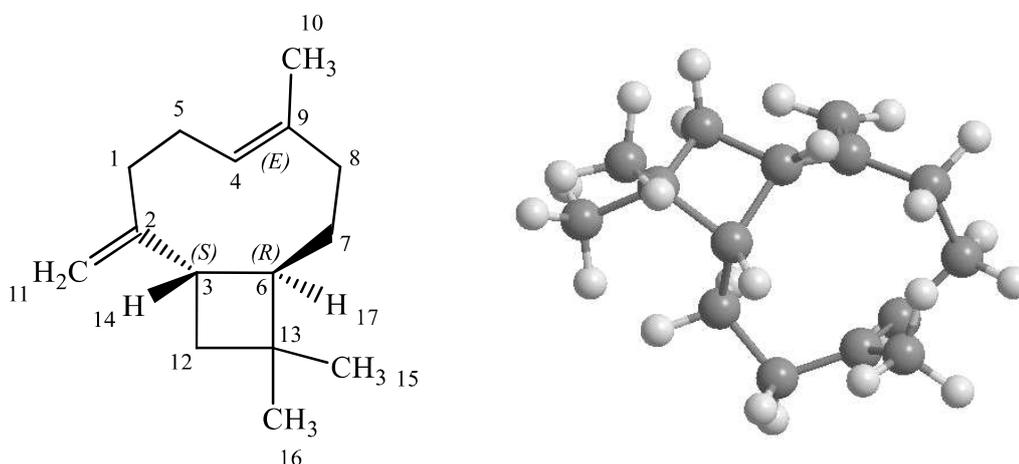
MATERIAL E MÉTODOS

β -cariofileno e compostos químicos

O β -cariofileno [Formula molecular: C₁₅H₂₄, peso molecular: 204,36 g/mol, CAS: 87-44-5; pureza \geq 98,5% (**Figura 1**)], Tween 80, pilocarpina, pentilenotetrazol, isoniazida, diazepam, imipramina, flumazenil, bicuculina, ketanserina, ondansetrona, L-arginina, éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME), N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG) e azul de metileno foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes

químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções dos compostos químicos utilizados no presente estudo foram preparadas e usados no dia dos experimentos.

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno [(1R,4E,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno].



Fonte: Autoria própria

Animais e condições experimentais

Os camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g) utilizados foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos em temperatura controlada (24 ± 1 °C) em ciclo de 12 horas claro/escuro (ligado as 9:00 e desligado 21:00 horas) e com livre acesso à água filtrada disponível em garrafas graduadas e comida (*pellets* de ração Purina). Todos os animais utilizados foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) com o máximo de cinco animais por gaiola e inicialmente aclimatados no Laboratório de farmacologia da dor (LAFDOR-Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM) por dez dias antes da realização dos experimentos. Camundongos *Swiss* fêmeas foram utilizados a partir de um estudo prévio realizado por Oliveira et al. (2018) e todos os testes comportamentais foram realizados entre as 10:00 e 16:00 horas.

O máximo de esforço foi feito para minimizar tanto o sofrimento quanto o número de animais utilizados, sendo que cada experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI#012/15) e realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (BRASIL, 2016) e

U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals — PHS Policy.

Tratamentos farmacológicos

O β -cariofileno foi emulsificado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via oral (v.o.) apenas uma única vez nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg para avaliação detalhada dos testes comportamentais (campo aberto, Rota rod, labirinto em cruz elevado, alimentação suprimida pela novidade, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose) e dos modelos de epilepsia induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida após uma hora de tratamento. Pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida foram solubilizados em veículo e administrado por via intraperitoneal (i.p.) nos modelos de epilepsia. O diazepam foi solubilizado em veículo e serviu como controle positivo no teste do campo aberto (5 mg/kg, v.o.), rota *rod* (5 mg/kg, v.o.), teste da alimentação suprimida pela novidade (2 mg/kg, v.o.), labirinto em cruz elevado (2 mg/kg, v.o.) e modelos de epilepsia (5 mg/kg, v.o.) após uma hora de tratamento. A imipramina (50 mg/kg, v.o.) foi solubilizada em veículo e serviu como controle positivo no teste nado forçado, suspensão pela cauda e borrifagem de sacarose após uma hora de tratamento. O grupo controle recebeu apenas veículo com o mesmo volume (10 mL/kg, v.o.) que os outros grupos experimentais.

Para avaliar o possível mecanismo molecular mediado por receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos nos testes comportamentais e modelos de epilepsia, o flumazenil (5 mg/kg, antagonista do receptor benzodiazepínico) ou bicuculina (1 mg/kg, antagonista seletivo do receptor GABA_A) foi administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) por uma hora. Em relação aos receptores serotoninérgicos, a ketanserina (2 mg/kg, antagonista de receptor 5-HT_{2A}) ou ondansetrona (1 mg/kg, antagonista de receptor 5-HT₃) foi administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) por uma hora. Além disso, o possível mecanismo molecular envolvendo a via L-arginina-óxido nítrico também foi avaliado pela administração intraperitoneal de L-arginina (500-750 mg/kg, precursor do NO), L-NAME (10-20 mg/kg, inibidor inespecífico de NOS), L-NOARG (0,5-2 mg/kg, inibidor da NOS) e azul de metileno (7 mg/kg, inibidor de NOS e da guanilato ciclase solúvel) 30 minutos antes do tratamento com β -cariofileno (200 mg/kg) por uma hora.

Cada grupo experimental avaliado no presente estudo foi realizado independentemente com oito animais cada (n=8) em que as doses do β -cariofileno e das outras substâncias utilizadas

foram estabelecidas a partir de estudos anteriores (OLIVEIRA et al., 2018, MACHADO et al., 2015, DONATO et al., 2014).

Teste do campo aberto

Os animais submetidos ao tratamento por via oral com β -cariofileno foram colocados um por vez no campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 × 30 × 15 cm) e dividido em nove quadrados de áreas iguais para avaliação da atividade exploratória espontânea. Os parâmetros observados durante 5 minutos foram o número total de quadrados cruzados com as quatro patas, número de comportamento de autolimpeza (groomings), número de levantamentos (rearings) e de cruzamentos no centro, bem como a quantidade de bolo fecal (CHRISTMAS; MAXWELL, 1970; HALL; BALLACHEY, 1932; MACHADO et al., 2015).

Teste de escavação (*digging*)

O teste de escavação ou alteração da camada de maravalha foi realizado conforme descrito previamente por Deacon (2006). Cada animal foi colocado em uma gaiola de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) coberto com maravalha (1 cm de camada) para avaliar a latência para iniciar a escavação, quantidade de escavação e tempo total gasto nas escavações. Uma escavação/alteração foi definida como um deslocamento significativo da maravalha pelo animal usando as duas patas dianteiras ou traseiras, sendo que um aumento no comportamento de escavação indica maior atividade exploratória do animal.

Teste do Rota rod

A coordenação motora dos grupos de animais foi avaliada pelo número de quedas e o tempo de permanência durante 180 segundos em uma barra giratória de 25 mm de diâmetro com rotação de 17 rpm (BOHLEN et al., 2009; DUNHAM; MIYA, 1957; SILVA et al., 2016).

Teste de labirinto em cruz elevado

O teste de labirinto em cruz elevado foi realizado conforme descrito por Walf e Frye (2007). Cada animal foi colocado no centro do labirinto em cruz elevado que consiste em dois braços abertos (35×6 cm) e dois braços fechados (35×6×10 cm) que se estendem de uma área central em comum (6×6 cm). O experimento foi realizado durante 5 minutos para determinar o tempo de permanência e o número de entradas nos braços e fechados. A entrada em um braço foi considerada quando o animal cruzou a delimitação de um braço com as quatro patas. O

parâmetro de ansiedade foi estabelecido como porcentagem de entradas nos braços abertos (entradas nos braços abertos/total de entradas em todos os braços) e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (tempo de permanência nos braços abertos/ tempo total de permanência em todos os braços). Para cada animal em tratamento, o labirinto em cruz foi inicialmente limpo com etanol 70%.

Teste da alimentação suprimida pela novidade

O teste da alimentação suprimida pela novidade foi realizado conforme descrito previamente por Santarelli et al. (2003) com modificações, em que cada animal foi privado de alimentação por 24 horas em gaiolas de polipropileno antes dos experimentos. Posteriormente, cada animal em tratamento foi colocado um por vez no canto de uma gaiola de polipropileno (40 cm × 40 cm × 35 cm) coberto por maravalha com um pellet de ração disposta no centro. Uma camada de maravalha nova foi usada para cada animal. A latência para se aproximar e começar a comer o pellet foi registrado durante a avaliação de 300 segundos e caso o animal em tratamento não se alimentar, a latência foi estabelecida em 300 segundos. Para excluir imediatamente a possibilidade de que o estresse resultante da privação de alimento afetou o apetite normal, cada animal foi devolvido para a sua gaiola de origem por mais 5 minutos para determinar a quantidade de pellet consumida (diferença). Um animal mais ansioso pode apresentar uma latência maior para começar a comer o pellet em um novo ambiente.

Teste da suspensão pela cauda

A suspensão pela cauda dos animais foi realizada conforme descrito previamente por Steru et al., (1987). Um pedaço de fita adesiva foi usado para suspender cada animal em tratamento pela cauda com uma altura de 30 cm acima de uma superfície plana. O experimento foi realizado durante 6 minutos para determinar o tempo de imobilidade que foi definido pela ausência de movimentos bruscos (o animal pode movimentar levemente a cabeça ou as patas dianteiras, sem mexer o corpo) ou ausência total de movimento.

Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado conforme descrito previamente (PORSOLT et al., 1978). Cada animal em tratamento foi colocado em um cilindro (10 x 25 cm) com 10 cm³ de água durante 6 minutos para determinar o tempo de imobilidade, em que o animal permanece flutuando passivamente na água fazendo pequenos movimentos para manter a sua cabeça acima

da água. A água para cada animal em tratamento era trocada para evitar uma interferência comportamental.

Teste de Borrifagem de sacarose (*splash test*)

O teste de borrifagem de sacarose foi realizado conforme descrito previamente (SANTARELLI et al., 2003; WANG et al., 2018). Resumidamente, cada animal em tratamento foi colocado um por vez em uma gaiola de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) para posteriormente receber uma borrifação de uma solução de sacarose (10%, peso/volume) no dorso para induzir um comportamento de autolimpeza (groomings). O tempo total de autolimpeza e a frequência foram registrados durante 5 minutos.

Modelos de crises epilépticas induzido: pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida

Os modelos convulsivos foram realizados conforme descrito por Machado et al., (2015). Resumidamente, após o período de uma hora de tratamento com o β -cariofileno (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), diazepam (5 mg/kg, v.o.) ou controle negativo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, 10 mL/kg), cada animal recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.), pentilenotetrazol (100 mg/kg, i.p.) ou isoniazida (400 mg/kg, i.p.) para determinar a latência da primeira convulsão (convulsão tônico/clônica) e a latência de morte. O período de avaliação após a administração dos quimioconvulsivantes foi de 4 horas e a latência de convulsões tônico-clônicas generalizadas foi determinada a partir do momento que o animal recebeu pilocarpina ou pentilenotetrazol até as primeiras convulsões tônico-clônicas. A latência para morte foi determinada a partir do momento da administração intraperitoneal dos quimioconvulsivantes até a morte dos animais.

Determinação do C log P

O resultado do coeficiente de partição n-octanol/água (C log P) foi calculado usando o *ChemBioDraw* Ultra 14.

Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média). Os resultados da interação do β -cariofileno com antagonistas foram analisados utilizando *two-way* ANOVA seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post hoc*. A estatística dos outros resultados foi realizada utilizando *one way* ANOVA seguida pelo teste *Newman-Keuls* como

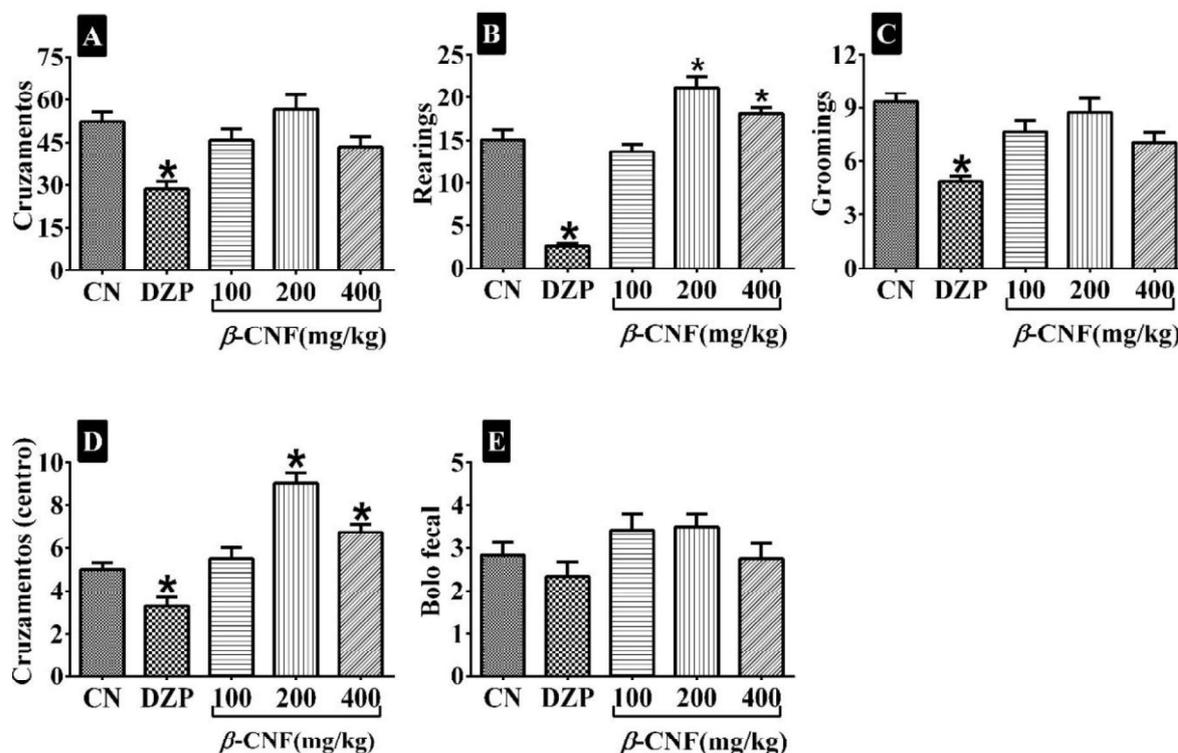
post hoc. Diferenças significativas entre os grupos avaliados foram considerados quando $p < 0,05$ (GraphPad Prism 6.01).

RESULTADOS

Teste do campo aberto e rota rod

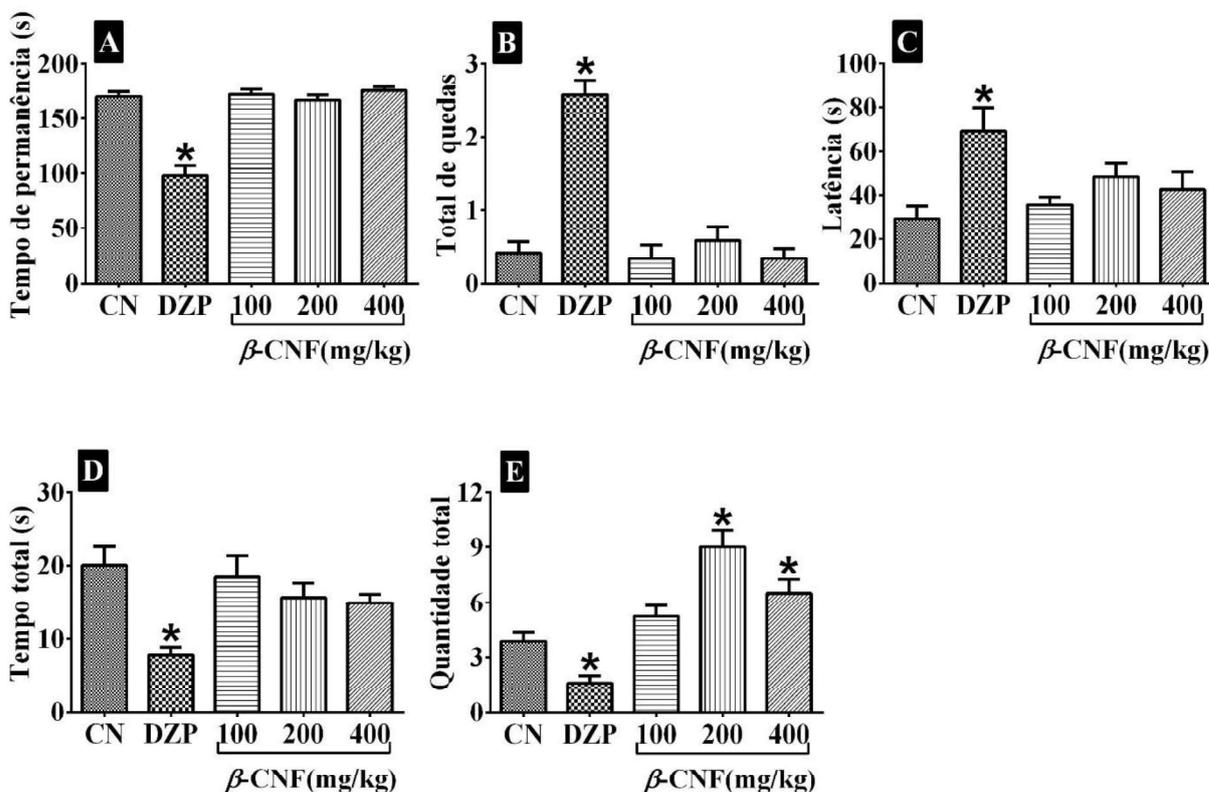
Os animais tratados com o β -CNF apresentaram um comportamento nos parâmetros avaliados sem diferenças significativas quando comparado com o grupo controle no teste do campo aberto, exceto no *rearings* (**Figura 2B**, $p < 0,05$) e no número de cruzamentos na área central (**Figura 2D**, $p < 0,05$). Diferentemente do diazepam, o β -CNF não alterou significativamente a coordenação motora quando comparado com o grupo controle no teste do *Rota rod* (**Figura 3A e B**, $p > 0,05$). Em relação ao teste de escavação ou alteração da camada de maravalha, foi observado alteração significativa somente na quantidade de escavação (200 e 400 mg/kg) quando comparado com o grupo controle negativo (**Figura 3E**, $p < 0,05$).

Figura 2: Resultados da atividade exploratória espontânea do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 5 mg/kg) no teste do campo aberto (A, B, C, D e E).



Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Figura 3: Resultados da coordenação motora e da atividade exploratória do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 5 mg/kg) no teste rota *rod* (A e B) e de alteração da camada de maravalha (A, B e C), respectivamente.

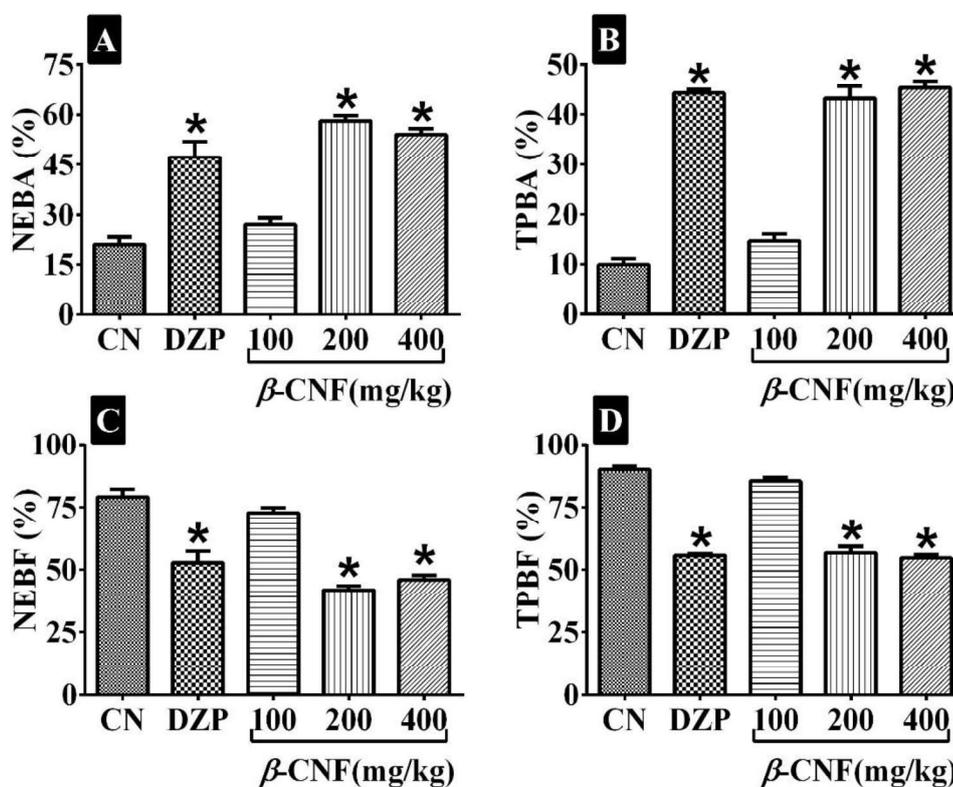


Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way ANOVA* e Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Teste de labirinto em cruz elevado

Quando comparado com o grupo controle, o diazepam e β -CNF (200 e 400 mg/kg) aumentaram significativamente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (Figura 4A e B, $p < 0,05$). Em contraste, o diazepam e β -CNF (200 e 400 mg/kg) reduziram significativamente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados (Figura 4C e D, $p < 0,05$).

Figura 4: Resultados do efeito tipo ansiolítico do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 2 mg/kg) no teste de labirinto em cruz elevado (A, B, C e D).



Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Número de entradas nos braços abertos (NEBA), Tempo de permanência nos braços abertos (TEBA); Número de entradas nos braços fechados (NEBF); Tempo de permanência nos braços fechados (TPBF).

Conforme a análise *two-way* ANOVA na **Tabela 1**, o pré-tratamento com o flumazenil ou bicuculina antagonizou os resultados de entrada e do tempo de permanência demonstrado pelo β -CNF (200 mg/kg) em ambos os braços ($p < 0,05$). Diferentemente, o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com a ketanserina ou ondansetrona não alterou significativamente o número de entrada e o tempo de permanência em ambos os braços quando comparado somente com o grupo β -CNF (200 mg/kg). Para destacar a via molecular da L-arginina/NO, a análise *two-way* ANOVA do pré-tratamento com uma dose subefetiva de L-arginina demonstrou uma reversão significativa do efeito ansiolítico do β -CNF (200 mg/kg) no teste de labirinto em cruz elevado ($p < 0,05$). No entanto, os resultados na **Tabela 1** demonstraram que o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com L-NAME, L-NOARG ou azul de metileno induziu efeito sinérgico significativo nos resultados de entradas e do tempo de permanência em ambos os braços quando comparado ao grupo de animais tratado somente com β -CNF (200 mg/kg) ($p < 0,05$).

Tabela 1: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) no teste de labirinto em cruz elevado.

Tratamentos	Parâmetros (%)			
	NEBA	TEBA	NEBF	TPBF
CN	20,91 \pm 2,24	9,91 \pm 1,25	79,09 \pm 2,98	90,09 \pm 3,95
β -CNF ₂₀₀	58,04 \pm 1,57*	43,11 \pm 2,49*	41,96 \pm 1,57*	56,89 \pm 2,49*
FLU	18,31 \pm 2,01	11,78 \pm 1,04	81,69 \pm 2,70	88,22 \pm 1,46
FLU+ β -CNF ₂₀₀	23,91 \pm 2,15 [#]	14,19 \pm 1,84 [#]	76,09 \pm 2,71 [#]	85,81 \pm 1,84 [#]
BIC	22,63 \pm 2,15	11,37 \pm 1,24	77,37 \pm 2,15	88,63 \pm 1,24
BIC+ β -CNF ₂₀₀	23,47 \pm 1,78 [#]	11,70 \pm 0,85 [#]	76,53 \pm 2,36 [#]	88,30 \pm 1,41 [#]
KTS	22,47 \pm 1,94	12,58 \pm 0,94	75,53 \pm 1,94	87,42 \pm 1,34
KTS+ β -CNF ₂₀₀	51,44 \pm 2,51	41,35 \pm 2,30	48,56 \pm 1,59	58,65 \pm 3,32
ODN	24,70 \pm 1,65	12,85 \pm 1,32	75,30 \pm 1,65	86,00 \pm 1,66
ODN+ β -CNF ₂₀₀	54,00 \pm 2,29	40,15 \pm 1,87	46,00 \pm 3,21	59,85 \pm 1,87
L-ARG	18,35 \pm 1,70	9,51 \pm 1,71	81,65 \pm 1,70	90,49 \pm 1,71
L-ARG+ β -CNF ₂₀₀	27,52 \pm 2,38 [#]	13,70 \pm 2,07 [#]	72,48 \pm 2,38 [#]	86,30 \pm 2,06 [#]
L-NAME	21,61 \pm 1,85	12,32 \pm 1,76	78,39 \pm 1,70	87,68 \pm 1,75
L-NAME+ β -CNF ₂₀₀	63,55 \pm 2,03 [#]	54,11 \pm 3,31 [#]	36,45 \pm 2,03 [#]	45,89 \pm 3,27 [#]
L-NOARG	23,16 \pm 2,57	12,10 \pm 1,31	81,65 \pm 1,70	87,90 \pm 1,45
L-NOARG+ β -CNF ₂₀₀	65,84 \pm 1,56 [#]	52,05 \pm 3,58 [#]	34,16 \pm 1,56 [#]	47,95 \pm 3,58 [#]
AZM	25,36 \pm 2,11	11,54 \pm 1,23	74,64 \pm 2,11	88,46 \pm 1,23
AZM+ β -CNF ₂₀₀	65,18 \pm 1,37 [#]	50,21 \pm 2,53 [#]	35,03 \pm 1,32 [#]	49,79 \pm 2,54 [#]

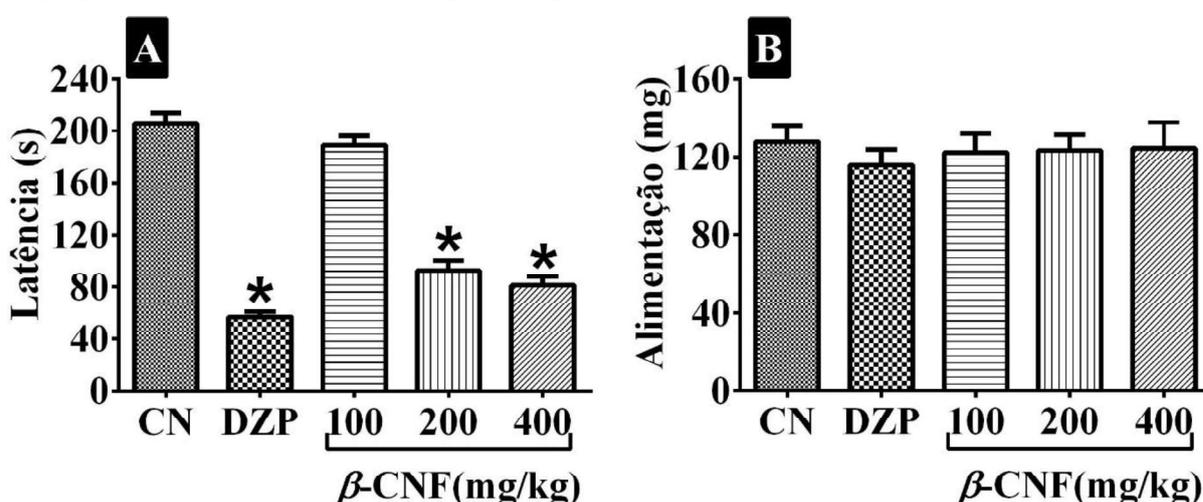
Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%)

(*one way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). [#] $p < 0,05$ em relação β -CNF (200 mg/kg) (Two-way ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Número de entradas nos braços abertos (NEBA), Tempo de permanência nos braços abertos (TEBA); Número de entradas nos braços fechados (NEBF); Tempo de permanência nos braços fechados (TPBF). Flumazenil 5 mg/kg (FLU), Bicuculina 2 mg/kg (BIC), Ketanserina 2 mg/kg (KTS), Ondansetrona 1 mg/kg (ODN), L-arginina 750 mg/kg (L-ARG), Éster metílico de N-nitro-L-arginina 10 mg/kg (L-NAME), N^G-nitro-L-arginina 2,0 mg/kg (L-NOARG), Azul de metileno 7 mg/kg (AZM).

Teste da alimentação suprimida pela novidade

Conforme observado no efeito comportamental, os grupos de animais tratados com β -CNF (200 e 400 mg/kg) e diazepam apresentaram uma redução significativa na latência para consumir o alimento quando comparado com o grupo controle (**Figura 5A**, $p < 0,05$). Em relação à quantidade de alimento consumido, os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas nos grupos de animais tratados com β -CNF (100, 200 e 400 mg/kg) e diazepam quando comparado com o grupo controle (**Figura 5B**, $p > 0,05$).

Figura 5: Resultados do efeito tipo ansiolítico do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP, 2 mg/kg) no teste da alimentação suprimida pela novidade (A e B).



Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Em relação à análise *two-way* ANOVA na **Tabela 2**, o pré-tratamento com o flumazenil ou bicuculina reverteu os resultados de redução da latência para consumir o alimento demonstrado pelo β -CNF (200 mg/kg) ($p < 0,05$). Diferentemente do observado para o mecanismo molecular mediado por receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com a ketanserina ou ondansetrona não induziu alterações significativas na latência para consumir o alimento quando comparado somente com o grupo de animais tratados com β -CNF (200 mg/kg) ($p > 0,05$). Na avaliação da modulação neuromolecular pela via L-arginina/NO, o resultado da análise *two-way* ANOVA do pré-tratamento com uma dose subefetiva de L-arginina demonstrou uma reversão significativa do efeito ansiolítico do β -CNF (200 mg/kg) no teste da alimentação suprimida pela novidade

($p < 0,05$). No entanto, os resultados na **Tabela 2** demonstraram que o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com L-NAME, L-NOARG ou azul de metileno induziu efeito sinérgico significativo na latência para consumir o alimento quando comparado com o grupo de animais tratados somente com β -CNF (200 mg/kg) ($p < 0,05$). Adicionalmente, todos os resultados de consumo alimentos não apresentaram alterações significativas quando comparado com o grupo controle ($p > 0,05$).

Tabela 2: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) no teste da alimentação suprimida pela novidade.

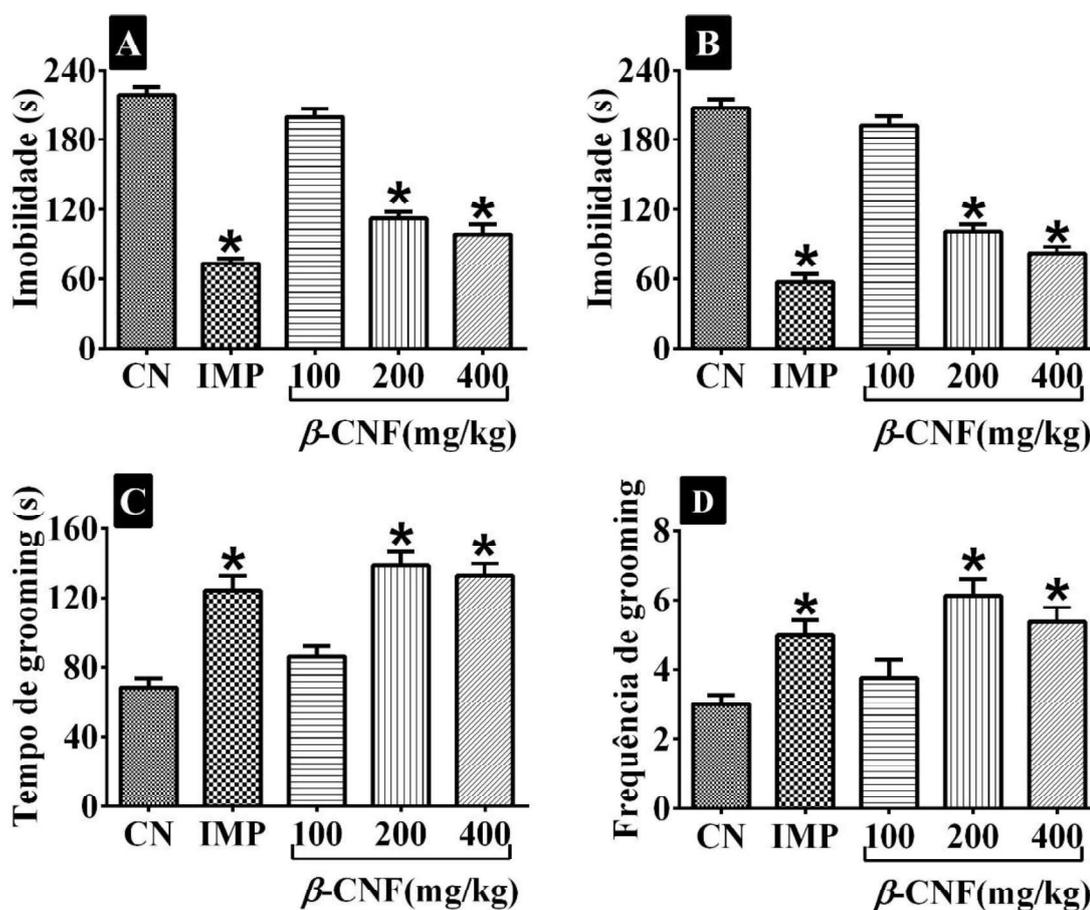
Tratamentos	Teste da alimentação suprimida pela novidade	
	Latência (s)	Alimentação (mg)
CN	205,7 ± 7,66	127,8 ± 8,41
β -CNF ₂₀₀	92,78 ± 7,40*	123,4 ± 7,85
FLU	207,0 ± 5,60	132,8 ± 7,66
FLU+ β -CNF ₂₀₀	174,2 ± 13,20 [#]	125,3 ± 7,85
BIC	206,4 ± 6,32	114,6 ± 9,15
BIC+ β -CNF ₂₀₀	183,8 ± 11,60 [#]	113,4 ± 6,78
KTS	212,9 ± 8,27	127,1 ± 8,49
KTS+ β -CNF ₂₀₀	99,9 ± 7,61	116,4 ± 7,02
ODN	217,1 ± 11,29	121,0 ± 8,10
ODN+ β -CNF ₂₀₀	91,8 ± 9,77	119,1 ± 9,88
L-ARG	229,0 ± 12,78	113,3 ± 6,61
L-ARG+ β -CNF ₂₀₀	200,9 ± 12,67 [#]	114,0 ± 9,28
L-NAME	198,4 ± 10,50	112,9 ± 6,03
L-NAME+ β -CNF ₂₀₀	48,8 ± 5,32 [#]	119,8 ± 7,21
L-NOARG	193,4 ± 11,63	112,6 ± 5,38
L-NOARG+ β -CNF ₂₀₀	47,97 ± 5,42 [#]	121,6 ± 7,53
AZM	180,4 ± 10,30	137,8 ± 5,25
AZM+ β -CNF ₂₀₀	37,13 ± 4,28 [#]	133,4 ± 7,05

Os resultados representam a média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). [#] $p < 0,05$ em relação β -CNF (200 mg/kg) (*Two-way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Flumazenil 5 mg/kg (FLU), Bicuculina 2 mg/kg (BIC), Ketanserina 2 mg/kg (KTS), Ondansetrona 1 mg/kg (ODN), L-arginina 750 mg/kg (L-ARG), Éster metílico de N-nitro-L-arginina 10 mg/kg (L-NAME), N^G-nitro-L-arginina 0,5 mg/kg (L-NOARG), Azul de metileno 7 mg/kg (AZM).

Teste da suspensão pela cauda, nado forçado e Teste de Borrifagem de sacarose (*splash test*)

Quando comparado com o controle no teste da suspensão pela cauda, o β -CNF nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade em $8,15 \pm 3,46\%$, $48,15 \pm 2,51$ e $54,74 \pm 3,19\%$, respectivamente (**Figura 6A**, $p < 0,05$). No teste do nado forçado, o β -CNF nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade em $7,57 \pm 2,22\%$, $50,52 \pm 3,41$ e $59,94 \pm 3,17\%$, respectivamente (**Figura 6B**, $p < 0,05$). Similarmente, a Imipramina no teste da suspensão pela cauda e nado forçado reduziu significativamente o tempo de imobilidade em $65,27 \pm 2,33$ e $71,1 \pm 3,39\%$, respectivamente ($p < 0,05$). Adicionalmente e conforme observado no efeito comportamental após a borrifagem de sacarose 10%, os grupos de animais tratados com β -CNF (200 e 400 mg/kg) e imipramina apresentaram um aumento significativo no tempo total e na frequência de groomings quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 6C e D**, $p < 0,05$).

Figura 6: Resultados do efeito tipo antidepressivo do β -cariofileno (β -CNF) e imipramina (IMP) no teste da suspensão pela cauda (A), nado forçado (B) e borrifagem de sacarose (*splash test*) (C e D).



Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way ANOVA* e Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Nos resultados descritos na **Tabela 3**, a análise *two-way* ANOVA demonstrou que o pré-tratamento com a bicuculina, ketanserina ou ondansetrona não antagonizou os resultados de redução da imobilidade evidenciado pelo β -CNF (200 mg/kg) no teste da suspensão pela cauda e nado forçado ($p>0,05$). Similarmente, os resultados do β -CNF (200 mg/kg) evidenciado pelo tempo total de groomings não foram alterados pelos antagonistas dos receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos e serotoninérgicos. Na análise da via da L-arginina/NO, o pré-tratamento com uma dose subefetiva de L-arginina reverteu significativamente o tempo de duração de groomings no teste de Borrifagem de sacarose e o efeito anti-imobilidade do β -CNF (200 mg/kg) no teste da suspensão pela cauda e nado forçado ($p<0,05$). No entanto, a análise *two-way* ANOVA demonstrou que o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com L-NAME, L-NOARG ou azul de metileno induziu efeito sinérgico significativo nos resultados do tempo de imobilidade e no tempo de duração de groomings em relação aos grupo de animais tratados somente com β -CNF (200 mg/kg) ($p<0,05$). Adicionalmente, os grupos de animais tratados com bicuculina, ketanserina, ondansetrona, L-arginina, L-NAME, L-NOARG e azul de metileno não apresentaram alterações significativas nos resultados de imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado quando comparado com o grupo controle ($p>0,05$), bem como no teste de borrifagem de sacarose.

Modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida

Nos modelos de estudos descritos na **Figura 7**, os animais tratados com β -CNF e diazepam apresentaram um aumento na latência para a primeira convulsão e na latência para a morte. No modelo de convulsão induzido por pilocarpina, as doses de 200 e 400 mg/kg aumentaram significativamente a latência para a primeira convulsão em $38,19 \pm 5,78$ e $32,04 \pm 3,85\%$, respectivamente (**Figura 7A e B**, $p<0,05$). Os animais tratados com as doses de 200 e 400 mg/kg no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol apresentaram um aumento significativo na latência para a primeira convulsão em $57,48 \pm 4,71$ e $56,09 \pm 6,65$, respectivamente (**Figura 7D e E**, $p<0,05$). Similarmente aos resultados anticonvulsivos obtidos contra os quimioconvulsivantes pilocarpina e pentilenotetrazol, os grupos de animais tratados com β -CNF e que receberam isoniazida apresentaram um aumento significativo na latência para a primeira convulsão em $31,47 \pm 2,20$ e $31,38 \pm 3,55$ nas doses de 200 e 400 mg/kg, respectivamente (**Figura 7G e H**, $p<0,05$).

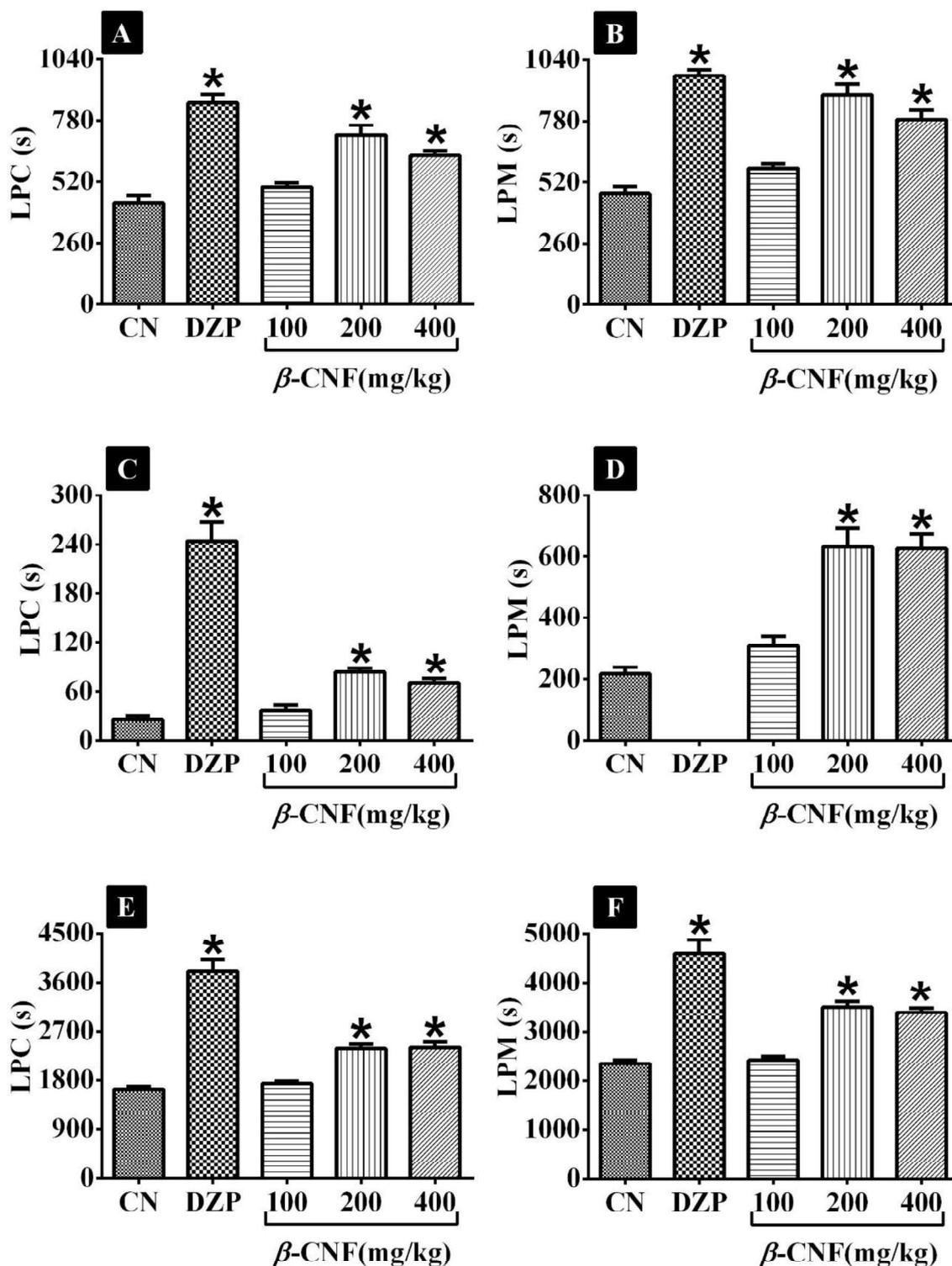
Tabela 3: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) no teste da suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose.

Tratamentos	Suspensão pela cauda		Nado forçado		Borrifagem de sacarose	
	Imobilidade (s)		Imobilidade (s)		Groomings (s)	
CN	218,9 ± 6,82		207,9 ± 7,34		68,45 ± 7,34	
β -CNF ₂₀₀	112,1 ± 5,91*		100,8 ± 6,80*		138,6 ± 7,88*	
BIC	204,1 ± 2,61		210,1 ± 2,61		51,54 ± 5,52	
BIC+ β -CNF ₂₀₀	121,9 ± 5,01*		113,7 ± 5,78*		115,9 ± 7,08*	
KTS	207,9 ± 6,76		213,1 ± 6,18		60,23 ± 5,17	
KTS+ β -CNF ₂₀₀	114,7 ± 4,86*		109,7 ± 6,23*		120,2 ± 8,30*	
ODN	204,7 ± 7,26		203,5 ± 5,21		69,53 ± 4,34	
ODN+ β -CNF ₂₀₀	117,9 ± 7,24*		106,3 ± 7,33*		143,6 ± 7,04*	
L-ARG	218,1 ± 7,52		210,7 ± 8,25		57,14 ± 5,74	
L-ARG+ β -CNF ₂₀₀	201,6 ± 5,35 [#]		197,2 ± 5,48 [#]		50,87 ± 5,39 [#]	
L-NAME	216,1 ± 7,90		204,5 ± 7,88		71,55 ± 4,98	
L-NAME+ β -CNF ₂₀₀	91,20 ± 3,11 [#]		77,18 ± 3,79 [#]		184,5 ± 6,42 [#]	
L-NOARG	221,4 ± 7,05		206,6 ± 6,84		69,27 ± 4,66	
L-NOARG+ β -CNF ₂₀₀	82,07 ± 3,15 [#]		70,4 ± 4,26 [#]		174,1 ± 8,99 [#]	
AZM	210,7 ± 7,87		201,6 ± 5,16		70,73 ± 4,37	
AZM+ β -CNF ₂₀₀	90,25 ± 4,59 [#]		81,4 ± 2,26 [#]		185,4 ± 7,65 [#]	

Os resultados representam a média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%)

(*one way ANOVA* e Neuman-Keuls como *post hoc teste*). [#] $p < 0,05$ em relação β -CNF (200 mg/kg) (*Two-way ANOVA* e Neuman-Keuls como *post hoc teste*). Bicuculina 2 mg/kg (BIC), Ketanserina 2 mg/kg (KTS), Ondansetrona 1 mg/kg (ODN). L-arginina 750 mg/kg (L-ARG), Éster metílico de N-nitro-L-arginina 10 mg/kg (L-NAME), N^G-nitro-L-arginina 2 mg/kg (L-NOARG), azul de metileno 7 mg/kg (AZM).

Figura 7: Resultados da atividade anticonvulsivante do β -cariofileno (β -CNF) e diazepam (DZP) nos modelos de crises epilépticas induzido por pilocarpina (A e B), pentilenotetrazol (D e E) e isoniazida (G e H).



Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*one way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Latência para primeira convulsão (LPC) e latência para morte (LPM).

Nos resultados descritos na **Tabela 4**, a análise *two-way* ANOVA demonstrou que o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com o flumazenil ou bicuculina reverteu o aumento na latência para a primeira convulsão e na latência para a morte nos modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida ($p < 0,05$). Por outro lado, o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com a ketanserina ou ondansetrona não produziu qualquer alteração significativa na latência para a primeira convulsão e na latência para a morte em todos os modelos de estudo quando comparado com os grupos de animais tratados somente com β -CNF (200 mg/kg) ($p > 0,05$). Adicionalmente, o resultado da **Tabela 4** destaca que o pré-tratamento com L-arginina anulou significativamente a atividade anticonvulsivante do β -CNF nos modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida ($p < 0,05$). Diferentemente do que foi observado no grupo de animais pré-tratados com L-arginina, a análise *two-way* ANOVA na **Tabela 4** evidenciou que o pré-tratamento do β -CNF (200 mg/kg) com L-NAME, L-NOARG ou azul de metileno induziu efeito sinérgico significativo na latência para a primeira convulsão e na latência para a morte em todos os modelos de estudo quando comparado ao grupo de animais tratados somente com β -CNF (200 mg/kg) ($p < 0,05$). Os grupos de animais tratados individualmente com flumazenil, bicuculina, ketanserina, ondansetrona, L-arginina, L-NAME, L-NOARG e azul de metileno não apresentaram alterações significativas nos resultados descritos na **Tabela 4** ($p > 0,05$).

Tabela 4: Resultados das modulações neuromoleculares do β -cariofileno (β -CNF) na atividade anticonvulsivante nos modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida.

Tratamentos	Modelos de crises epiléticas								
	Pilocarpina			Pentilenotetrazol			Isoniazida		
	LPC (s)	LPM (s)	LPC (s)	LPC (s)	LPM (s)	LPC (s)	LPC (s)	LPM (s)	
CN	431,2 ± 30,72	472,8 ± 28,15	25,50 ± 3,14	191,9 ± 19,98	1630 ± 56,35	2348 ± 76,54			
β -CNF ₂₀₀	718,7 ± 42,16*	890,2 ± 44,98*	83,65 ± 4,71*	631,9 ± 59,03*	2385 ± 73,83*	3500 ± 119,2*			
FLU	433,7 ± 19,55	474,5 ± 23,69	32,55 ± 1,84	155,2 ± 12,03	1719 ± 57,32	2370 ± 58,70			
FLU+ β -CNF ₂₀₀	448,1 ± 25,93 [#]	683,1 ± 33,60 [#]	47,18 ± 3,23 [#]	270,2 ± 23,24 [#]	1975 ± 100,6 [#]	2705 ± 115,5 [#]			
BIC	439,4 ± 14,62	498,4 ± 16,63	34,38 ± 4,65	190,4 ± 17,01	1722 ± 54,60	2505 ± 87,62			
BIC+ β -CNF ₂₀₀	452,3 ± 37,06 [#]	571,1 ± 32,19 [#]	43,50 ± 4,53 [#]	330,4 ± 35,13 [#]	1886 ± 95,47 [#]	2635 ± 126,7 [#]			
KTS	387,1 ± 20,97	488,4 ± 13,75	22,13 ± 3,25	189,2 ± 20,26	1768 ± 60,19	2291 ± 68,66			
KTS+ β -CNF ₂₀₀	753,7 ± 51,66	921,6 ± 49,24	79,73 ± 4,38	626,3 ± 51,21	2565 ± 106,2	3656 ± 93,69			
ODN	446,1 ± 34,67	488,4 ± 13,75	21,08 ± 3,02	185,0 ± 12,02	1665 ± 79,98	2385 ± 80,00			
ODN+ β -CNF ₂₀₀	683,5 ± 48,84	807,5 ± 53,55	83,25 ± 5,62	611,6 ± 38,90	2340 ± 96,88	3578 ± 116,0			
L-ARG	442,5 ± 17,73	510,2 ± 17,43	31,75 ± 3,80	206,0 ± 13,21	1680 ± 80,18	2498 ± 103,3			
L-ARG+ β -CNF ₂₀₀	440,0 ± 18,95 [#]	567,5 ± 34,68 [#]	39,50 ± 3,00 [#]	238,7 ± 22,34 [#]	1868 ± 82,11 [#]	2700 ± 87,34 [#]			
L-NAME	430,3 ± 24,34	517,5 ± 26,97	36,39 ± 3,00	201,7 ± 25,95	1788 ± 78,51	2625 ± 114,4			
L-NAME+ β -CNF ₂₀₀	840,1 ± 25,30 [#]	1072,1 ± 58,7 [#]	194,7 ± 15,08 [#]	1015 ± 75,43 [#]	3083 ± 110,5 [#]	4365 ± 89,62 [#]			
L-NOARG	428,9 ± 14,69	518,3 ± 24,08	35,25 ± 4,55	195,8 ± 17,11	1703 ± 69,84	2565 ± 129,2			
L-NOARG+ β -CNF ₂₀₀	815,8 ± 21,57 [#]	1005,0 ± 43,8 [#]	175,5 ± 18,65 [#]	960,6 ± 50,55 [#]	3291 ± 93,51 [#]	4722 ± 139,0 [#]			
AZM	432,8 ± 10,97	501,1 ± 14,22	34,75 ± 4,44	208,2 ± 25,72	1860 ± 66,12	2400 ± 82,55			
AZM+ β -CNF ₂₀₀	819,4 ± 27,41 [#]	1012 ± 48,74 [#]	151,8 ± 13,12 [#]	881,1 ± 42,39 [#]	2919 ± 91,89 [#]	4136 ± 88,22 [#]			

Os resultados representam a média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo - CN (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). [#] $p < 0,05$ em relação β -CNF (200 mg/kg) (Two-way ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Bicuculina 2 mg/kg (BIC), Ketanserina 4 mg/kg (KTS), Ondansetrona 1 mg/kg (ODN). L-arginina 750 mg/kg (L-ARG), Éster metílico de N-nitro-L-arginina 20 mg/kg (L-NAME), N^G-nitro-L-arginina 2 mg/kg (L-NOARG), Azul de metileno 7 mg/kg (AZM).

DISCUSSÃO

Um dos objetivos do presente estudo foi demonstrar o efeito comportamental ansiolítico do β -CNF em camundongos *Swiss* fêmeas, bem como investigar os mecanismos moleculares subjacentes aos resultados obtidos. A administração aguda por via oral do β -CNF (100-400 mg/kg) apresentou efeito ansiolítico no teste de labirinto em cruz elevado conforme evidenciado pelo aumento da porcentagem de entradas e do tempo gasto nos braços abertos. Os resultados farmacológicos estão conforme os estudos de Bahi et al. (2014) e Galdino et al. (2012) em que o tratamento de camundongos *Swiss* machos com β -CNF (50-100 mg/kg, i.p.) induz efeito ansiolítico no teste de labirinto em cruz elevado. Adicionalmente e semelhante aos resultados do diazepam, os grupos de animais tratados com β -CNF (200-400 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no comportamento semelhante ao da ansiedade conforme observado pela menor porcentagem de entrada e do tempo nos braços fechados.

No teste da alimentação suprimida pela novidade, os grupos de animais que são desprovidos de alimento passam por um conflito inicial entre aproximar e consumir o alimento e a aversão de consumir o alimento em um novo ambiente sem proteção. Conforme Pará (1994), um efeito comportamental nessas condições de conflito pode ser modulado pelo nível de ansiedade dos grupos de animais e a latência para começar a alimentação pode ser usada como uma indicação do nível de ansiedade (SANTARELLI et al., 2003). A latência para iniciar a alimentação pode ser afetada inicialmente por pelo menos quatro tipos de decisão. Na primeira decisão, a escolha dos animais pode ser o deslocamento das paredes e entrar na área central do campo aberto. Caso não ocorra esse deslocamento em um novo ambiente, os animais tendem a permanecer em áreas de proteção como as paredes do campo aberto e apresentar o comportamento de tigmotaxia (SIMON et al., 1994; TREIT; FUNDYTUS, 1988). Em uma segunda decisão, os animais devem decidir ficar parado próximo ao alimento para o comportamento de exploração. Na terceira decisão, mesmo perto do alimento, os animais ainda precisam de um tempo para iniciar a explorar o alimento e seus arredores antes de começar a consumir. Nesse procedimento comportamental, os animais podem decidir se distanciar do alimento. Em contraste a terceira decisão, na quarta decisão, os animais podem decidir pelo início de comer o alimento. Os resultados da **Figura 5** destacam uma redução significativa na latência para iniciar o consumo do alimento quando comparado com o grupo controle, indicando que o tratamento agudo com β -CNF (200-400 mg/kg) pode proporcionar aos grupos de animais a tomar uma decisão final sobre a ingestão do alimento no centro do campo aberto. Adicionalmente, a quantidade de alimento consumida durante o período de avaliação foi

determinada para cada grupo de animal e os resultados obtidos destacam que a redução na latência no teste da alimentação suprimida pela novidade não está relacionada com o aumento do apetite nos grupos de animais tratados com β -CNF. O teste do campo aberto foi realizado para demonstrar a atividade locomotora espontânea, comportamentos exploratórios e respostas emocionais dos camundongos *Swiss* fêmeas em um novo ambiente, sendo que o comportamento semelhante ao da ansiedade denominado de tigmotaxia é observado pela diminuição de exploração da área central e com tendência de permanecerem perto de superfícies verticais (SIMON et al., 1994). Os animais tratados com β -CNF não exibiram alterações significativas no número total de cruzamentos, sendo esses resultados consistentes com estudo de Oliveira et al. (2018). No entanto, o β -CNF (200-400 mg/kg) induziu um aumento no número de cruzamentos na área central exercendo efeito comportamental semelhante aos ansiolíticos. Além de diminuir a tigmotaxia, o β -CNF não comprometeu a coordenação motora conforme já demonstrado por Oliveira et al. (2018) em camundongos *Swiss* fêmeas.

No presente estudo, para demonstrar uma atividade comportamental semelhante aos antidepressivos, vários grupos de camundongos *Swiss* fêmeas foram tratados por via oral com β -CNF e submetidos ao teste da suspensão pela cauda e nado forçado. Em ambos os testes comportamentais, a administração aguda do β -CNF reduziu significativamente o tempo de imobilidade semelhante à imipramina e os resultados descritos na **Figura 6** estão conforme demonstrado pelo estudo de Bahi et al. (2014) em camundongos *Swiss* machos, o que pode sugerir que o comportamento antidepressivo após o tratamento com β -CNF ocorre independentemente da diferença de sexo. Adicionalmente, os efeitos anti-imobilidade do β -CNF no teste da suspensão pela cauda e nado forçado não estão relacionados com alterações na atividade locomotora conforme os resultados do teste do campo aberto. Para verificar outro parâmetro do efeito antidepressivo do β -CNF, o comportamento de autolimpeza (*groomings*) foi avaliado no teste de borrifagem de sacarose. Nesse teste, o tempo dedicado ao *grooming* pode compreender aspectos de autocuidado e comportamento motivacional, sendo que a ausência do autocuidado pode ser verificada em seres humanos com transtornos depressivos (American Psychiatric Association - APA, 2013). No presente estudo, em conformidade com o comportamento antidepressivo no teste da suspensão pela cauda e nado forçado, a administração aguda do β -CNF (200-400 mg/kg) fez com os grupos de animais apresentassem uma maior duração e frequência de *grooming*, evitando assim comportamento anedônico. Embora os testes da suspensão pela cauda e nado forçado possam prever o potencial antidepressivo do β -CNF, o uso de outros modelos animais como bulbectomia olfatória, estresse leve crônico (CMS), hipofagia induzida pela novidade e estresse causado pela derrota

social podem fornecer uma maior validade nos resultados antidepressivo do β -CNF. Além disso, uma vez que os mecanismos que podem justificar os efeitos anti-imobilidade do β -CNF ainda são poucos explorados, o presente estudo destaca uma importante contribuição para a compreensão das vias moleculares através dos quais o β -CNF induz efeito comportamental antidepressivo.

Apesar dos poucos estudos prévios, o uso de modelos animais pode contribuir significativamente na compreensão da atividade anticonvulsivante do β -CNF. Conforme o estudo de Oliveira et al. (2016), o β -CNF (100 mg/kg, i.p.) aumentou a latência para crises generalizadas do tipo mioclônicas induzidas por pentilenotetrazol (60 mg/kg, i.p.). Similarmente, os resultados da **Figura 7** confirmaram que a atividade anticonvulsivante do β -CNF (200-400 mg/kg, v.o.) resultou no aumento da latência para convulsões do tipo tônico-clônicas induzidas por pentilenotetrazol (100 mg/kg, i.p.), bem como a latência para a morte. Diferentemente do pentilenotetrazol (PTZ) que induz convulsões pelo bloqueio do canal de Cl⁻ do complexo do receptor GABA_A, a pilocarpina desencadeia convulsões principalmente pela ativação de receptores muscarínicos do subtipo M1 no sistema nervoso central, sendo que as convulsões são mantidas pela ativação do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (VEZZANI, 2009).

O uso do modelo experimental pela administração de pilocarpina reproduz as principais características da epilepsia do lobo temporal em humanos (AUVIN et al., 2017). No presente estudo, em geral, o tratamento com β -CNF (200-400 mg/kg, v.o.) prolongou a latência das convulsões do tipo tônico-clônicas e o tempo para a morte dos animais em tratamento. Similarmente, o β -CNF aumentou a latência das convulsões e o tempo para a morte no modelo animal da isoniazida que induz estimulação excessiva do sistema nervoso central e convulsões pela depleção da reserva celular de piridoxal-5-fosfato, o que resulta na diminuição dos níveis de GABA (VELÍŠKOVÁ; SHAKARJIAN; VELÍŠEK, 2017). Apesar do β -CNF interferir na patogênese das convulsões em ambos os modelos animais, apenas o diazepam protegeu contra a morte considerando a ocorrência das convulsões induzidas. Para destacar ainda mais a atividade anticonvulsivante do β -CNF conforme estudos anteriores, Liu et al. (2015) também testou um outro modelo animal de convulsão pela administração de ácido caínico, que é um agonista dos receptores de glutamato usado para reproduzir as características neuropatológicas da epilepsia do lobo temporal em humanos. Nesse estudo não foi determinado a latência das convulsões e o tempo de morte, mas o tratamento de camundongos (não determinou o sexo) por dois dias com β -CNF (30-60 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente a frequência das convulsões, bem como quantidade de animais mortos.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório que reduz a excitabilidade neural no sistema nervoso central de mamíferos pela atuação principalmente dos receptores ionotrópicos GABA_A, cujas subunidades apresentam diferentes isoformas [α (1-6), β (1-4), γ (1-3), δ , ε , θ , π e ρ (1-3)] com predomínio da isoforma composta por duas subunidades α_1 , duas β_2 e uma γ_2 ($\alpha_1\gamma_2\beta_2\alpha_1\beta_2$) (WONGSAMITKUL et al., 2017). Ansiedade, epilepsia, dor e depressão podem estar associados com a baixa função do sistema GABAérgico no cérebro, sendo que os compostos que aumentam a neurotransmissão GABAérgica (ex: moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A) podem apresentar propriedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, analgésicas e antidepressivas (CRYAN et al., 2010; OLSEN, 2012). Conforme evidenciado no presente estudo, as propriedades ansiolíticas e anticonvulsivantes do β -CNF, mas não antidepressivo, podem possivelmente envolver os receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, uma vez que o pré-tratamento do β -CNF com flumazenil (reconhecido antagonista do receptor benzodiazepínico) ou bicuculina (antagonista do receptor GABA_A) reestabeleceu os parâmetro de ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado e no teste da alimentação suprimida pela novidade, bem como a latência para a primeira convulsão e morte nos modelos de crises epiléticas induzido por pilocarpina ou pentilenotetrazol.

Adicionalmente, a neuroatividade do β -CNF pela modulação sináptica dos receptores GABA_A contendo as subunidades $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ expresso em linhagens celulares (HEK293) foi demonstrado por Kessler et al. (2014), sendo que nesse estudo pode destacar que a ação moduladora dos receptores GABA_A é independente da presença da subunidade γ_2 . Nos receptores GABA_A, a subunidade γ_2 é um alvo molecular importante para a ligação dos benzodiazepínicos entre a subunidade α_1 e γ_2 como o diazepam, que tem propriedades anticonvulsivantes conforme demonstrado na **Figura 7**. Similarmente aos resultados da **Figura 7**, Oliveira et al. (2016) demonstrou que a administração intraperitoneal do β -CNF aumentou a latência para o início das convulsões mioclônicas induzidas por pentilenotetrazol.

Dados obtidos por Bahi et al. (2014) demonstraram que um tratamento prévio com o antagonista (AM-630) do receptor canabinoide do tipo (CB₂) teve a capacidade reverter as propriedades ansiolíticas e antidepressivas do β -CNF (i.p.). Especificamente, tem sido verificado que β -CNF melhora a funcionalidade do receptor CB₂ que é expresso principalmente nos tecidos periféricos, mas que pode ser encontrado no sistema nervoso central com função moduladora da excitabilidade neuronal e inflamação (GARCÍA et al., 2015; JAVED et al., 2016; BENTO et al., 2011). Os efeitos moleculares dos receptores de canabinoide ocorrem em diferentes populações neuronais e apesar da falta de maiores detalhes, podem afetar a ação de neurotransmissores como GABA, dopamina, glutamato e serotonina (SIEGHART, 2015;

ZHANG et al., 2014). O fato das propriedades ansiolíticas do β -CNF envolver o receptor canabinoide do tipo 2 conforme demonstrado por Bahi et al. (2014) e os receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos conforme demonstrado no presente estudo, pode sugerir a existência de uma complexa interação ainda não compreendida, sendo uma investigação farmacológica para futuros estudos, entre o sistema endocanabinoide e GABAérgico na modulação da atividade neurocomportamental do β -CNF. Adicionalmente, foi verificado que a administração em roedores de quimioconvulsivantes como a pilocarpina, pentilenotetrazol ou ácido cáinico aumentaram os níveis dos transmissores do sistema endocanabinoide como forma proteção contra os danos excitotóxicos (WALLACE et al., 2002; WALLACE et al., 2003; MAZARATI, 2006). Nessas condições e embora não foi pesquisada ainda, é possível especular que o β -CNF pode atuar reduzindo a vulnerabilidade excitatória induzido por quimioconvulsivantes pela sua ação como agonista do receptor CB₂ e moduladora do receptor GABA_A.

A interação do 5-HT (5-hidroxitriptamina) com receptores serotoninérgicos em regiões do cérebro como o hipocampo exerce um papel essencial na regulação da atividade neuronal e possivelmente estão envolvidos no mecanismo de ação de substâncias que são usadas para tratar ansiedade e depressão. Dependendo do subtipo de receptor envolvido na neurofarmacologia, o 5-HT pode aumentar ou reduzir o comportamento semelhante à ansiedade e depressão (RAMIREZ-MAHALUF; COMPTE, 2018). O NAN-190 é um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A} com ação farmacológica bem caracterizada na neurofarmacologia e que foi utilizado no estudo de Galdino et al. (2012) para demonstrar que o efeito ansiolítico do β -CNF no teste de labirinto em cruz elevado pode não ser mediado pelo receptor 5-HT_{1A}. Similarmente, o presente estudo demonstrou que as propriedades ansiolíticas (**Tabela 1 e 2**), antidepressivas (**Tabela 3**) e anticonvulsivantes (**Tabela 4**) do β -CNF não foram bloqueadas pelo antagonista de receptor 5-HT_{2A} (ketanserina) ou antagonista de receptor 5-HT₃ (ondansetrona). Assim, esses resultados sugerem possivelmente que os receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT₃ não estão envolvidos na modulação farmacológica do β -CNF, sendo que resultados semelhantes para o β -CNF em camundongos *Swiss* machos foram verificados por Danillo et al. (2018) no teste da suspensão pela cauda e nado forçado usando o NAN-190 como antagonista. Entretanto, na comparação com outros trabalhos que avaliaram um sesquiterpeno bicíclico, Gonçalves et al. (2012) demonstrou que os efeitos anti-imobilidade de podoandina (10 mg/kg, intraperitoneal) foram bloqueados pelo pré-tratamento com NAN-190 ou ondansetrona no teste do nado forçado. No entanto, a ketanserina não reverteu os efeitos anti-imobilidade.

O óxido nítrico (NO) desempenha atividade neuroquímica com a capacidade de influenciar e modular outros neurotransmissores que podem desempenhar uma ação importante na ansiedade, epilepsia e depressão (HU et al., 2014). No presente estudo, a elucidação do possível envolvimento molecular da via L-arginina-óxido nítrico na modulação das propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes foi avaliada para possibilitar o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica do β -CNF. No presente estudo é possível supor que as propriedades farmacológicas do β -CNF dependem da inibição da síntese de óxido nítrico uma vez que o pré-tratamento com L-arginina reverteu significativamente os resultados ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivantes. Para confirmar essa suposição, uma dose subefetiva de L-NAME (inibidor inespecífico de NOS), L-NOARG (inibidor da NOS) ou azul de metileno (inibidor de NOS e da guanilato ciclase solúvel) foi administrado em combinação com o β -CNF (200 mg/kg) e os resultados obtidos mostraram um efeito sinérgico nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes. Em concordância com os resultados do presente estudo, a atividade neuroprotetora do β -CNF contra oligômeros de $A\beta_{1-42}$ em micróglia demonstrado no estudo de Hu et al. (2017) reduziu a produção de óxido nítrico pela supressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Similarmente, Chang et al. (2013) sugeriu que as atividades neuroprotetoras do β -CNF (10 mg/kg, i.p.) contra diminuição da atividade neurológica causado pelo MCAO (oclusão transitória da artéria cerebral média/Ratos machos *Sprague Dawley*) podem estar associadas com uma redução do nível de óxido nítrico pela supressão da iNOS.

Na sinalização do óxido nítrico, a família de enzimas designadas por óxido nítrico sintase (NOS) oxida a L-arginina para produzir NO que modula via monofosfato de guanosina cíclico (GMP cíclico)/Proteína quinase dependente de GMPc (PKG) a liberação de neurotransmissores como GABA em várias partes do cérebro como o córtex pré-frontal, locus coeruleus e hipocampo (HU et al., 2014). Em estudos não clínicos, a neurotransmissão GABAérgica pode ser modulada pelo óxido nítrico como consequência da ativação do receptor de glutamato (glutamato-óxido nítrico - GMP cíclico) e diferentes mecanismos têm sido propostos na relação entre NO e GABA como a estimulação direta da exocitose do GABA pelo NO, bem como o GABA poderia ser liberado também pelo mecanismo de reversão do transportador de GABA (WANG et al., 2006; OHKUMA et al., 1996). É importante destacar que a modulação da transmissão GABAérgica não vesicular pelo NO pode influenciar no nível de inibição tônica e assim desempenhe uma atividade crucial no controle da excitabilidade cerebral (WU et al., 2007; TARASENKO et al., 2014). Além disso, a relação funcional entre NO e GABA tem sido proposto pela atividade do diazepam (agonista do receptor $GABA_A$) de

regular a atividade da NOS que resulta em determinados níveis do óxido nítrico (PAUL et al., 2001). Assim, é possível sugerir que o NO está envolvido nos mecanismos moleculares da transmissão GABAérgica em estudos de tratamentos farmacológicos para ansiedade e epilepsia.

As tradicionais abordagens farmacológicas para o tratamento de doenças neurológicas como depressão, ansiedade e epilepsia podem apresentar vários efeitos colaterais, problemas de tolerabilidade e desvantagens farmacocinéticas que podem tornar a sua utilização problemática (CHEN et al., 2017; ELGER et al., 2017). No estudo de Oliveira et al. (2018) foi demonstrado que uma alta dose do β -CNF (300-2000 mg/kg, v.o.) não causa qualquer efeito neurocomportamental adverso quando camundongos *Swiss* fêmeas foram submetidos ao estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas, bem como alterações que indicassem toxicidade no peso corporal e dos órgãos internos, consumo de alimento e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em conjunto com os experimentos que demonstraram um amplo potencial terapêutico (SHARMA et al., 2016) e ausência de toxicidade subcrônica (SCHMITT et al., 2016), o presente estudo reforça que a utilização do β -cariofileno encontrados em vegetais pode conferir potenciais benefícios a saúde sem apresentar indícios de neurotoxicidade. Adicionalmente, o β -CNF apresenta várias características (baixo peso molecular e lipofilicidade) que proporcionam atravessar as membranas celulares e a barreira hematoencefálica conforme demonstrado em estudos anteriores (MURATA et al., 2015; TIAN et al., 2016). Essa propriedade de permeabilidade foi sugerida no presente estudo pelo valor do C log P que foi de 6,45, 2,96 e 4,69 para o β -CNF, diazepam e imipramina.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos fornecem um suporte adicional na compreensão dos mecanismos neuromoleculares subjacentes às propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes em camundongos *Swiss* fêmeas do β -CNF. Esses resultados são importantes por que ajudam a entender as ações neurofarmacológicas do β -CNF que podem envolver os receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos ou via L-arginina-óxido nítrico. Adicionalmente, os resultados obtidos sugerem que os receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{2A} e 5-HT₃ não estão envolvidos nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes do β -CNF.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; DA COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.

AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; BAH, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice.

Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 124, n. 0, p. 260-268, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.)*. Washington, DC: Author. American Psychiatric Association.

ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C.; DE BEM, A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 279, n. 0, p. 220-231, 2014.

AUVIN, S.; NEHLIG, A. Chapter 38 - Models of Seizures and Status Epilepticus Early in Life A2 - Pitkänen, Asla. In: BUCKMASTER, P. S.; GALANOPOULOU, A. S., *et al* (Ed.). **Models of Seizures and Epilepsy (Second edition)**: Academic Press, 2017. p.569-586.

BAHI, A.; AL MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; OJHA, S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, n. 0, p. 119-124, 2014.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; DOLESKI, P. H.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-9, 2016.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 50-58, 2016.

BENTO, A. F.; MARCON, R.; DUTRA, R. C.; CLAUDINO, R. F.; COLA, M.; PEREIRA LEITE, D. F.; CALIXTO, J. B. β -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR γ Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153-1166, 2011.

BOHLEN, M.; CAMERON, A.; METTEN, P.; CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 178, n. 1, p. 10-14, 2009.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução normativa Nº 30, de 2 de fevereiro de 2016: Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA, 2016. 50 p.

BUCHBAUER, G.; ILIC, A. Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. In: RAMAWAT, K. G. e MÉRILLON, J.M. (Ed.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.4109-4159.

BRUENIG, D. et al. Nitric oxide pathway genes (NOS1AP and NOS1) are involved in PTSD severity, depression, anxiety, stress and resilience. **Gene**, v. 625, p. 42-48, 2017.

CHANG, H.J.; KIM, J.M.; LEE, J.C.; KIM, W.K.; CHUN, H. S. Protective Effect of β -Caryophyllene, a Natural Bicyclic Sesquiterpene, Against Cerebral Ischemic Injury. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 6, p. 471-480, 2013.

CHEN, B.; CHOI, H.; HIRSCH, L. J.; KATZ, A.; LEGGE, A.; BUCHSBAUM, R.; DETYNIĘCKI, K. Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 76, p. 24-31, 2017.

CHENG, Y.; DONG, Z.; LIU, S. β -Caryophyllene Ameliorates the Alzheimer-Like Phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 Receptor Activation and the PPAR α Pathway. **Pharmacology**, v. 94, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

CHRISTMAS, A. J.; MAXWELL, D. R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. **Neuropharmacology**, v. 9, n. 1, p. 17-29, 1970.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. GABAB Receptors and Depression: Current Status. In: BLACKBURN, T. P. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, v.58, 2010. p.427-451.

DANILLO RAMOS, O.; DAYANE MOREIRA, S.; IZIARA FERREIRA, F.; ADRIANE DE, B.; JAMES OLUWAGBAMIGBE, F.; DAIANY PRISCILLA BUENO, S.; FABIO DA, R.; ELSON ALVES, C.; PABLINNY GALDINO DE, C. Monoamine Involvement in the Antidepressant-Like Effect of β -Caryophyllene. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 17, p. 1-12, 2018.

DEACON, R. M. J. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. **Nature Protocols**, v. 1, p. 122, 2006.

DIAS, D. D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; DE SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA JR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, n. 0, p. 79-84, 2012.

DONATO, F.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; FILHO, C. B.; DEL FABBRO, L.; ANTUNES, M. S.; SOUZA, L. C.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: Possible role of l-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels. **Brain Research Bulletin**, v. 104, p. 19-26, 2014.

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

ELGER, C. E.; JOHNSTON, S. A.; HOPPE, C. Diagnosing and treating depression in epilepsy. **Seizure**, v. 44, p. 184-193, 2017.

FONTES, L. B. A.; DIAS, D. D. S.; AARESTRUP, B. J. V.; AARESTRUP, F. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; CORRÊA, J. O. D. A. β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 257-264, 2017.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; FLORENTINO, I. F.; LINO, R. C.; FAJEMIROYE, J. O.; CHAIBUB, B. A.; DE PAULA, J. R.; DE LIMA, T. C. M.; COSTA, E. A. 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.

GARCÍA, M. C.; CINQUINA, V.; PALOMO-GARO, C.; RÁBANO, A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 587, p. 1-4, 2015.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GONÇALVES, A. E.; BÜRGER, C.; AMOAH, S. K. S.; TOLARDO, R.; BIAVATTI, M. W.; DE SOUZA, M. M. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 2, p. 307-314, 2012.

HALL, C.; BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, p. 1-12, 1932.

HU, Y.; ZENG, Z.; WANG, B.; GUO, S. Trans-caryophyllene inhibits amyloid β ($A\beta$) oligomer-induced neuroinflammation in BV-2 microglial cells. **International Immunopharmacology**, v. 51, p. 91-98, 2017.

HU, Y.; ZHU, D.-Y. Chapter Six - Hippocampus and Nitric Oxide. In: LITWACK, G. (Ed.). **Vitamins & Hormones**: Academic Press, v.96, 2014. p.127-160.

JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; HAQUE, M. E.; OJHA, S. K. Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 321, 2016.

KAMIKUBO, R.; KAI, K.; TSUJI-NAITO, K.; AKAGAWA, M. β -Caryophyllene attenuates palmitate-induced lipid accumulation through AMPK signaling by activating CB2 receptor in human HepG2 hepatocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 10, p. 2228-2242, 2016.

KESSLER, A.; SAHIN-NADEEM, H.; LUMMIS, S. C. R.; WEIGEL, I.; PISCHETSRIEDER, M.; BUETTNER, A.; VILLMANN, C. GABA(A) receptor modulation

by terpenoids from *Sideritis* extracts. **Molecular Nutrition & Food Research**, Oxford, UK, v. 58, n. 4, p. 851-862, 2014.

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T.; LIU, F.; ZHUANG, K.; LUO, K.; YANG, L. Neuroprotective Effects of Trans-Caryophyllene Against Kainic Acid Induced Seizure Activity and Oxidative Stress in Mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; MACHADO, K. C.; ISLAM, M. T.; JUNIOR, A. L. G.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273-279, 2015.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 42-53, 2012.

MURATA, K.; MATSUMURA, S.; YOSHIOKA, Y.; UENO, Y.; MATSUDA, H. Screening of β -secretase and acetylcholinesterase inhibitors from plant resources. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 1, p. 123-129, 2015.

OHKUMA, S.; KATSURA, M.; CHEN, D.-Z.; NARIHARA, H.; KURIYAMA, K. Nitric oxide-evoked [3H] γ -aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms. **Molecular Brain Research**, v. 36, n. 1, p. 137-144, 1996.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; HAQUE, M. E. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 418, n. 1, p. 59-70, 2016.

OLIVEIRA, C. C. D.; OLIVEIRA, C. V. D.; GRIGOLETTO, J.; RIBEIRO, L. R.; FUNCK, V. R.; GRAUNCKE, A. C. B.; SOUZA, T. L. D.; SOUTO, N. S.; FURIAN, A. F.; MENEZES, I. R. A.; OLIVEIRA, M. S. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, p. 26-31, 2016.

OLIVEIRA, G. L. D. S.; MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; DA SILVA, A. P. D. S. C. L.; FEITOSA, C. M.; DE CASTRO ALMEIDA, F. R. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female *Swiss* mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 338-346, 2018.

OLSEN, R. W.; LI, G.-D. Chapter 18 - GABA A2 - Brady, Scott T. In: SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W., *et al* (Ed.). **Basic Neurochemistry (Eighth Edition)**. New York: Academic Press, 2012. p.367-376.

PARÉ, W. P. Hyponeophagia in Wistar Kyoto (WKY) Rats. **Physiology & Behavior**, v. 55, n. 5, p. 975-978, 1994.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

PAUL, V.; SUBRAMANIAN, E. H.; RAJASEKARAN, K. Pharmacological evidence for a role of γ -aminobutyric acid A receptor mechanism in modulating nitric oxide synthase activity in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 3, p. 209-211, 2001.

RAMIREZ-MAHALUF, J. P.; COMPTE, A. Chapter 2 - Serotonergic Modulation of Cognition in Prefrontal Cortical Circuits in Major Depression A2 - Anticevic, Alan. In: MURRAY, J. D. (Ed.). **Computational Psychiatry**: Academic Press, 2018. p.27-46.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805-809, 2003.

SARGINSON, J. E.; DEAKIN, J. F. W.; ANDERSON, I. M.; DOWNEY, D.; THOMAS, E.; ELLIOTT, R.; JUHASZ, G. Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS1) Polymorphisms Interact with Financial Hardship to Affect Depression Risk. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 2857, 2014.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 558-567, 2016.

SEGAT, G. C.; MANJAVACHI, M. N.; MATIAS, D. O.; PASSOS, G. F.; FREITAS, C. S.; COSTA, R.; CALIXTO, J. B. Antiallodynic effect of β -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Neuropharmacology**, v. 125, p. 207-219, 2017.

SELESTINO NETA, M. C.; VITTORAZZI, C.; GUIMARÃES, A. C.; MARTINS, J. D. L.; FRONZA, M.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 190-197, 2017.

SHARMA, C.; M. AL KAABI, J.; M. NURULAIN, S.; N. GOYAL, S.; AMJAD KAMAL, M.; OJHA, S. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 21, p. 3237-3264, 2016.

SIEGHART, W. Chapter Three - Allosteric Modulation of GABAA Receptors via Multiple Drug-Binding Sites. In: UWE, R. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, v. Volume 72, 2015. p.53-96.

SILVA, A. P. D. S. C. L.; OLIVEIRA, G. L. D. S.; MEDEIROS, S. C.; SOUSA, A. M. L.; LOPES, L. D. S.; DAVID, J. M.; JUNIOR, J. S. D. C.; DE FREITAS, R. M. Pre-clinical toxicology of garcinielliptone FC, a tautomeric pair of polyprenylated benzophenone, isolated from *Platonia insignis* Mart seeds. **Phytomedicine**, v. 23, n. 5, p. 477-482, 2016.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1994.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; MICO, J.-A.; LENEGRE, A.; STERU, M.; SIMON, P.; PORSOLT, R. D. The automated tail suspension test: A computerized device

which differentiates psychotropic drugs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. IN1-671, 1987.

TARASENKO, A.; KRUPKO, O.; HIMMELREICH, N. New insights into molecular mechanism(s) underlying the presynaptic action of nitric oxide on GABA release. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 6, p. 1923-1932, 2014.

TIAN, X.; PENG, J.; ZHONG, J.; YANG, M.; PANG, J.; LOU, J.; LI, M.; AN, R.; ZHANG, Q.; XU, L.; DONG, Z. β -Caryophyllene protects in vitro neurovascular unit against oxygen-glucose deprivation and re-oxygenation-induced injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 5, p. 757-768, 2016.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 959-962, 1988.

VELÍŠKOVÁ, J.; SHAKARJIAN, M. P.; VELÍŠEK, L. Chapter 34 - Systemic Chemoconvulsants Producing Acute Seizures in Adult Rodents. In: PITKÄNEN, A.;BUCKMASTER, P. S.;GALANOPOULOU, A. S. e MOSHÉ, S. L. (Ed.). **Models of Seizures and Epilepsy (Second Edition)**: Academic Press, 2017. p.491-512.

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, p. 322, 2007.

WALLACE, M. J.; MARTIN, B. R.; DELORENZO, R. J. Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. **European Journal of Pharmacology**, v. 452, n. 3, p. 295-301, 2002.

WALLACE, M. J.; BLAIR, R. E.; FALENSKI, K. W.; MARTIN, B. R.; DELORENZO, R. J. The Endogenous Cannabinoid System Regulates Seizure Frequency and Duration in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 1, p. 129-137, 2003.

WANG, S.; TESCHEMACHER, A. G.; PATON, J. F. R.; KASPAROV, S. Mechanism of nitric oxide action on inhibitory GABAergic signaling within the nucleus tractus solitarii. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1537-1539, 2006.

WANG, J.; HODES, G. E.; ZHANG, H.; ZHANG, S.; ZHAO, W.; GOLDEN, S. A.; BI, W.; MENARD, C.; KANA, V.; LEBOEUF, M.; XIE, M.; BREGMAN, D.; PFAU, M. L.; FLANIGAN, M. E.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; YEMUL, S.; SHARMA, A.; HO, L.; DIXON, R.; MERAD, M.; HAN, M.-H.; RUSSO, S. J.; PASINETTI, G. M. Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress in mice. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 477, 2018.

WONGSAMITKUL, N.; MALDIFASSI, M. C.; SIMEONE, X.; BAUR, R.; ERNST, M.; SIGEL, E. α subunits in GABAA receptors are dispensable for GABA and diazepam action. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15498, 2017.

WU, Y.; WANG, W.; DÍEZ-SAMPEDRO, A.; RICHERSON, G. B. Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. **Neuron**, v. 56, n. 5, p. 851-865, 2007.

YANG, G.; WU, P.; ZHOU, Z.; HE, X.; MENG, W.; ZHANG, Z. Direct Hydration of β -Caryophyllene. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 49, p. 15864-15871, 2012.

ZHANG, H.-Y.; GAO, M.; LIU, Q.-R.; BI, G.-H.; LI, X.; YANG, H.-J.; GARDNER, E. L.; WU, J.; XI, Z.-X. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 46, p. E5007, 2014.

ŻMUDZKA, E.; SAŁACIAK, K.; SAPA, J.; PYTKA, K. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life Sciences**, v. 210, p. 106-124, 2018.

Efeito antidepressivo do complexo de inclusão β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina em camundongos com depressão induzida por dor neuropática

Artigo será submetido: *European Polymer Journal*
Qualis B1

3

Efeito do tipo antidepressivo do complexo de inclusão do β -cariofileno (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina) em camundongos *Swiss* com depressão induzida por dor neuropática

O β -cariofileno [(β -humuleno ou (-)-trans-cariofileno)] é um sesquiterpeno bicíclico com várias características (baixa solubilidade aquosa, volatilidade e fácil oxidação quando exposto à luz e ao oxigênio) e atividades farmacológicas. Entre as abordagens para reverter algumas dessas características estão as complexações com ciclodextrinas que demonstram uma ampla aplicação nas pesquisas farmacológicas por melhorar a solubilidade e a estabilidade química. Assim, as ciclodextrinas como a β -ciclodextrina podem promover a liberação controlada do β -CNF por diferentes mecanismos como o aumento da solubilidade e estabilidade química. Com relação ao β -cariofileno, o presente estudo consistiu em determinar o efeito farmacológico do β -cariofileno livre e do seu complexo de inclusão (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina) em camundongos *Swiss* fêmeas com depressão induzido por dor neuropática (constricção crônica do nervo ciático). Nesse estudo, foram utilizados os testes do campo aberto, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose. Após o procedimento da constricção crônica do nervo ciático com o desenvolvimento da neuropatia, os grupos de animais avaliados com dor neuropática apresentaram comportamento semelhante à depressão pelo aumento do tempo total de imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado (superior a 300 segundos), bem como redução no tempo total e na frequência de groomings no teste de borrifagem de sacarose após 28 dias do procedimento cirúrgico quando comparado com os animais do grupo basal ($p < 0,05$). No entanto, os animais com dor neuropática que receberam o β -cariofileno livre (200 mg/kg) ou seu complexo de inclusão (β -CNF/M β CD 50 e 100 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado, bem como uma redução significativa no tempo total e na frequência de groomings quando comparado somente com animais com dor neuropática sem tratamento farmacológico ($p < 0,05$). Adicionalmente, foi observado que o β -cariofileno complexado (β -CNF/M β CD 100 mg/kg) foi mais efetivo no efeito antidepressivo com uma dose inferior ao β -CNF livre (200 mg/kg). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo destacam uma premissa interessante no uso do complexo de inclusão β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de dosagem oral com biodisponibilidade aumentada em propriedades antidepressivas.

Palavras-chave: β -cariofileno, complexo de inclusão, dor neuropática, sesquiterpeno bicíclico, metil- β -ciclodextrina.

INTRODUÇÃO

Diante de várias estimativas epidemiológicas da prevalência da dor neuropática, existem diferenças nos valores das estimativas que podem ser atribuídos as metodologias de avaliação e aos critérios usados para definir dor neuropática ou dor com características neuropáticas. Essas estimativas sugerem uma prevalência global que pode variar de aproximadamente 3% ou de 5% a 10 %, sendo que a qualidade de vida é amplamente prejudicada devido ao aumento da prescrição de medicamentos, redução da vida social, bem como a morbidade da dor em si (ATTAL; BOUHASSIRA; BARON, 2018; DOSENOVIC et al., 2018). Estudos epidemiológicos demonstraram que algumas doenças como ansiedade, depressão, esquizofrenia e até o suicídio são bem mais comuns entre as pessoas que sofrem de dor crônica do que na população em geral. Conforme a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor neuropática pode ser estabelecida como uma dor causada por uma lesão ou disfunção que afeta o sistema somatossensorial. Adicionalmente, conforme a localização anatômica da lesão ou doença do nervo no sistema nervoso central ou periférico, a dor neuropática pode ser classificada como central e periférica, respectivamente (BOUHASSIRA, 2018; KAMERMAN et al., 2015).

Uma das comorbidades mais comuns para os pacientes que sofrem de dor crônica consiste na depressão em que a longo prazo pode ser observado déficit cognitivo devido às alterações na integridade anatômica e funções das regiões cerebrais envolvidas na dor e no controle emocional (OKIFUJI; TURK, 2016; SENO et al., 2018). Vários estudos sobre abordagens terapêuticas com diferentes substâncias químicas para dor neuropática têm sido proposto, sendo que uma revisão sistemática e meta-análise com todos os medicamentos descritos desde 1966 destaca que a pregabalina (análogo do GABA), gabapentina (inibidor do GABA), duloxetina (um inibidor de recaptação de serotonina-noradrenalina) e vários antidepressivos tricíclicos podem ser importantes opções de tratamento de primeira linha para dor neuropática periférica e central (OBATA, 2017; ATTAL, 2018; KREMER et al., 2016). Apesar disso, essas substâncias não têm sido o suficiente para o controle da dor neuropática e a eficácia dos medicamentos antineuropáticos disponíveis apresentam várias limitações que podem ser atribuídos à ocorrência de efeitos colaterais e inadequado ou demorado alívio da dor. Assim, constantes estudos farmacológicos com produtos naturais visando o tratamento da dor neuropática ainda são necessários e os sesquiterpenos são metabólitos secundários encontrados em várias espécies de plantas que têm atraído um interesse significativo devido as suas

importantes propriedades farmacológicas (AWOUAFACK et al., 2013; BUCKLE, 2015; NUUTINEN, 2018).

O β -cariofileno [$(\beta$ -humuleno ou (-)-trans-cariofileno)] é um sesquiterpeno bicíclico que demonstrou efeito analgésico em modelos de dor neuropática e atividade comportamental semelhante aos antidepressivos (KLAUKE et al., 2014; SEGAT et al., 2017; SINGH et al., 2017). No entanto, o potencial farmacológico em modelo animal de depressão induzida por dor neuropática não tem sido investigado. O β -cariofileno é um hidrocarboneto volátil de estrutura incomum que pode ser usado como agente aromatizante e aditivo alimentar conforme aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA, *Code of Federal Regulations/n*º. 21CFR172.515). Esse composto que apresenta um anel ciclobuteno fundido em *trans* com um anel de nove membros está entre os majoritários sesquiterpenos encontrados em quantidades variáveis nos alimentos vegetais (GERTSCH et al., 2008; BUCHBAUER; ILIC, 2013; YANG et al., 2012).

Estudos farmacológicos não clínicos destacaram ausência de toxicidade em doses repetidas (OLIVEIRA et al., 2018) e atividades no tratamento da neuropatia periférica (SEGAT et al., 2017), alcoolismo (AL MANSOURI et al., 2014), doença hepática gordurosa não alcoólica (KAMIKUBO et al., 2016), aterosclerose hipercolesterolêmica (BALDISSERA et al., 2016), encefalomielite autoimune experimental (FONTES et al., 2017), hiperglicemia mediada pelo estresse oxidativo e inflamação (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016) e para o tratamento da ansiedade (BAHI et al., 2014). Adicionalmente, estudos neurofarmacológicos demonstraram potencial efeito na diminuição da excitotoxicidade mediada pelo glutamato (ASSIS et al., 2014), atividade anticonvulsivante contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol (OLIVEIRA et al., 2016), neuroproteção contra os efeitos tóxicos do peptídeo β -amiloide (CHENG et al., 2014) e pela inibição da neurodegeneração dopaminérgica e resposta neuroinflamatória (OJHA et al., 2016).

Conforme destacado no parágrafo anterior, o β -cariofileno apresenta um amplo potencial farmacológico mesmo considerando a sua baixa solubilidade em água, volatilidade e fácil oxidação quando exposto à luz e ao oxigênio. Essas características resultam em baixa biodisponibilidade do β -CNF. Entre as abordagens para reverter algumas dessas limitações estão as complexações com ciclodextrinas que demonstram uma ampla aplicação nas pesquisas farmacológicas por melhorar a solubilidade e a estabilidade da substância química. Assim, as ciclodextrinas como a β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina podem promover a liberação controlada do β -CNF por diferentes mecanismos como o aumento da solubilidade e estabilidade química (LIU et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

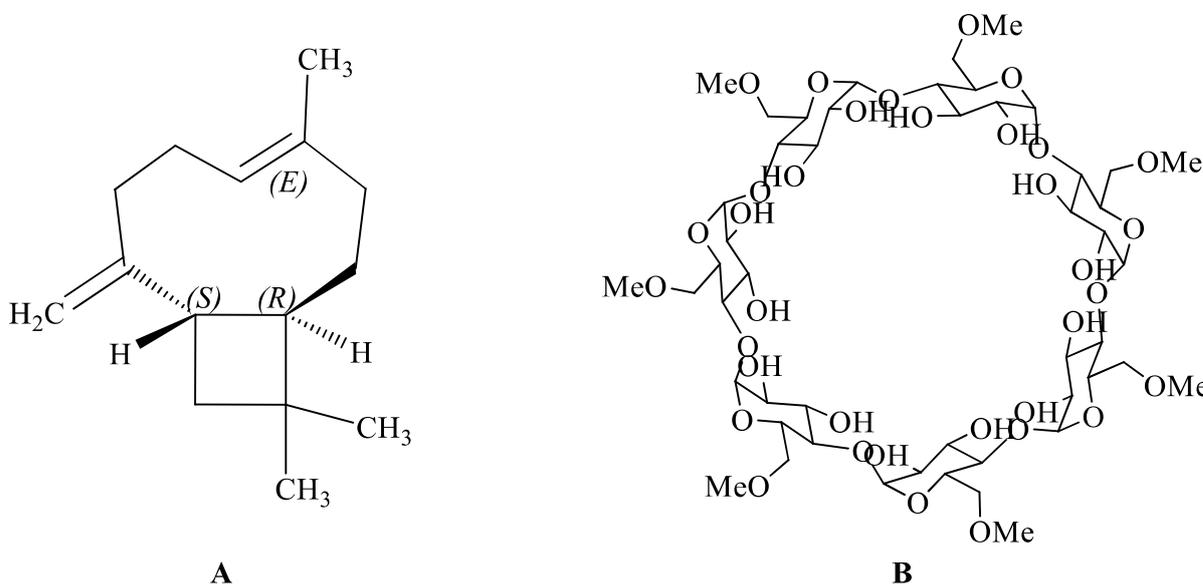
Assim, o propósito principal deste estudo consistiu em determinar o efeito farmacológico do β -cariofileno livre e do seu complexo de inclusão (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina) no modelo animal de depressão induzido por dor neuropática (constricção crônica do nervo ciático). Nesse estudo, serão utilizados o teste do campo aberto, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose.

MATERIAL E MÉTODOS

β -cariofileno e compostos químicos

O β -cariofileno [Formula molecular: $C_{15}H_{24}$, peso molecular: 204,36, CAS: 87-44-5; pureza $\geq 98,5\%$ (**Figura 1A**)], Tween 80, imipramina e metil- β -ciclodextrina (**Figura 1B**) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções dos compostos químicos utilizados no presente estudo foram preparadas e usados no dia dos experimentos.

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno [(1R,4E,9S)-4,11,11-trimetil-8-metilidenebicyclo[7.2.0]undec-4-eno] e da metil- β -ciclodextrina, respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

Preparação do complexo de inclusão do β -cariofileno com metil- β -ciclodextrina

O método de liofilização foi utilizado para obtenção do complexo de inclusão do β -cariofileno com metil- β -ciclodextrina (**Figura 1B**) após a preparação da mistura física. A mistura física entre o β -cariofileno e metil- β -ciclodextrina foi preparada num almofariz na

proporção molar 1:1 e usada como referência. O produto final obtido após a liofilização foi armazenado em vidro âmbar até a caracterização utilizando as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), espectroscopia de efeito nuclear de *Overhauser* (NOESY) e simulação de dinâmica molecular (MD). Todos esses procedimentos já foram descritos detalhadamente por Santos et al. (2017). O rendimento obtido para o complexo de inclusão do β -cariofileno foi de 66,22%.

Animais e condições experimentais

Os camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g) utilizados no presente estudo foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos em temperatura controlada (24 ± 1 °C) em ciclo de 12 horas claro/escuro (ligado as 9:00 e desligado 21:00 horas) e com livre acesso à água filtrada disponível em garrafas graduadas e comida (*pellets* de ração Purina). Todos os animais utilizados foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) com o máximo de cinco animais por gaiola e inicialmente aclimatados no Laboratório de farmacologia da dor (LAFDOR – Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM) por dez dias antes da realização dos experimentos. Todos os testes comportamentais foram realizados entre as 10:00 e 16:00 horas.

O máximo de esforço foi feito para minimizar tanto o sofrimento quanto o número de animais utilizados, sendo que cada experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI#012/15) e realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (BRASIL, 2016) e *U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals — PHS Policy*.

Grupos de animais de Tratamentos farmacológicos

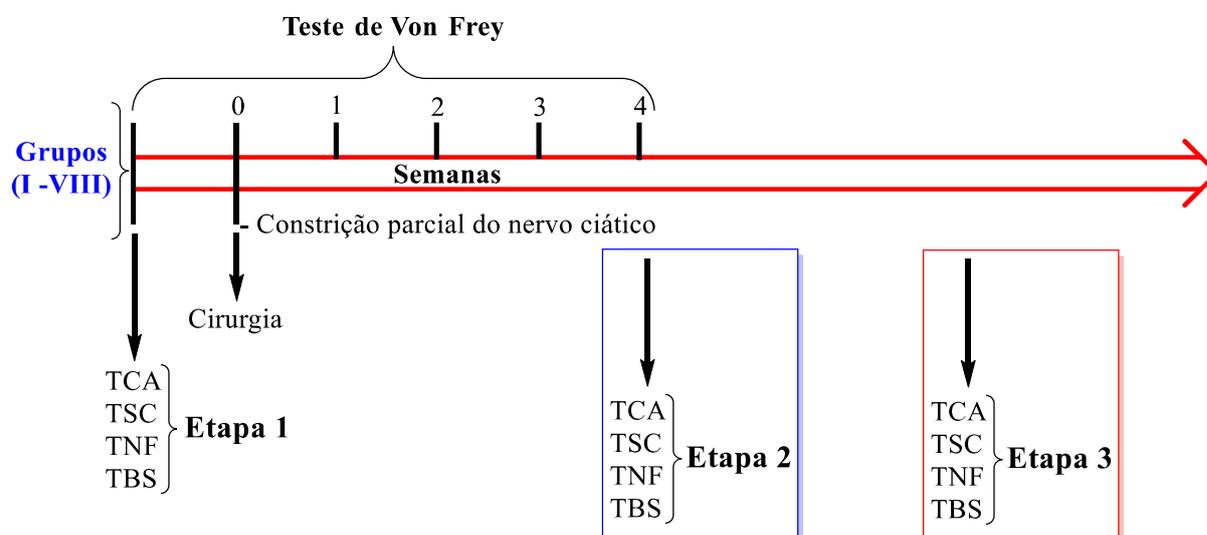
Os animais foram organizados aleatoriamente em oito grupos com oito animais cada ($n=8$). Grupo I: grupo controle que recebeu por via oral (v.o.) apenas Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) (10 mL/kg, v.o.). Grupo II: grupo sham (falso operado) que recebeu apenas veículo (10 mL/kg, v.o.). Grupo III e IV: grupos de animais que receberam o β -cariofileno nas doses de 100 e 200 mg/kg (v.o.), respectivamente. Grupo V:

grupo de animais que recebeu a metil β -ciclodextrina na dose de 200 mg/kg (v.o.). Grupo VI e VII: grupos de animais que receberam o β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.), respectivamente. Grupo VIII: grupo de animais que recebeu a imipramina (50 mg/kg, v.o.).

O β -cariofileno puro e complexado foram emulsificados em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via oral (v.o.) apenas uma única vez nas para avaliação detalhada dos testes comportamentais (campo aberto, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose) após uma hora de tratamento. A imipramina (50 mg/kg, v.o.) foi solubilizada em veículo e serviu como controle positivo no teste nado forçado, suspensão pela cauda e borrifagem de sacarose após uma hora de tratamento. As doses do β -cariofileno e das outras substâncias utilizadas foram estabelecidas a partir de estudos anteriores (OLIVEIRA et., 2018, MACHADO et al., 2015, DONATO et al., 2014).

Após a organização dos grupos de animais em gaiolas metabólicas de polipropileno, os protocolos experimentos foram divididos em 3 etapas seguidas. Na primeira etapa não houve procedimento cirúrgico e nem tratamento farmacológico (experimento basal), sendo que cada grupo de animais foi avaliado nos testes comportamentais (Von frey, campo aberto, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose). Posteriormente e conforme a **Figura 2**, na segunda etapa foi realizado o procedimento cirúrgico e não houve o tratamento farmacológico com β -cariofileno livre, complexado (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina) ou imipramina, sendo que cada grupo de animal foi avaliado semanalmente no teste Von frey para verificação do surgimento da dor neuropática. No fim da quarta semana foi realizado os testes comportamentais para verificação do surgimento do comportamento semelhante à depressão pelo aumento do tempo total de imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado, bem como a redução no tempo total e na frequência de groomings no teste de borrifagem de sacarose. Os experimentos da terceira etapa foram realizados após a quarta semana em que foi realizado o tratamento com β -cariofileno livre (Grupo III e IV), complexado (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina) (Grupo VI e VII) ou imipramina (Grupo VIII) para realização de todos os testes comportamentais (campo aberto, suspensão pela cauda, nado forçado e borrifagem de sacarose) e avaliação do efeito antidepressivo conforme representado na **Figura 2**.

Figura 2: Representação esquemática das etapas e protocolos experimentais desenvolvidos no presente estudo.



Etapa 1

Sem dor neuropática e sem tratamento farmacológico

Etapa 2

Com dor neuropática e sem tratamento farmacológico

Etapa 3

Com dor neuropática e com tratamento farmacológico

Grupo I (CN)

Grupo II (Sham)

Grupo III (β -CNF 100 mg/kg)

Grupo IV (β -CNF 200 mg/kg)

Grupo V (Metil- β -CD)

Grupo VI (β -CNF/Metil- β -CD 50 mg/kg)

Grupo VII (β -CNF/Metil- β -CD 100 mg/kg)

Grupo VIII (Imipramina 100 mg/kg)

Teste do campo aberto (TCA); Teste da suspensão pela cauda (TSC); Teste do nado forçado (TNF); Teste da borrifagem de sacarose (TBS).

Fonte: Autoria própria.

Procedimentos cirúrgicos - Constricção parcial do nervo ciático

Após a anestesia com cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg) intramuscular, os animais utilizados foram submetidos à compressão parcial do nervo ciático direito que foi exposto por meio da separação do músculo bíceps femoral com pinça ponta romba para a liberação do tecido conjuntivo circundante. Após a localização do nervo com uma pinça, foi realizado levemente uma ligadura usando fio de seda (3-0 Shalon®) para circundar todo o diâmetro do nervo ciático. Todas as ligaduras foram realizadas cuidadosamente pelo mesmo pesquisador para garantir a homogeneidade no procedimento. Após a ligadura, a pele foi suturada e cada animal foi tratado com solução tópica de clorexidina (2%) e colocado em gaiola metabólica com antissepsia prévia. O procedimento cirúrgico no

grupo sham foi somente para exposição do nervo ciático sem a ligadura (SELTZER et al., 1990).

Teste de Von Frey

Filamentos de von Frey foram utilizados para avaliação do limiar nociceptivo mecânico. Assim, cada animal foi acondicionado em caixa de polipropileno sob uma plataforma fenestrada de arame elevada para permitir o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 30 min antes dos testes comportamentais. O Limiar Nociceptivo Mecânico foi mensurado na superfície plantar, que foi tocada com três repetições, por diferentes filamentos partindo das menores concentrações, em gramas, para as maiores (0,16g - 15g). Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia (basal) e semanalmente reavaliados durante quatro semanas após a cirurgia (CHAPLAN et al., 1994; ANDRADE PRÓSPERO et al., 2018).

Teste do campo aberto

Os animais submetidos ao tratamento por via oral com β -cariofileno foram colocados um por vez no campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 × 30 × 15 cm) e dividido em nove quadrados de áreas iguais para avaliação da atividade exploratória espontânea. Os parâmetros observados durante 5 minutos foram o número total de quadrados cruzados com as quatro patas, número de comportamento de autolimpeza (groomings), número de levantamentos (rearings) e de cruzamentos no centro, bem como a quantidade de bolo fecal (CHRISTMAS; MAXWELL, 1970; HALL; BALLACHEY, 1932; MACHADO et al., 2015).

Teste da suspensão pela cauda

A suspensão pela cauda dos animais foi realizada conforme descrito por Steru et al. (1987). Um pedaço de fita adesiva foi usado para suspender cada animal em tratamento pela cauda com uma altura de 30 cm acima de uma superfície plana. O experimento foi realizado durante 6 minutos para determinar o tempo de imobilidade que foi definido pela ausência de movimentos bruscos (o animal pode movimentar levemente a cabeça ou as patas dianteiras, sem mexer o corpo) ou ausência total de movimento.

Teste de Borrifagem de sacarose (*splash test*)

O teste de borrifagem de sacarose foi realizado conforme descrito por Santarelli et al. (2003) e Wang et al. (2018). Resumidamente, cada animal em tratamento foi colocado um por vez em uma gaiola de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) para posteriormente receber uma borrifação de uma solução de sacarose (10%, peso/volume) no dorso para induzir um comportamento de autolimpeza (groomings). O tempo total de autolimpeza e a frequência foram registrados durante 5 minutos.

Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado conforme descrito por Porsolt et al. (1978). Cada animal em tratamento foi colocado em um cilindro (10 x 25 cm) com 10 cm³ de água (temperatura entre 25 ± 1 °C) durante 6 minutos para determinar o tempo de imobilidade, em que o animal permanece flutuando passivamente na água fazendo pequenos movimentos para manter a sua cabeça acima da água. A água para cada animal em tratamento era trocada para evitar uma interferência comportamental.

Análise estatística

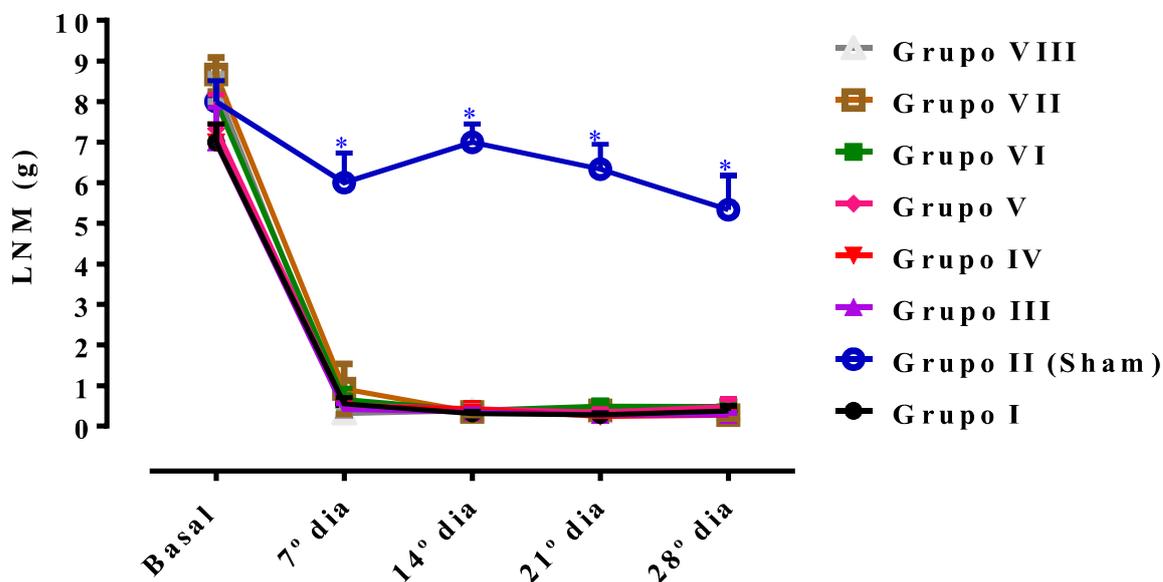
Os resultados numéricos foram expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média). As estatísticas dos resultados foram analisadas utilizando *one way* ou *two way* ANOVA seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post hoc*. Diferenças significativas entre os grupos avaliados foram considerados quando $p < 0,05$ (*GraphPad Prism* 6.01).

RESULTADOS

Constricção parcial do nervo ciático/Teste de Von Frey

Os animais com dor neuropática diminuíram significativamente o limiar nociceptivo mecânico na primeira semana após o procedimento cirúrgico para a constricção parcial do nervo ciático quando comparado com grupo sham evidenciando assim a instalação da neuropatia por injúria nervosa (**Figura 3**, $p < 0,05$). Conforme destacado no presente estudo, os animais com dor neuropática apresentaram comportamento semelhante à depressão pelo aumento do tempo total de imobilidade no teste da suspensão pela cauda (**Figura 5A**, $p < 0,05$) e nado forçado (**Figura 5B**, $p < 0,05$), bem como redução no tempo total e na frequência de groomings no teste de borrifagem de sacarose (**Figura 6**, $p < 0,05$) após 28 dias do procedimento cirúrgico (**Figura 3**).

Figura 3: Resultados do limiar nociceptivo mecânico (LNM) no modelo de dor neuropática por constrição parcial do nervo ciático da pata direita.

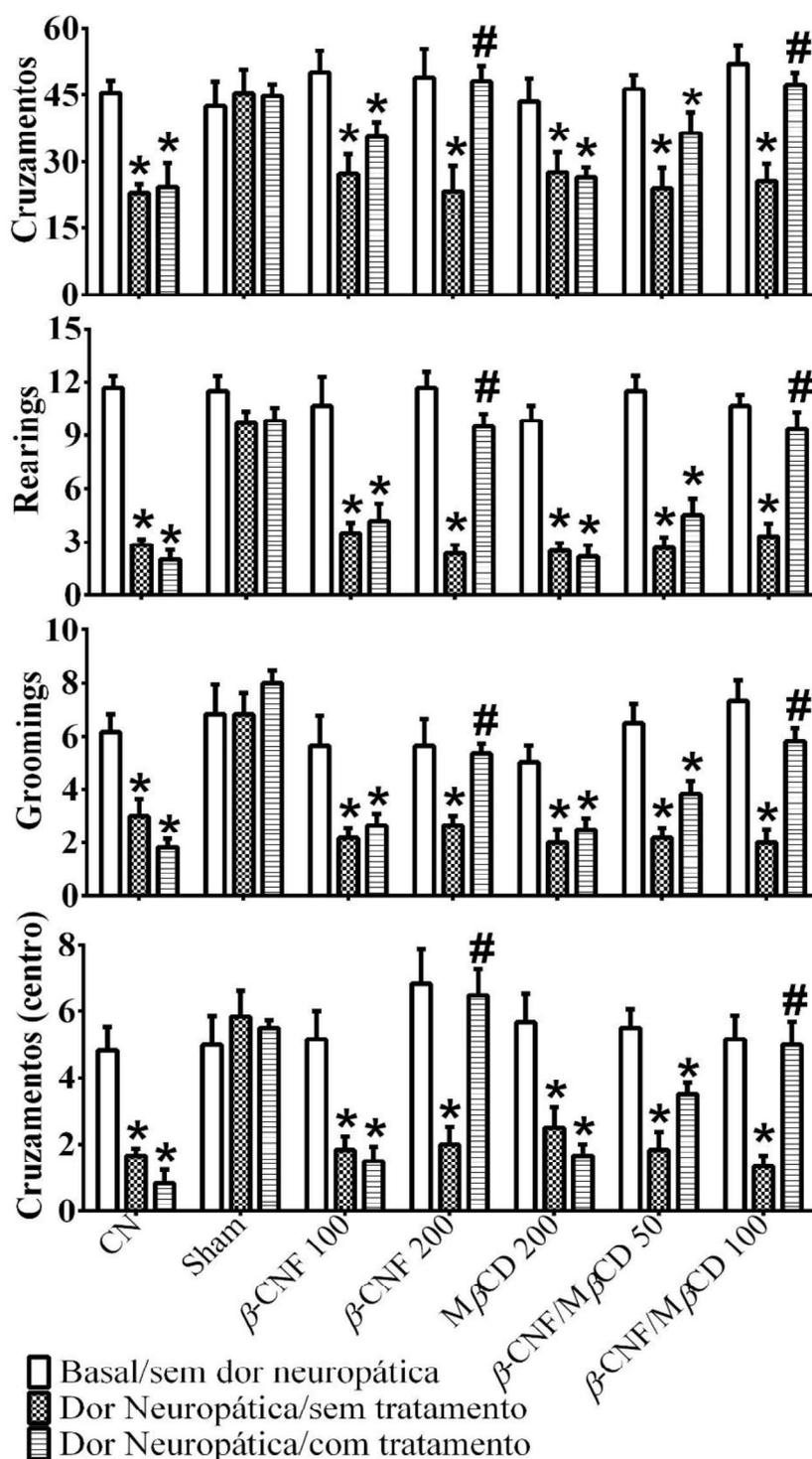


Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham (*two way ANOVA* e *Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

Teste do campo

Os animais com dor neuropática sem tratamento apresentaram reduções significativas no número de cruzamentos (**Figura 4**, $p < 0,05$), *rearings* (**Figura 4**, $p < 0,05$), *groomings* (**Figura 4**, $p < 0,05$) e número de cruzamentos na área central (**Figura 4**, $p < 0,05$) quando comparado com os animais dos experimentos basal. Diferentemente do observado para os animais com dor neuropática sem tratamento, os animais que receberam o β -cariofileno livre (β -CNF 100 mg/kg) e complexado (β -CNF/M β CD 50 e 100 mg/kg) depois da indução da dor neuropática e após a quarta semana aumentaram significativamente todos os parâmetros avaliados no teste do campo aberto (**Figura 4**, $p < 0,05$).

Figura 4: Resultados da atividade exploratória espontânea do β -cariofileno livre (β -CNF) e complexado com metil- β -ciclodextrina (β -CNF/M β CD) no teste do campo aberto.

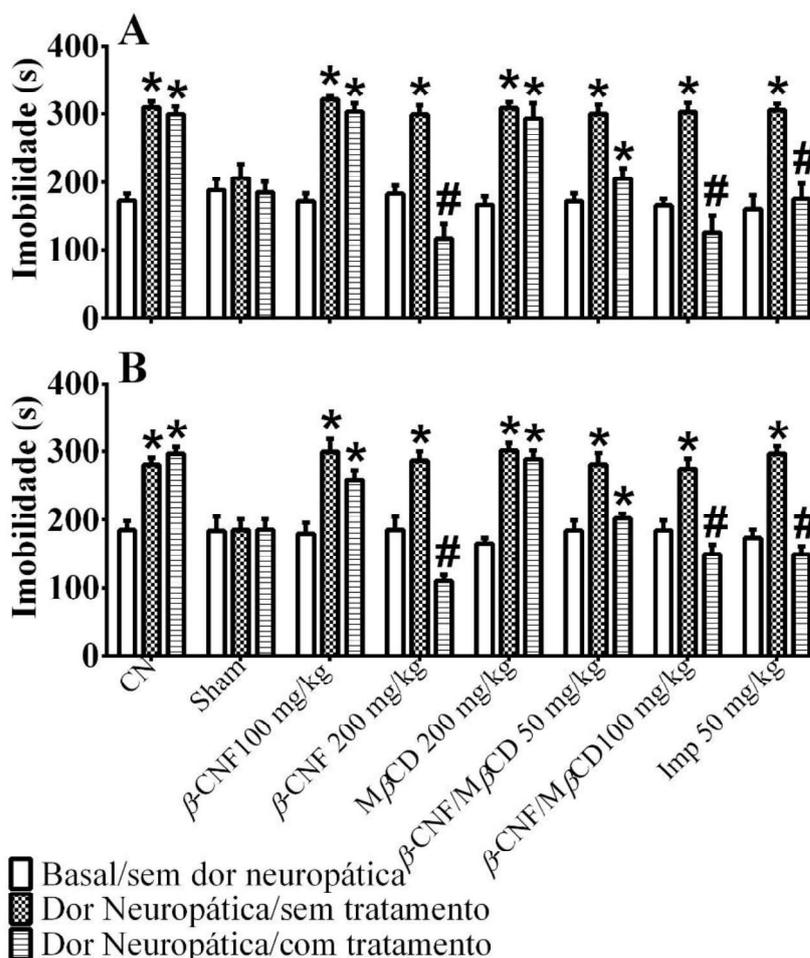


Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação aos animais do experimento basal (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*two way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). # $p < 0,05$ em relação em relação aos animais com dor neuropática sem o tratamento farmacológico (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*two way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Teste da suspensão pela cauda

Os animais com dor neuropática sem tratamento apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparado com os animais do grupo basal no teste da suspensão pela cauda (**Figura 5A**, $p < 0,05$) e nado forçado (**Figura 5B**, $p < 0,05$). No entanto, os animais com dor neuropática que receberam o β -cariofileno livre (β -CNF 100 mg/kg) e complexo (β -CNF/M β CD 50 e 100 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda (**Figura 5A**, $p < 0,05$) e nado forçado (**Figura 5B**, $p < 0,05$) quando comparado somente com animais com dor neuropática sem tratamento farmacológico.

Figura 5: Resultados do efeito tipo antidepressivo do β -cariofileno (β -CNF) livre, complexo com metil- β -ciclodextrina (β -CNF/M β CD) e da imipramina (IMP) no teste da suspensão pela cauda (A) e nado forçado (B).



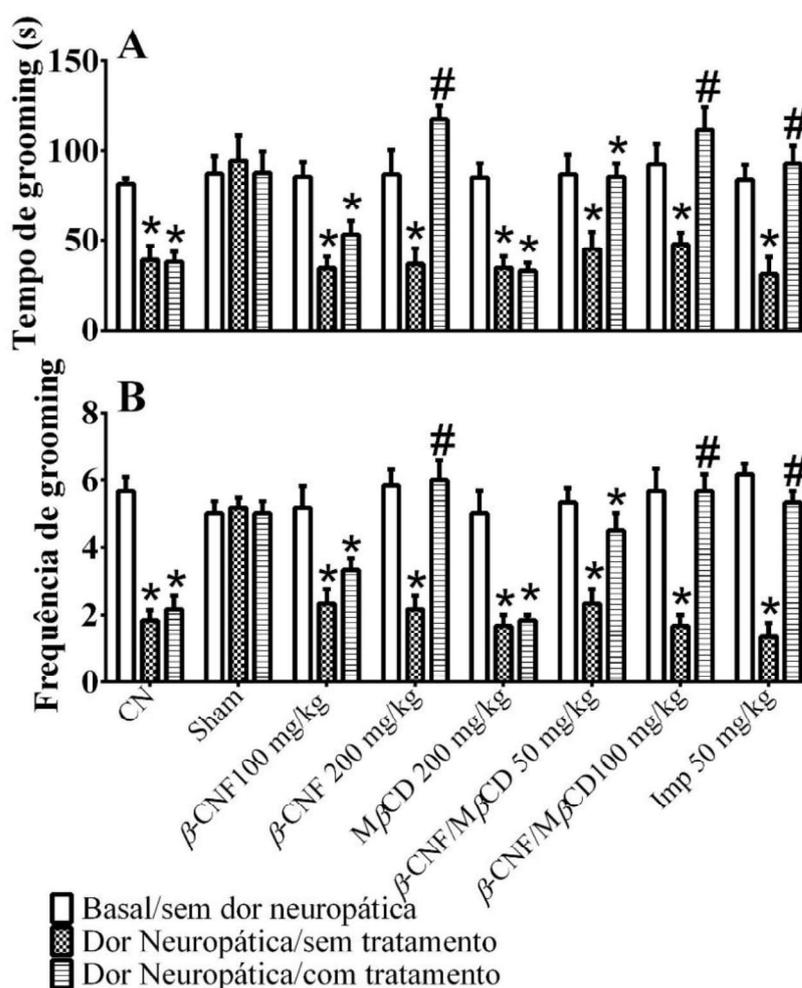
Os resultados representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação aos animais do experimento basal (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*two way* ANOVA e Neuman-

Keuls como *post hoc* teste). $^{\#}p < 0,05$ em relação em relação aos animais com dor neuropática sem o tratamento farmacológico (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*two way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Teste de Borrifagem de sacarose (*splash test*)

Conforme observado no efeito comportamental após a borrifagem de sacarose 10%, os animais com dor neuropática sem tratamento apresentaram uma redução significativa no tempo total e na frequência de *groomings* quando comparado com os animais do grupo basal (**Figura 6A e 6B**, $p < 0,05$).

Figura 6: Resultados do β -cariofileno livre (β -CNF), complexado com metil- β -ciclodextrina (complexado β -CNF/M β CD) e da imipramina (IMP) no teste de borrifagem de sacarose.



Os resultados representam a média \pm E.P.M. $^*p < 0,05$ em relação aos animais do experimento basal (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*two way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). $^{\#}p < 0,05$ em relação em relação aos animais com dor neuropática

sem o tratamento farmacológico (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (*two way* ANOVA e Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Tempo total de autolimpeza (groomings) (A) e frequência de autolimpeza (groomings) (B).

DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo consistiu em avaliar o efeito farmacológico do β -cariofileno livre e complexado sobre as alterações comportamentais depressivas induzidas por dor neuropática estabelecida por compressão parcial do ciático em camundongos *Swiss* fêmeas. O principal resultado farmacológico obtido foi a demonstração de que o β -cariofileno complexado foi bem mais efetivo na atividade comportamental semelhante ao antidepressivo com uma dose inferior ao β -cariofileno livre. Esses resultados possibilitam uma melhor compreensão das propriedades farmacológicas do β -cariofileno, bem como os mecanismos envolvidos na sua ação antidepressiva.

Atualmente, múltiplas abordagens técnicas têm sido utilizadas para aumentar a solubilidade aquosa de compostos farmacológicos como o uso de lipossomas, nanopartículas, microemulsões e complexos de inclusão com ciclodextrinas. As ciclodextrinas são classificadas em α , β e γ que contêm 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosídeo, respectivamente, com grupos hidroxilas primários e secundários localizados nas bordas estreitas e mais largas de uma estrutura em forma de cone truncada. Entre as diferentes ciclodextrinas, as β são amplamente utilizadas devido ao seu preço ser menor, fácil disponibilidade e orientação estrutural favoráveis à formação de complexos de inclusão (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017; KFOURY et al., 2016). As ciclodextrinas melhoraram a estabilidade e biodisponibilidade *in vivo* conforme já relatado no estudo farmacológico de SANTOS et al., (2016) em relação as atividades anti-inflamatória, protetora gástrica e antioxidante quando comparado com β -cariofileno livre.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os camundongos *Swiss* fêmeas com constrição do nervo ciático desenvolveram comportamento semelhante à depressão pelo aumento do tempo total de imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado, bem como redução no tempo total e na frequência de groomings no teste de borrifagem de sacarose. Esses resultados estão de acordo com as evidências não clínicas e clínicas que destacam uma relação entre dor crônica e depressão, sendo que vários estudos prévios demonstraram que a dor neuropática persistente pode resultar em alterações de comportamento típicas da depressão e ansiedade em roedores (FASICK et al., 2015; SHENG et al., 2017; STERNKE; ABRAHAMSON; BAIR, 2016; YALCIN et al., 2011).

A administração aguda do β -cariofileno reduziu significativamente o tempo de imobilidade semelhante à imipramina e os resultados descritos na **Figura 5** estão conforme demonstrados pelo estudo de Bahi et al. (2014) em camundongos *Swiss* machos, o que pode sugerir que o comportamento antidepressivo após o tratamento com β -cariofileno ocorre independentemente da diferença de sexo. Com doses inferiores, o β -cariofileno complexado a partir da dose de 50 mg/kg apresentou significativo efeito anti-imobilidade no teste da suspensão pela cauda e nado forçado quando comparado somente com o β -cariofileno livre. Adicionalmente, os resultados do β -cariofileno livre e complexado em ambos os testes foram acompanhados pelo aumento da atividade locomotora quando considerado o número de cruzamentos no teste do campo aberto, bem como um aumento no número de cruzamentos na área central exercendo efeito comportamental semelhantes aos ansiolíticos.

Para verificar outro parâmetro do efeito antidepressivo do β -cariofileno, o comportamento de autolimpeza (groomings) foi avaliado no teste de borrifagem de sacarose. Nesse teste, o tempo dedicado ao *grooming* pode compreender aspectos de autocuidado e comportamento motivacional, sendo que a ausência do autocuidado pode ser verificada em seres humanos com transtornos depressivos (FOTI et al., 2018; VARIDAKI; MOHAMMAD; COFFEY, 2016). No presente estudo, em conformidade com o comportamento antidepressivo no teste da suspensão pela cauda e nado forçado, a administração aguda do β -cariofileno livre e complexado fez com os grupos de animais apresentassem uma maior duração e frequência de grooming, evitando assim comportamento anedônico.

Embora os testes da suspensão pela cauda e nado forçado em animais com dor neuropática estabelecida por compressão parcial do ciático possam predizer o potencial antidepressivo do β -cariofileno livre e complexado, o uso de outros modelos animais como bulbectomia olfatória, estresse leve crônico, hipofagia induzida pela novidade e estresse causado pela derrota social podem fornecer uma maior validade nos resultados antidepressivo do β -cariofileno. Além disso, uma vez que os mecanismos que podem justificar os efeitos anti-imobilidade do β -cariofileno ainda precisam ser amplamente explorados, o presente estudo destaca a importância do complexo de inclusão β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina sobre a atividade neurofarmacológica.

CONCLUSÃO

Nos protocolos experimentais, β -cariofileno complexado melhorou a atividade comportamental semelhante ao antidepressivo com uma dose inferior ao β -cariofileno livre. Assim, os resultados obtidos neste estudo destacam uma premissa interessante no uso do

complexo de inclusão β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de dosagem oral com biodisponibilidade aumentada.

REFERÊNCIAS

ANDRADE PRÓSPERO, D. F.; REIS FILHO, A. C.; PIAULINO, C. A.; LOPES, E. M.; DE SOUSA, D. P.; DE CASTRO ALMEIDA, F. R. Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, p. 55-60, 2018.

AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; BAH, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, n. 0, p. 260-268, 2014.

ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C.; DE BEM, A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 279, n. 0, p. 220-231, 2014.

ATTAL, N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. **Revue Neurologique**, *In press*, 2018.

ATTAL, N.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 5, p. 456-466, 2018.

AWOUAFACK, M. D.; TANE, P.; KUETE, V.; ELOFF, J. N. 2 - Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. In: (Ed.). **Medicinal Plant Research in Africa**. Oxford: Elsevier, 2013. p.33-103.

BAHI, A.; AL MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; OJHA, S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, n. 0, p. 119-124, 2014.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; DOLESKI, P. H.; BOLIGON, A. A.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-9, 2016.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 50-58, 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução normativa Nº 30, de 2 de fevereiro de 2016: Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA, 2016. 50 p.

BOUHASSIRA, D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. **Revue Neurologique**, *In press*, 2018.

BUCHBAUER, G.; ILIC, A. Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. In: RAMAWAT, K. G. e MÉRILLON, J.M. (Ed.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.4109-4159.

BUCKLE, J. Chapter 3 - Basic Plant Taxonomy, Basic Essential Oil Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. In: BUCKLE, J. (Ed.). **Clinical Aromatherapy (Third Edition)**. St. Louis: Churchill Livingstone, 2015. p.37-72.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHENG, Y.; DONG, Z.; LIU, S. β -Caryophyllene Ameliorates the Alzheimer-Like Phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 Receptor Activation and the PPAR γ Pathway. **Pharmacology**, v. 94, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

CHRISTMAS, A. J.; MAXWELL, D. R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. **Neuropharmacology**, v. 9, n. 1, p. 17-29, 1970.

DONATO, F.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; FILHO, C. B.; DEL FABBRO, L.; ANTUNES, M. S.; SOUZA, L. C.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: Possible role of l-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels. **Brain Research Bulletin**, v. 104, p. 19-26, 2014.

DOSENOVIC, S.; JELICIC KADIC, A.; VUCIC, K.; MARKOVINA, N.; PIEPER, D.; PULJAK, L. Comparison of methodological quality rating of systematic reviews on neuropathic pain using AMSTAR and R-AMSTAR. **BMC medical research methodology**, v. 18, n. 1, p. 37-37, 2018.

FASICK, V.; SPENGLER, R. N.; SAMANKAN, S.; NADER, N. D.; IGNATOWSKI, T. A. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 139-159, 2015.

FONTES, L. B. A.; DIAS, D. D. S.; AARESTRUP, B. J. V.; AARESTRUP, F. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; CORRÊA, J. O. D. A. β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 257-264, 2017.

FOTI, D.; NOVAK, K. D.; HILL, K. E.; AIT OUMEZIANE, B. 13 - Neurophysiological Assessment of Anhedonia in Depression and Schizophrenia. In: SANGHA, S. e FOTI, D. (Ed.). **Neurobiology of Abnormal Emotion and Motivated Behaviors**: Academic Press, 2018. p.242-256.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. 7 - Nanocapsule formation by cyclodextrins. In: JAFARI, S. M. (Ed.). **Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries**: Academic Press, 2017. p.187-261.

HALL, C.; BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, p. 1-12, 1932.

KAMIKUBO, R.; KAI, K.; TSUJI-NAITO, K.; AKAGAWA, M. β -Caryophyllene attenuates palmitate-induced lipid accumulation through AMPK signaling by activating CB2 receptor in human HepG2 hepatocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 10, p. 2228-2242, 2016.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 264-272, 2015.

KAMERMAN, P. R.; WADLEY, A. L.; DAVIS, K. D.; HIETAHARJU, A.; JAIN, P.; KOPF, A.; MEYER, A.-C.; RAJA, S. N.; RICE, A. S. C.; SMITH, B. H.; TREEDE, R.-D.; WIFFEN, P. J. World Health Organization essential medicines lists: where are the drugs to treat neuropathic pain? **Pain**, v. 156, n. 5, p. 793-797, 2015.

KLAUKE, A. L.; RACZ, I.; PRADIER, B.; MARKERT, A.; ZIMMER, A. M.; GERTSCH, J.; ZIMMER, A. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid β -caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 608-620, 2014.

KREMER, M.; SALVAT, E.; MULLER, A.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. **Neuroscience**, v. 338, p. 183-206, 2016.

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T.; LIU, F.; ZHUANG, K.; LUO, K.; YANG, L. Neuroprotective Effects of Trans-Caryophyllene Against Kainic Acid Induced Seizure Activity and Oxidative Stress in Mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; MACHADO, K. C.; ISLAM, M. T.; JUNIOR, A. L. G.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273-279, 2015.

NUUTINEN, T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 198-228, 2018.

OBATA, H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2483, 2017.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; HAQUE, M. E. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and

salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 418, n. 1, p. 59-70, 2016.

OKIFUJI, A.; TURK, D. C. Chapter 9 - Chronic Pain and Depression: Vulnerability and Resilience. In: AL'ABSI, M. e FLATEN, M. A. (Ed.). **Neuroscience of Pain, Stress, and Emotion**. San Diego: Academic Press, 2016. p.181-201.

OLIVEIRA, C. C. D.; OLIVEIRA, C. V. D.; GRIGOLETTO, J.; RIBEIRO, L. R.; FUNCK, V. R.; GRAUNCKE, A. C. B.; SOUZA, T. L. D.; SOUTO, N. S.; FURIAN, A. F.; MENEZES, I. R. A.; OLIVEIRA, M. S. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, p. 26-31, 2016.

OLIVEIRA, G. L. D. S.; MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; DA SILVA, A. P. D. S. C. L.; FEITOSA, C. M.; DE CASTRO ALMEIDA, F. R. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 338-346, 2018.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805-809, 2003.

SANTOS, P. S.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; MEDEIROS, J. V. R.; NUNES, S. C. C.; CARVALHO, R. A.; PAIS, A. C. C.; VEIGA, F. J. B.; NUNES, L. C. C.; FIGUEIRAS, A. Methyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex with β -Caryophyllene: Preparation, Characterization, and Improvement of Pharmacological Activities. **ACS omega**, v. 2, n. 12, p. 9080-9094, 2017.

SEGAT, G. C.; MANJAVACHI, M. N.; MATIAS, D. O.; PASSOS, G. F.; FREITAS, C. S.; COSTA, R.; CALIXTO, J. B. Antiallodynic effect of β -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Neuropharmacology**, v. 125, p. 207-219, 2017.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, nov. 1990.

SINGH, H.; BHUSHAN, S.; ARORA, R.; SINGH BUTTAR, H.; ARORA, S.; SINGH, B. Alternative treatment strategies for neuropathic pain: Role of Indian medicinal plants and compounds of plant origin-A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 634-650, 2017.

SHENG, J.; LIU, S.; WANG, Y.; CUI, R.; ZHANG, X. The Link between Depression and Chronic Pain: Neural Mechanisms in the Brain. **Neural plasticity**, v. 2017, p. 9724371-9724371, 2017.

SENO, M. D. J.; ASSIS, D. V.; GOUVEIA, F.; ANTUNES, G. F.; KUROKI, M.; OLIVEIRA, C. C.; SANTOS, L. C. T.; PAGANO, R. L.; MARTINEZ, R. C. R. The critical role of amygdala subnuclei in nociceptive and depressive-like behaviors in peripheral neuropathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13608, 2018.

STERNKE, E. A.; ABRAHAMSON, K.; BAIR, M. J. Comorbid Chronic Pain and Depression: Patient Perspectives on Empathy. **Pain Management Nursing**, v. 17, n. 6, p. 363-371, 2016.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; MICO, J.-A.; LENEGRE, A.; STERU, M.; SIMON, P.; PORSOLT, R. D. The automated tail suspension test: A computerized device which differentiates psychotropic drugs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. IN1-671, 1987.

VARIDAKI, A.; MOHAMMAD, H.; COFFEY, E. T. Chapter 5 - Molecular Mechanisms of Depression. In: FRODL, T. (Ed.). **Systems Neuroscience in Depression**. San Diego: Academic Press, 2016. p.143-178.

WANG, J.; HODES, G. E.; ZHANG, H.; ZHANG, S.; ZHAO, W.; GOLDEN, S. A.; BI, W.; MENARD, C.; KANA, V.; LEBOEUF, M.; XIE, M.; BREGMAN, D.; PFAU, M. L.; FLANIGAN, M. E.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; YEMUL, S.; SHARMA, A.; HO, L.; DIXON, R.; MERAD, M.; HAN, M.-H.; RUSSO, S. J.; PASINETTI, G. M. Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress in mice. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 477, 2018.

YALCIN, I.; BOHREN, Y.; WALTISPERGER, E.; SAGE-CIOCCA, D.; YIN, J. C.; FREUND-MERCIER, M.-J.; BARROT, M. A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 946-953, 2011.

YANG, G.; WU, P.; ZHOU, Z.; HE, X.; MENG, W.; ZHANG, Z. Direct Hydration of β -Caryophyllene. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 49, p. 15864-15871, 2012.

Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo de inclusão- β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial farmacológico do β -cariofileno [$(\beta$ -humuleno ou (-)-trans-cariofileno)] nos últimos anos tem sido amplamente pesquisado e a compreensão do perfil de toxicidade desse composto bioativo extraído de várias espécies de plantas é importante. Conforme os resultados descritos no Capítulo 1, a toxicidade aguda em camundongos *Swiss* fêmeas avaliada pela diretriz 423 da OECD estabeleceu que o β -cariofileno pode ser classificado como um composto com toxicidade superior a 2000 mg/kg de peso corporal e a toxicidade em doses repetidas mostrou que não houve alterações significativas que indicassem toxicidade no peso corporal, consumo de alimento e água, parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como nos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim. Adicionalmente, os resultados histopatológicos dos animais tratados com β -cariofileno (300 e 2000 mg/kg) não comprometeu órgãos como fígado, rim, coração e pulmão. Além do estudo toxicológico, o estudo neurofarmacológico com β -cariofileno proporcionou um suporte adicional na compreensão dos mecanismos neuromoleculares subjacentes às propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes em camundongos *Swiss* fêmeas. Esses resultados são importantes porque propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes do β -cariofileno podem envolver a via molecular L-arginina-óxido nítrico que ainda é pouco pesquisada. Os resultados obtidos sugerem que os receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{2A} e 5-HT₃ não estão envolvidos nas propriedades ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivantes do β -cariofileno. Nesse estudo, um modelo acional de estudo neurofarmacológico (depressão induzida por dor neuropática) foi empregado para determinação das propriedades antidepressivas do β -cariofileno livre e do seu complexo de inclusão (β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina). Conforme os resultados obtidos no presente estudo, o β -cariofileno quando complexado com metil- β -ciclodextrina foi mais efetivo nas propriedades antidepressivas com uma dose inferior ao β -cariofileno livre. β -cariofileno apresenta baixa solubilidade em água e os resultados obtidos descritos no Capítulo 3 destacam uma premissa promissora na aplicação do complexo de inclusão β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de dosagem oral com biodisponibilidade aumentada em propriedades antidepressivas.

Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo de inclusão- β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina

Perspectivas

PERSPECTIVAS

- 1) Confirmar uma maior eficácia do potencial das propriedades ansiolíticas do β -cariofileno complexado com metil- β -ciclodextrina em camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) com dor neuropática (constricção crônica do nervo ciático) utilizando o teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e da alimentação suprimida pela novidade.
- 2) Confirmar uma maior eficácia do potencial neuroprotetor do β -cariofileno complexado com metil- β -ciclodextrina contra crises epiléticas induzida pelos quimioconvulsivantes (pilocarpina, pentilenotetrazol e isoniazida).
- 3) Determinar os mecanismos moleculares mediado por receptores benzodiazepínicos/GABAérgicos, serotoninérgicos (5-HT_{2A} e 5-HT₃) e a via L-arginina-óxido nítrico (NO) das propriedades ansiolíticas e antidepressivas do β -cariofileno complexado com metil- β -ciclodextrina em camundongos *Swiss* com dor neuropática.
- 4) Determinar a concentração de β -cariofileno presente no complexo de inclusão.

**Estudos toxicológicos e neurofarmacológicos
não clínicos do β -cariofileno e do seu complexo
de inclusão- β -cariofileno/metil- β -ciclodextrina**

Anexos

ANEXO A: Carta de aprovação do Comitê de ética em experimentação com animais.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

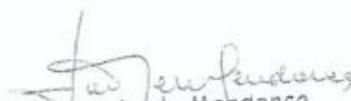


Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (88) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Desenvolvimento de um novo fitofármaco a partir de um sesquiterpeno bioativo como agente terapêutico contra uma doença neurológica**", sob a responsabilidade da Profa. Dra. **FERNANDA REGINA DE CASTRO ALMEIDA** do **Departamento de Bioquímica e Farmacologia/CCS/UFPI**, com Carta de Aprovação deste Comitê sob o nº **012/15**, teve a solicitação de Prorrogação de Vigência de **Março/2018 à Abril/2019**, Aprovada por este Comitê em reunião datada de 18 de Maio de 2018.

Teresina, 18 de Maio de 2018.


Prof.^a **Ivete L. de Mendonça**
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO C: Confirmação de submissão ao sistema editorial para a *Life Sciences* (B1)

Fwd: Submission Confirmation Caixa de entrada ✕**Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva UFPI**

para eu

inglês

português

[Traduzir mensagem](#)

----- Forwarded message -----

De: **Life Sciences** <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Date: qui, 7 de mar de 2019 16:21

Subject: Submission Confirmation

To: <apaulasantoslima@ufpi.edu.br>

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Silva,

Your submission entitled "Different neuromolecular modulations of <beta>-caryophyllene on anxiolytic, antidepressant and anti

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is [h](#)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,