



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
- PONTO FOCAL -

KEYLLA DA CONCEIÇÃO MACHADO

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DO BETA-CARIOFILENO EM MODELOS
ANIMAIS PARA EPILEPSIA E ANSIEDADE

TERESINA – PI
2019

KEYLLA DA CONCEIÇÃO MACHADO

**ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DO BETA-CARIOFILENO EM MODELOS
ANIMAIS PARA EPILEPSIA E ANSIEDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante e Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (*in memoriam*)

Área e Linha de Pesquisa

Biotecnologia em Saúde –
Desenvolvimento de Agentes Profiláticos,
Terapêuticos e Testes Diagnósticos.

TERESINA – PI

2019

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

M149e Machado, Keylla da Conceição.
Estudos farmacológicos do beta-cariofileno em
modelos animais para epilepsia e ansiedade / Keylla da
Conceição Machado. – 2019.
183 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste
de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí,
Teresina, 2019.

“Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho
Melo Cavalcante e Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas
(*in memoriam*)”.

1. Betacariofileno. 2. Doenças neurológicas.
3. Modelos animais. I. Título.

CDD 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: KEYLLA DA CONCEIÇÃO MACHADO

TÍTULO DO PROJETO: "ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DO BETA-CARIOFILENO EM MODELOS ANIMAIS PARA EPILEPSIA E ANSIEDADE."

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u>Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante</u>
Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Aldeídia Pereira de Oliveira</u>
Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa- UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>João Marcelo de Castro e Sousa</u>
Profa. Dra. Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva- UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva</u>
Profa. Dra. Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno - UNIRB (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 31 de outubro de 2019.

HORÁRIO: 09:00

LOCAL: Auditório do curso de Enfermagem/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Carla Maria de Carvalho Leite

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA/RENORBIO**

Profa. Dra. Carla Eiras

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus**, minha fonte inesgotável de fé, e a **Nossa Senhora do Perpétuo Socorro** pelo dom da vida, pela força, apoio e por me impulsionar sempre a seguir em frente nos momentos de dificuldades e por iluminar meus caminhos com sua proteção divina.

Aos meus pais, *Luiza Maria da Conceição Machado* e *Luiz Alves Machado*, por sempre estarem ao meu lado, pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional e por ter feito de mim a pessoa que sou. A vocês, minha eterna gratidão e amor.

À minha querida e estimada irmã, *Kátia da Conceição Machado*, pelo amor, compreensão, apoio, amizade e companhia.

Aos tios, primos, madrinhas e padrinhos por sempre torcerem pelo meu sucesso e estarem ao meu lado. Aos meus avós (*in memoriam*), pois apesar da ausência física, sei que eles torcem pelo meu sucesso e minha felicidade.

A minha orientadora, professora Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, por aceitar minha orientação, pelos ensinamentos, compreensão, paciência, apoio científico e confiança.

Ao professor *Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (in memoriam)*, pela amizade, ensinamentos, conselhos, por nos estimular sempre, por tirar o melhor de nós, pelo exemplo de profissionalismo e por ter me incentivado no começo a entrar nessa missão. E mesmo não estando aqui fisicamente, sempre ficarão seu exemplo e ensinamentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Genética (LAPGENIC), por me acolherem e ajudarem sempre, Antonielly, Márcia, Marcus Vinícius, Rosália,

Ana Maria. Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), em especial a Amanda Almeida pela amizade e cumplicidade durante essa etapa de minha vida, fazendo parte sempre. Quero você para sempre na minha vida.

Aos funcionários do NTF por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Universidade Federal do Piauí por nos proporcionar a oportunidade de usufruir de sua estrutura técnico-científica e por permitir o crescimento profissional e intelectual.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo financeiro durante a pesquisa.

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

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

MACHADO, K.C. **ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DO BETA-CARIOFILENO EM MODELOS ANIMAIS PARA EPILEPSIA E ANSIEDADE** Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 2019. 183p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

O beta-cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico natural encontrado nos óleos essenciais de plantas medicinais, com atividades farmacológicas como anticâncer, hepatoprotetora, gastroprotetora, nefroprotetora, antimicrobiana, imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante. As duas últimas atividades farmacológicas despertam interesses em estudos sobre suas ações em distúrbios neurológicos. Assim, o objetivo do estudo foi de avaliar os efeitos do beta-cariofileno, em modelos animais (camundongos *Swiss* machos) para epilepsia e ansiedade. Doses de 30, 100 e 300 mg/kg, via intraperitoneal foram aplicadas nos estudos anticonvulsivos, e de 25, 50 e 75 mg/kg i.p. para avaliação ansiolíticas. Os testes com pentilenotetrazol (85 mg/kg i.p.), eletrochoque máximo, ácido caínico (30 mg/kg i.p.), Rota Rod e do labirinto aquático de Morris foram usados na avaliação anticonvulsivante, e os testes de Labirinto em Cruz Elevado, Claro ou Escuro e de Esconder Esfera, *Rota Rod* para atividade ansiolítica. O ensaio de peroxidação lipídica foi usado na avaliação de danos oxidativos no modelo de epilepsia. Os efeitos toxicológicos e antioxidantes, em 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM, foram avaliados em *Artemia salina* e em *Saccharomyces cerevisiae*, como também frente aos radicais ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazílico, 2,20-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico e hidroxila. O beta-cariofileno apresentou efeitos anticonvulsivantes na dose de 30 mg/kg no modelo com eletrochoque máximo, sem neurotoxicidade, como observado no Rota Rod, como também no modelo com ácido caínico, e de forma correlacionada ao baixo nível de peroxidação lipídica, como também diminuição de latência dependente da dose, no teste do Labirinto Aquático de *Morris*. Entretanto, no modelo com pentilenotretazol não foi observado efeito anticonvulsivante. Atividades ansiolíticas foram observadas pelo aumento do número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência no compartimento claro e por diminuição no número de esferas escondidas sem interferir no desempenho de camundongos no *Rota Rod*. Não apresentou toxicidade em *A. salina*. Efeitos antioxidantes foram observados em *S. cerevisiae* frente ao peróxido de hidrogênio (10 mM) e nos testes *in vitro*. Correlações estatísticas foram observadas entre os efeitos ansiolíticos com as atividades antioxidantes. O beta-cariofileno é um composto promissor para formulações neurofarmacológicas, por suas atividades anticonvulsivantes, como agonista do receptor carninóide, e ansiolíticas possivelmente, por mecanismos associados ao seus efeitos antioxidantes.

Palavras-chave: Beta-cariofileno, doenças neurológicas, modelos animais.

ABSTRACT

Betacariophilene is a natural bicyclic sesquiterpene found in essential oils of medicinal plants, with pharmacological activities such as anticancer, hepatoprotective, gastroprotective, neproprotective, antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant. The last two pharmacological activities arouse interest in studies of their actions in neurological disorders. Thus, the objective of the study was to evaluate the effects of beta caryophyllene in animal models (Swiss female mice) for epilepsy and anxiety. Doses of 30, 50, 100 and 300 mg / kg, i.p. were applied in the anticonvulsive studies, and 25, 50 and 75 mg / kg i.p. for anxiolytic evaluation. The tests with Pentilenotetrazole (85 mg / kg ip), maximal electroshock, caffeic acid (30 mg / kg ip), Rota Rod and the aquatic labyrinth were used in the anticonvulsive evaluation, and the Labeled High, Light or Dark to Hide Sphere, Rod Route for anxiolytic activity. The lipid peroxidation assay was used to evaluate oxidative damage in the epilepsy model. The toxicogenic and antioxidant effects, in 0.3; 0.7; 1.5 and 3 mM, were evaluated in *Artemia salina* and *Saccharomyces cerevisiae*, as well as the radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid and hydroxyl. Beta-caryophyllene presented anticonvulsant effects at the dose of 30 mg / kg in the model with maximum electroshock, without neurotoxicity, as observed in the Rod Route, as well as in the model with kainic acid, and in a way correlated to the low level of lipid peroxidation, as well as decrease of dose-dependent latency in the Morris Aquatic Labyrinth test. However, no anticonvulsive effect was observed in the pentilenotretazole model. Anxiolytic activities were observed by increasing the number of open arms entrances and the dwell time in the clear compartment and by decreasing the number of hidden beads without interfering with the performance of mice in the Rod Route. No toxicity was observed in *A. salina*. Antioxidant effects were observed in *S. cerevisiae* against hydrogen peroxide (10 mM) and in the in vitro tests. Statistical correlations were observed between anxiolytic effects and antioxidant activities. Beta-caryophyllene is a promising compound for neuropharmacological formulations, because of its anticonvulsant activities, as a carninoid receptor agonist, and possibly anxiolytic, by mechanisms associated with its antioxidant effects.

Keywords: Beta-cariophilene, neurological diseases, animal models.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACT	Acetoacetil-CoA tiolase
A β	Beta-amilóide
AC	Ácido Caínico
AcA250	Ácido ascórbico mg/kg
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
CB2	Receptor canabinoide-2
BCF	Beta-cariofileno
BZD	Benzodiazepínico
CAT	Catalase
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CYP450	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT ₅₀	Dose Tóxica 50%
DZP	Diazepam
DZP2	Diazepam 2 mg/kg
E.P.M.	Erro padrão da média
ERN's	Espécies reativas derivadas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas derivadas de oxigênio
FDS	Farnesil difosfato sintase.
GABA	Receptor ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor ácido γ -aminobutírico subunidade A
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GTP	Guanosina Trifosfato
IDI	Isoprenil difosfato isomerase
HMGR	HMGS-CoA redutase

HMGS	HMGS-CoA sintase
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MDA	Malondialdeído
MÊS	Eletrochoque
MVD	Melavonato difosfato descarboxilase
MVK	Melavonato quinase
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMK	Fosfomelavonato quinase
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido desmutase
SOD Mn	Superóxido dismutase mitocondrial
<i>Sod1</i> Δ	Superóxido dismutase citoplasmática mutada
<i>Sod1</i> Δ <i>Sod2</i> Δ	Superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial mutada
<i>Sod2</i> Δ	Superóxido dismutase mitocondrial mutada
TBARS	Substâncias Ácidas Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico
VEI	Veículo
YEL	Meio líquido completo
YEPD	Meio sólido

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Organização da Tese	27
Figura 2	Espaço químico biologicamente relevante de produtos naturais e compostos sintéticos	32
Figura 3	Efeito neuroprotetor de produtos naturais	33
Figura 4	Tipos farmacológicos de óleo essencial definidos por grupo funcional	36
Figura 5	Representação esquemática da biossíntese dos sesquiterpenos	38
Figura 6	Estrutura molecular do 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo [7,2,0] undec-4-eno	40
Figura 7	Mecanismos gerais da peroxidação lipídica	42
Figura 8	Efeitos antioxidante e neuroprotetor do BCF	43
Figura 9	Mecanismos de ação antibacteriano do BCF. ATP: adenosina trifosfato	45
Figura 10	Alvos celulares de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) visando diferentes populações celulares	46
Figura 11	Modelo de ativação microglial induzida por estresse oxidativo na regulação da neurodegeneração	47
Figura 12	Mecanismo diferente de propriedades médicas de ervas medicinais	48
Figura 13	Causas da epilepsia	49
Figura 14	Modelo de relação entre o estresse oxidativo, epilepsia e apoptose	51
Figura 15	Mecanismo de dano neuronal induzido por estresse oxidativo na depressão e ansiedade	52
Figura 16	Fontes do estresse oxidativo	59
Figura 17	Diferentes mecanismos patogênicos de indução do estresse oxidativo na neurodegeneração	61
Figura 18	Sistema de defesa antioxidante celular	64

CAPÍTULO I

Figura 1	Fluxograma para inclusão/exclusão e curso geral de processamento de dados	98
-----------------	---	----

Figura 2	Papel neuroprotetor do beta-cariofileno (BCF)	103
Figura 3	Possíveis vias neuro-imunomodulatórias do beta-cariofileno (BCF). [BCF pode estimular as células T CD8, que eventualmente estimula as células T CD4 a converter as células T CD4 em (células T CD4 +). As citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6, TNF- α , TGF- β , IFN- γ) por ação das células T CD4 + podem estimular as células Th1, Th17 e Treg e modular as atividades neurológicas.]	105
Figura 4	Possível efeito analgésico do beta-cariofileno (BCF). [Através da estimulação do CB2R, ou sistema p38 MAPK / NF-kB, o BCF pode regular negativamente a ativação da microglia, levando à regulação negativa do receptor de quimiocina C-C tipo 2 (CCR2) e iNOS, o que acabará reduzindo a dor neuropática.	107
Figura 5	Figura 5. Possível efeito anti-Alzheimer do beta-cariofileno (BCF). [(A) O BCF pode inibir a síntese de óxido nítrico (NO) e beta-amilóide (A β), responsável por proteger as funções mitocondriais e sinápticas, juntamente com a transdução de sinal neuronal. O processo global inibe a neurodegeneração, a gliose e a hiperfosforilação da proteína tau, sugerindo um efeito anti-Alzheimer. (B) O BCF, via ativação do CB2R, pode ativar o PPAR- γ e, eventualmente, o PI3K, Raf (membro da família serina / treonina-proteína cinase), quinase quinase MAP (MEK) -1/2 e ERK-1/2, que causa a sobrevivência das células neuronais.]	110
CAPÍTULO II		
Figura 1	O efeito do beta-cariofileno (BCF) na atividade convulsiva comportamental em camundongos tratados com ácido caínico (AC). Os camundongos foram pré-tratados com BCF (50 mg.kg ⁻¹ e 100 mg.kg ⁻¹) por 7 dias (n = 8) antes do AC (30 mg.kg ⁻¹ , i.p.). A atividade convulsiva comportamental foi avaliada de acordo com as escalas elaboradas por Racine.	138
CAPÍTULO III		
Figura 1	Estrutura química do beta-cariofileno	149
Figura 2	Avaliação da atividade locomotora de camundongos tratados com beta-cariofileno (BCF) nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg e diazepam (DZP) na dose de 2 mg/kg, através do teste <i>Rota Rod</i> . Em A, dados para tempo de permanência; e, em B, para o número de quedas	157
Figura 3	Efeito do BCF na avaliação da ansiedade pelo Labirinto em Cruz Elevado	158
Figura 4	Efeitos do BCF na avaliação da ansiedade pelo Teste de Claro-Escuro	159

Figura 5	Número de esferas de vidro enterradas por camundongos tratados, intraperitonealmente com BCF	160
Figura 6	Efeitos tóxicos do BCF em <i>A. salina</i>	161
Figura 7	Capacidade antioxidante do BCF na inibição do radical DPPH•, em diferentes concentrações	162
Figura 8	Capacidade antioxidante do BCF em diferentes concentrações na inibição do radical ABTS ^{•+}	163
Figura 9	Capacidade antioxidante do BCF em diferentes concentrações na remoção de radicais hidroxilas	164
Figura 10	Efeito do BCF aos danos induzidos pelo H ₂ O ₂ em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , (n = 4, leituras/concentração) durante o pré-tratamento	166
Figura 11	Efeito do BCF aos danos induzidos pelo H ₂ O ₂ em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , (n = 4, leituras/concentração) durante o pós-tratamento	167
Figura 12	Efeito do BCF aos danos induzidos pelo H ₂ O ₂ em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , (n = 4, leituras/concentração) durante o co-tratamento	168

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Fontes de beta-cariofileno (BCF) (porcentagens de óleos essenciais contendo seu conteúdo)	96
Tabela 2	Mecanismos moleculares de atividades neurofarmacológicas mediadas pelo beta-cariofileno	112

CAPÍTULO II

Tabela 1	Dados que representam atividade anticonvulsivante e neurotoxicidade de beta-cariofileno (camundongos ICR, i.p.)	137
-----------------	---	-----

CAPÍTULO III

Tabela 1	Descrição das linhagens e genótipos de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no estudo	154
Tabela 2	Protocolo experimental em linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	155
Tabela 3	Correlações de <i>Pearson</i> entre os dados obtidos nos testes comportamentais com os dados dos testes antioxidantes do beta-cariofileno	169

CAPÍTULO I

Tabela 1	Fontes de beta-cariofileno (BCF) (porcentagens de óleos essenciais contendo seu conteúdo)	95
Tabela 2	Mecanismos moleculares de atividades neurofarmacológicas mediadas pelo beta-cariofileno	111

CAPÍTULO II

Tabela 1	Dados que representam atividade anticonvulsivante e neurotoxicidade de beta-cariofileno (camundongos, i.p.)	136
-----------------	---	-----

CAPÍTULO III

Tabela 1	Descrição das linhagens e genótipos de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no estudo	153
Tabela 2	Protocolo experimental em linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	154
Tabela 3	Correlações de <i>Pearson</i> entre os dados obtidos nos testes comportamentais com os dados dos testes antioxidantes do beta-cariofileno	169

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 REFERENCIAL TEÓRICO	31
3.1 Os produtos naturais e suas atividades farmacológicas	32
3.2 Óleos essenciais e atividades farmacológicas	34
3.3 Atividades farmacológicas dos sesquiterpenos	37
3.4 Beta-cariofileno e suas atividades biológicas e /ou farmacológicas	39
3.4.1 Antioxidante	41
3.4.2 Antinociceptiva	43
3.4.3 Antitumoral	44
3.4.4 Antimicrobiana	44
3.4.5 Patologias neurológicas	45
3.5 Doenças em estudo	48
3.5.1 Epilepsia	48
3.5.2 Ansiedade	53
3.6 Tratamento de doenças neurológicas	55
3.6.1 Epilepsia	55
3.6.2 Ansiedade	57
3.7 Estresse oxidativo	58
3.8 Estresse oxidativo e doenças neurológicas	60
3.9 Defesas antioxidantes	62
3.10. Modelos de estudos comportamentais, toxicológicos e antioxidantes	65
3.10.1 Modelo para epilepsia	65
3.10.2 Modelo para ansiedade	67
3.11 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudos oxidativos/antioxidantes	68
REFERÊNCIAS	70
4. ANALÍSE EXPERIMENTAL	91
4.1 1º CAPÍTULO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE AS PERSPECTIVAS NEUROPROTETORAS DO BETA-CARIOFILENO	92
RESUMO	93
ABSTRACT	94
INTRODUÇÃO	94
MATERIAL E MÉTODOS	98
RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS	115

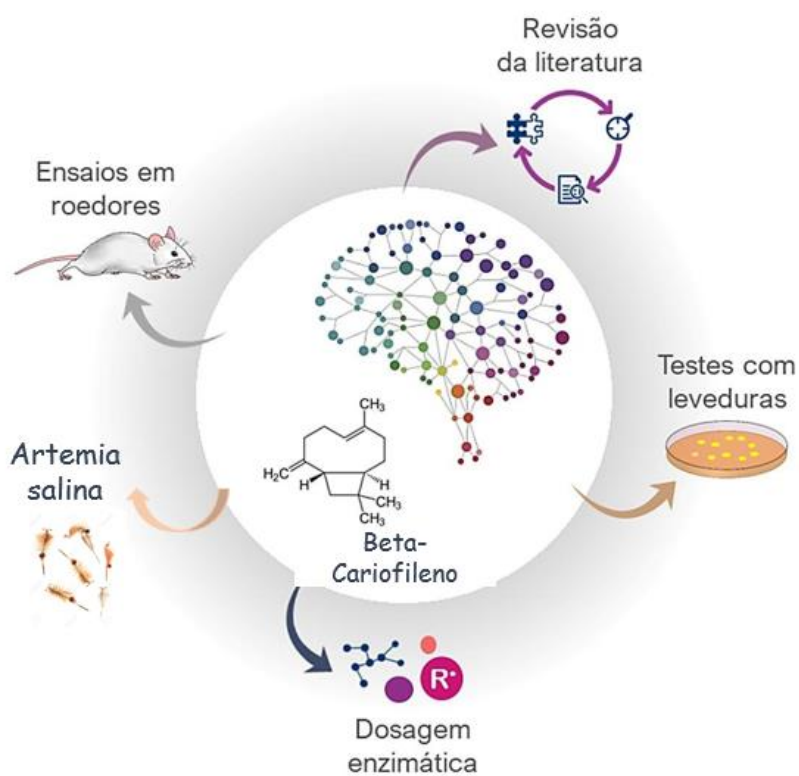
4.2 2º CAPÍTULO: CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO AGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE 2, B-CARIOFILENO EM MODELOS DE CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS 128

RESUMO	129
ABSTRACT	130
INTRODUÇÃO	132
MATERIAL E MÉTODOS	131
RESULTADOS	136
DISCUSSÃO	139
CONCLUSÃO	141
REFERÊNCIAS	142

4.3 3º CAPÍTULO: BETA-CARIOFILENO EM MODELOS ANIMAIS: PERSPECTIVAS PARA TERAPIAS DA ANSIEDADE 145

RESUMO	146
ABSTRACT	147
INTRODUÇÃO	147
MATERIAL E MÉTODOS	149
RESULTADOS	156
DISCUSSÃO	170
CONCLUSÃO	173
REFERÊNCIAS	174
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	181
ANEXOS	183

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a origem das patologias neuropsiquiátricas, doenças neurológicas (epilepsia) e transtornos emocionais (ansiedade), representa uma das áreas mais urgentes e difíceis da pesquisa científica atual (BAKER; CASWELL; ECCLES, 2019). Diversos estudos apontam associações entre estresse oxidativo e patologias no Sistema Nervoso Central (SNC), caracterizando o estresse oxidativo como um dos mecanismos para a etiologia de alterações no SNC de forma multifatorial (MACHADO *et al.*, 2018).

A epilepsia acomete cerca de 50 milhões de indivíduos no mundo e é caracterizada pela ocorrência de convulsões espontâneas recorrentes, em consequência da atividade neuronal excessiva (PEARSON *et al.*, 2015; WALSH *et al.*, 2016). É um distúrbio neurológico que se caracteriza por convulsões espontâneas, bem como pelo comprometimento da aprendizagem e da memória como um fator de comorbidade (VERROTTI *et al.*, 2015; CLARY; SNIVELY; HAMBERGER, 2018). Apesar das crises serem contidas com medicamentos antiepilépticos, ainda existem pacientes que permanecem refratários à terapia (VIDAURRE; GEDELA; YAROSZ, 2017).

A ansiedade se caracteriza como uma desordem emocional grave que pode surgir como um estado de tensão, como reações normais ao estresse até o momento em que começam a causar sofrimento (CUIJPERS, *et al.*, 2014) e se caracteriza como uma forma particular de inibição comportamental, sendo considerado o quarto transtorno psiquiátrico mais frequente, atingindo entre 2,5% e 3% da população mundial (FORMIGA *et al.*, 2012). Seu tratamento farmacológico de primeira linha são os benzodiazepínicos que, apesar da eficácia clínica, a maioria dos fármacos desta classe apresenta muitos problemas, como sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e risco de instabilidade genômica (GOMES JUNIOR *et al.*, 2018; CORNETT *et al.*, 2018).

Cabe ainda enfatizar que o uso crônico dos benzodiazepínicos pode levar a efeitos psicomotores, tolerância e dependência (MACHADO *et al.*, 2018). Assim, a busca de novas drogas vem despertando pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes antiepilépticos com melhor eficácia e segurança toxicogenética. É primordial ressaltar que a procura por alternativas com baixa toxicidade e que apresentem atividade antioxidante evidencia a

importância de estudos farmacológicos, a exemplo deste estudo, como uma possível alternativa terapêutica eficaz (SHAFIEE *et al.*, 2018).

O cérebro é especialmente vulnerável à lesão oxidativa devido à alta utilização de oxigênio e geração de radicais livres, mecanismos insuficientes de defesa antioxidantes, alto teor de ácidos graxos poli-insaturados oxidáveis e presença de metais ativos, de ferro e cobre, que catalisam reações que envolvem radicais livres (DIXON; STOCKWELL, 2014; KIM *et al.*, 2015). Além disso, funções dos sistemas antioxidantes podem estar alteradas durante a fisiopatologia das doenças que afetam o funcionamento do SNC (MECOCCI; POLIDORI, 2012) sendo, portanto, necessária a investigação de novos agentes que atuam no SNC com propriedades antioxidantes, considerando a importância de terapias com o uso de antioxidantes (HALLIWELL, 2006; BALMUS *et al.*, 2016) para interferir em processos inflamatórios, oxidantes, mitocondriais e apoptóticos que podem afetar funções cognitivas (HALLIWELL *et al.*, 2012), uma vez que aumento de dano oxidativo está implicado no desenvolvimento de ansiedade e epilepsia (BOUAYED; BOHN, 2010; VAVAKOVA *et al.*, 2015).

O beta-cariofileno (BCF) é um sesquiterpeno bicíclico que inclui os isômeros alfa (α), beta (β) e gama (γ). Dentre estes isômeros, o BCF desempenha um importante papel na química dos sesquiterpenoides, o qual está entre os sesquiterpenos mais encontrados em muitos óleos essenciais de alimentos vegetais como orégano (*Origanum vulgare* L.) (LOZANO *et al.*, 2004), pimenta (*Piper nigrum* L.) (ORAV *et al.*, 2004) e cravo (*Eugenia caryophyllata*) (SILVESTRI *et al.*, 2010). Estudos já desenvolvidos em vários modelos experimentais demonstraram promissoras atividades como anti-hiperglicêmico (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2014), antitumoral (LEGAULT; PICHETTE, 2007), analgésico, anti-inflamatório (BAKIR *et al.*, 2008), antimicrobiano (DAHAM *et al.*, 2015), antidepressivo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018) e ansiolítico (BAHI *et al.*, 2014), porém, sem mecanismo de ação.

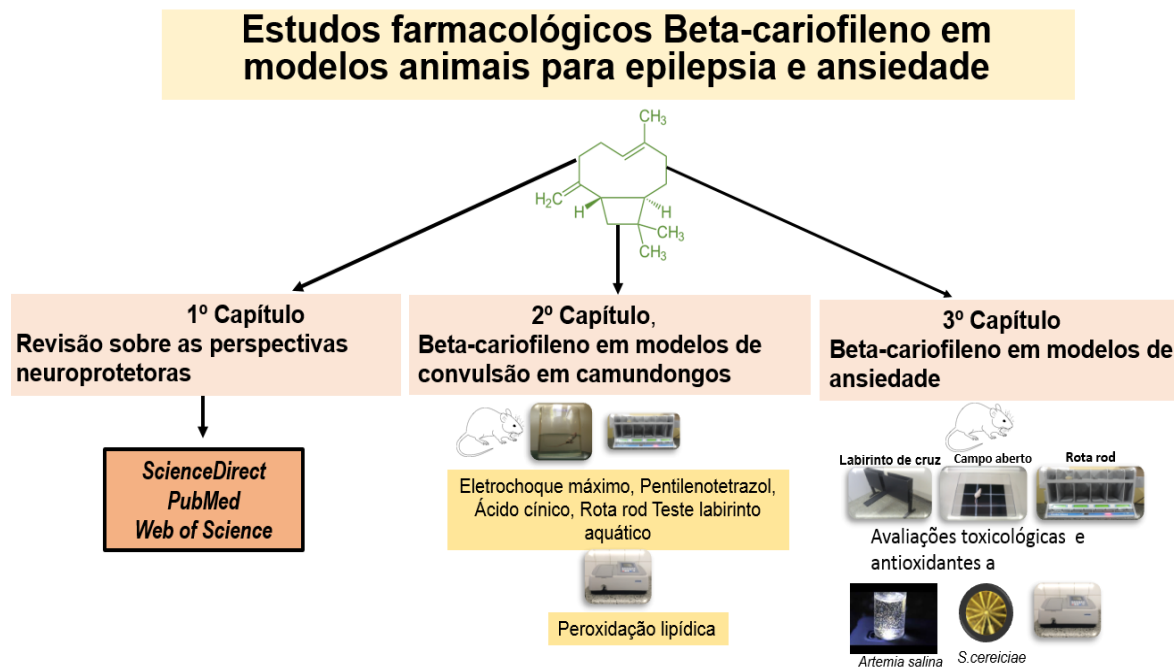
O BCF possui característica lipofílica, o que facilita sua entrada nas células. Vários constituintes de óleos essenciais possuem diferentes atividades biológicas no SNC, o que indica que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (ELMANN *et al.*, 2019). É um fitocanabinoide, que atua, seletivamente, sobre o receptor canabinoide-2 (CB2) e seus efeitos farmacológicos são bastante estudados (KLAUKE *et al.*, 2014). Estudos também

BCF tem demonstrado a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* frente às Espécies Reativas do Oxigênio (ERO's) evitando o dano oxidativo (DAHAM *et al.*, 2015).

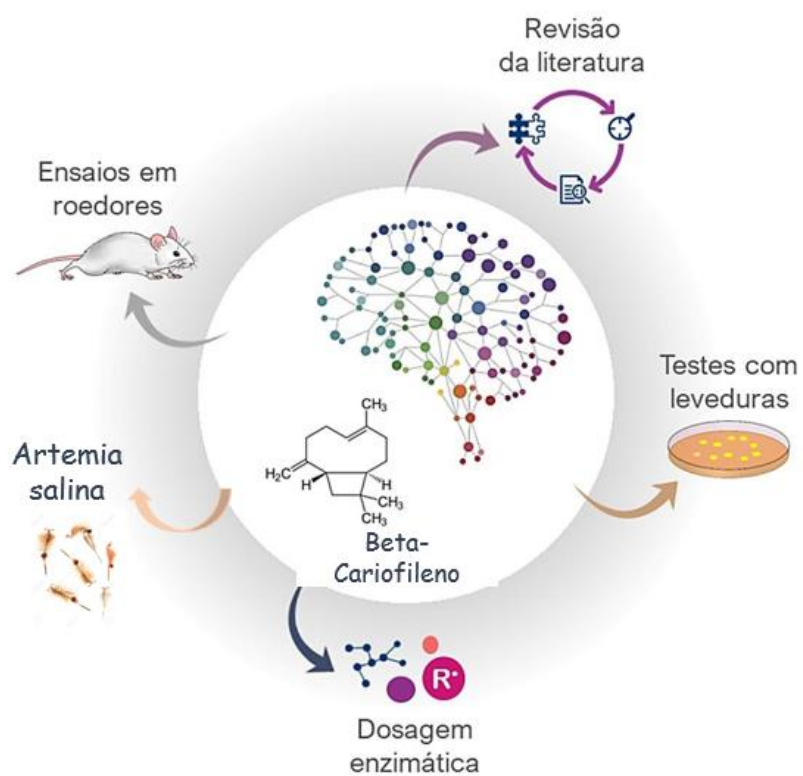
Devido sua alta prevalência e ausência de um tratamento antiepileptogênico com baixa toxicidade e maior eficácia, reforça a hipótese e necessidade da realização de novos estudos e criação de modelos animais experimentais que permitam compreender os mecanismos fisiopatológicos básicos e identificar tratamentos eficazes. Se considera válido o modelo animal, que é capaz de reproduzir características clínicas, que podem então ser transferidas para seres humanos ou outros animais (KANDRATAVICIUS, 2014; PERUCCA; BATTINO; TOMSON, 2014).

Assim, na perspectiva de contribuir com a produção científica na busca de novos fármacos para terapias de distúrbios neurológicos foi realizado o trabalho de tese intitulado: “Estudos farmacológicos do beta-cariofileno em modelos animais para epilepsia e ansiedade”. O estudo foi didaticamente dividido em capítulos (**Figura 1**): o **1º Capítulo** versa sobre “ **Uma revisão sistemática sobre as perspectivas neuroprotetoras do beta-cariofileno**” feita com base em artigos científicos submetidos e publicados em revistas de caráter internacional com o objetivo de fornecer uma maior abrangência sobre as atividades farmacológicas do beta-cariofileno nos resultados encontrados e torná-los disponíveis a outros grupos de pesquisa. O **2º Capítulo**, “**Caracterização farmacológica do agonista do receptor canabinoide 2, beta-cariofileno em modelos de convulsão em camundongos**”, que apresenta um estudo não clínico da atividade anticonvulsivante e investigação da memória espacial em camundongos, bem como estudo oxidativo na indução de peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos. O **3º Capítulo** intitulado de “**Beta-cariofileno em modelos animais: Perspectivas para terapias da ansiedade**” relata os efeitos ansiolíticos do beta-cariofileno, seus efeitos toxicogénicos em *Artemia salina* e *S. cerevisiae*, bem como suas atividades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*.

Figura 1: Organização da Tese



OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Geral

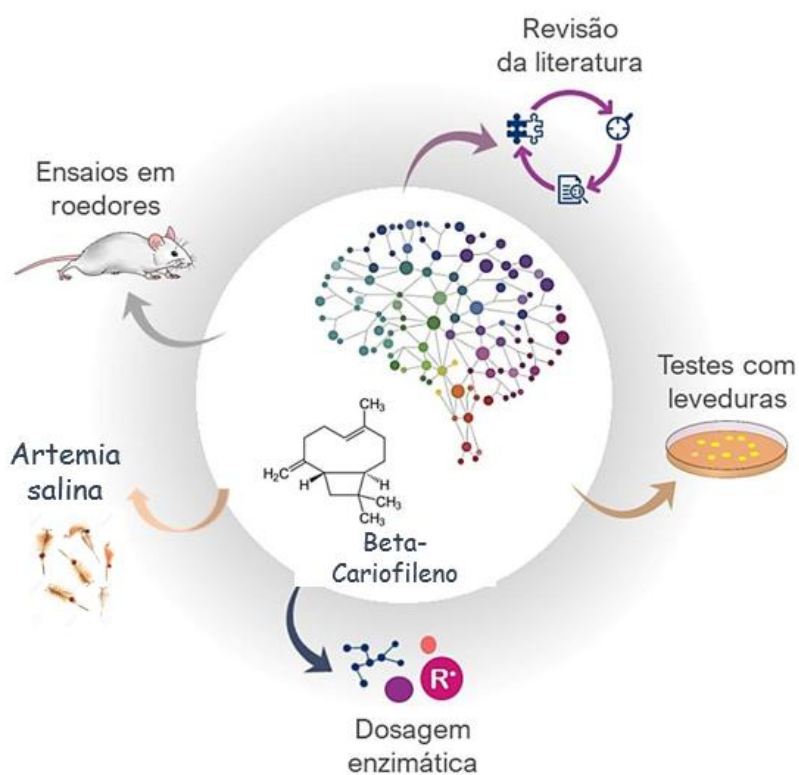
- Avaliar os efeitos farmacológicos do beta-cariofileno sobre o sistema nervoso central, em modelos experimentais de epilepsia e ansiedade, bem como caracterizar seus efeitos toxicológicos em *Artemia salina* e oxidante/antioxidantes, frente à captura de radicais livres e modulação de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, em *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Específicos

- Produzir artigo de revisão sistemática do beta-cariofileno sobre seus efeitos neuroprotetores com base em bancos de dados científicos;
- Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos, comportamentais e antiepilépticos do beta-cariofileno em modelos animais (camundongos) de epilepsia induzido por pentilenotetrazol e ácido caínico, e por meio dos testes de eletrochoque máximo, bem como determinar os níveis de peroxidação lipídica *ex vivo* no hipocampo de camundongos;
- Investigar os efeitos do beta-cariofileno nos possíveis prejuízos na memória induzidos em camundongos pelo teste de labirinto aquático de Morris.
- Verificar os possíveis efeitos ansiolíticos do beta-cariofileno em modelos animais nos testes comportamentais de *Rota Rod*, Labirinto em Cruz Elevado, Claro e Escuro e Teste de Esconder Esferas.
- Avaliar os efeitos tóxicos do beta-cariofileno em *Artemia salina* e seu potencial antioxidante *in vitro* frente aos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS^{•+}) e radicais hidroxila (OH[•]);

- Determinar os possíveis efeitos antioxidantes do beta-cariofileno em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

REFERENCIAL TEÓRICO



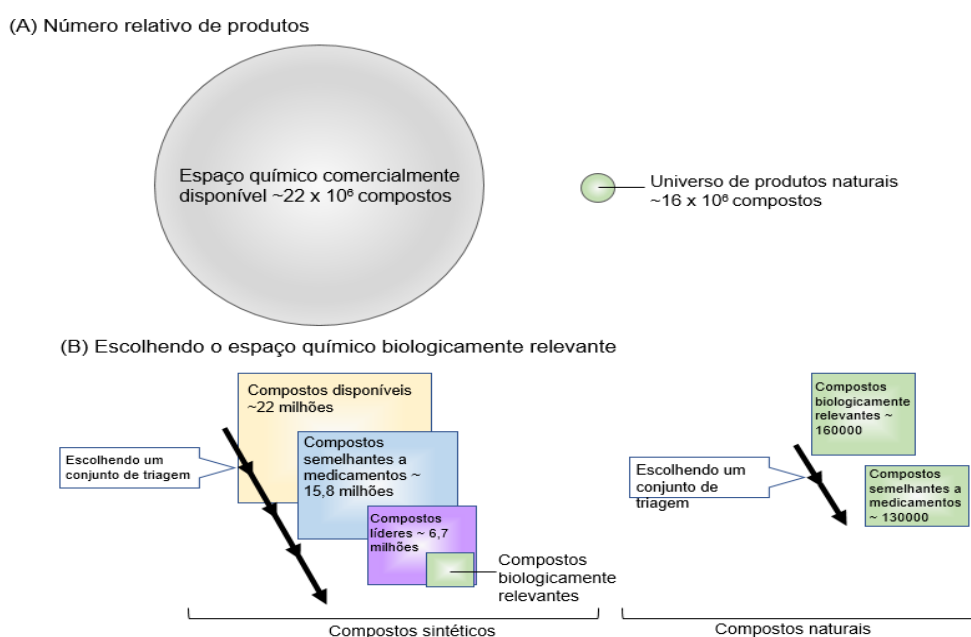
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Os produtos naturais e suas atividades farmacológicas

Os produtos naturais de plantas e animais são a principal fonte de praticamente todas as preparações medicinais, como também desempenham importante papel no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Assim, fornecendo pistas de novos compostos que entraram em ensaios clínicos, particularmente como agentes para indústria farmacêutica (HARVEY, 2008; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; NEWMAN; CRAG, 2012).

Cabe enfatizar que os produtos naturais possuem vantagem adicional em relação aos compostos sintéticos, pelas propriedades de "semelhanças com seus metabólitos" (HERT *et al.*, 2009). Tais compostos não são apenas biologicamente ativos, mas também são, substratos para um ou mais sistemas transportadores que podem guiar os compostos para o seu local de ação intracelular, colocando produtos naturais em espaço químico biologicamente mais relevante do que compostos sintéticos (**Figura 2**) (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Figura 2: Espaço químico biologicamente relevante de produtos naturais e compostos sintéticos.



Fonte: Adaptado de Harvey; Edrada-Ebel; Quinn, (2015)

Além da vantagem de “semelhança de metabólito”, é observado um grau elevado na biodisponibilidade desses compostos naturais, de particular importância, para a continuidade de testes mais funcionais em organismos modelo (SCHENOME *et al.*, 2013), principalmente pela análise de seu teor e de suas características fenotípicas (EGGERT, 2013). Existe uma ampla gama de indicações, além da atividade antimicrobiana, anticancerígena e em modelos de neuropatia diabética (JI *et al.*, 2013), como também propriedades farmacológicas como: antiviral (SONG *et al.*, 2017), anti-inflamatórios e antioxidantes (ROSAS; CORREA; DAS GRAÇAS HENRIQUES, 2017), para terapia de Alzheimer (ZHU *et al.*, 2013), e em especial para terapia de epilepsia (EKSTEIN; SCHACHTER, 2010; REHMAN *et al.*, 2019), o que assegura os estudos dos potenciais dos produtos naturais para a neuroproteção (**Figura 3**) (KHAZDAIR *et al.*, 2019).

Figura 3: Efeito neuroprotetor de produtos naturais de origem vegetal



Fonte: Adaptado de Khazdair et al. (2019)

3.2 Óleos essenciais e atividades farmacológicas

As plantas são as fontes importantes de compostos naturais com diversas bioatividades, permitindo seu uso para fins de produção de alimentos funcionais e medicinais (PETROVIĆ *et al.*, 2017). Especialmente, numerosas plantas aromáticas e especiarias são altamente valorizadas nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, devido à sua capacidade de fragrância (VALDERRAMA; RUIZ, 2018). Destas, são extraídos componentes naturais, biologicamente ativos, como os óleos essenciais (OEs) que são líquidos lipofílicos com propriedades farmacológicas (AMATISTE, *et al.*, 2014; HAMED; RAZAVI-ROHANI; GANDOMI, 2014; YOUSEFI *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por organismos vivos e isolados por meios físicos como por destilação de uma planta inteira ou parte de planta de origem taxonômica conhecida (FRANZ, 2010; BASER; WINDISCH, 2010). O termo “óleos essenciais” surgiu porque “óleos” foram supostamente “essenciais” para a vida, e têm uma longa história de uso humano para fins cosméticos e medicinais. Estima-se que, de 3.000 óleos essenciais conhecidos, 300 foram reconhecidos como comercialmente importantes (ZHAI *et al.*, 2018). São fluidos hidrofóbicos e aromáticos extraídos de diversas plantas, que possui uma composição química complexa (HERAVI; PARASTAR, 2011; BONIFÁCIO *et al.*, 2014). Estes óleos são compostos por moléculas voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropenos (FRANZ, 2010).


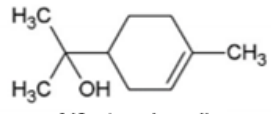
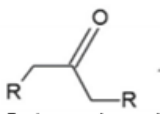
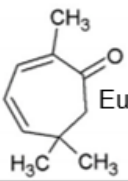
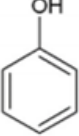
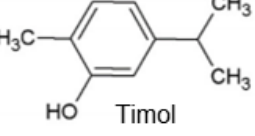
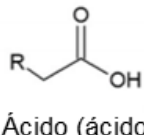
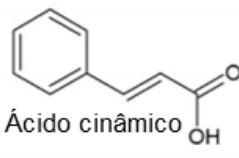
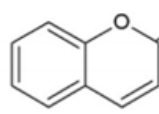
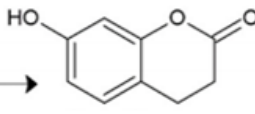
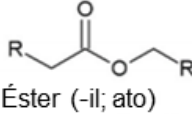
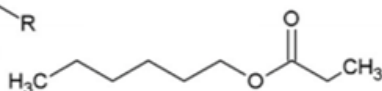
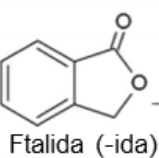
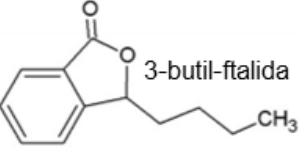
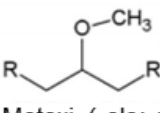
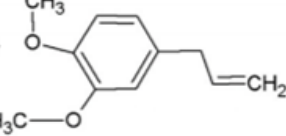
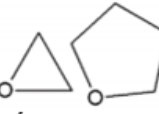
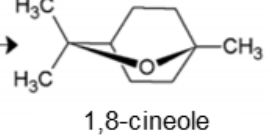

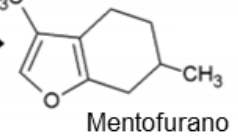
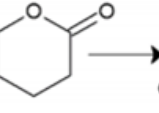
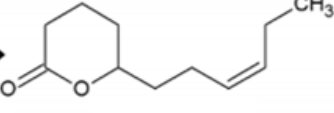
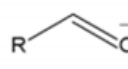
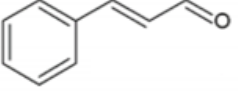
Seus componentes são biossintetizados pelas plantas como metabólitos secundários e desempenham um papel importante na proteção contra patógenos e predadores (ASBAHANI *et al.*, 2015). Uma composição tão complexa de OEs carrega um amplo espectro de aplicações possíveis em muitos campos, por exemplo, de alimentos, agrícola e farmacêutico (TUREK *et al.*, 2013; De MATOS *et al.*, 2018). Os compostos com bioativos naturais que têm efeitos positivos sobre os seres humanos e animais (PUVACA *et al.*, 2013). Por causa das propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados como medicamentos tradicionais para prevenir ou melhorar a saúde em humanos (KIM; FAN; APPLGATE, 2008; BRENES; ROURA, 2010). Os componentes bioativos em óleos essenciais estão sendo

identificados e alguns progressos foram feitos para elucidar os mecanismos subjacentes às funções desses compostos em animais, levando ao aumento dos esforços de pesquisa que visam à utilização de óleos essenciais (LI *et al.*, 2012), até mesmo para obtenção de compostos sintéticos (STATHAKIS; GKIZIS; ZOGRAFOS, 2016).

Grupos funcionais de óleos essenciais farmacologicamente significativos são em sua maioria de origem terpenoide e não terpenoide, A respeito dos óleos essenciais comercialmente significativos, os hidrocarbonetos monoterpênicos se destacam, como o α -pineno (ISMAN; MACHIAL, 2006), o limoneno (CIRIMINNA *et al.*, 2014) ou o p -cimeno (FADEL *et al.*, 2011). Os monoterpênicos têm pronunciado efeitos antivirais e produzem um efeito de secagem na pele (SCHNAUBELT, 1999). Deve se destacar a importância de veiculação para o melhor uso de óleo essenciais, como no exemplo do fenil hidrocarboneto p -cimeno, devido a seus efeitos de sensibilização da pele. Portanto, óleos essenciais ricos em p -cimeno devem ser evitados em aplicações tópicas (BOWLES, 2003). Os fenóis também podem demonstrar esses efeitos, juntamente com hepatotoxicidade, se ingeridos em concentrações elevadas ou concentrações moderadas durante um longo período. Quanto a sesquiterpenos, como o α -bisabolol e chamazuleno, foram associados à atividade anti-inflamatória (SADGROVE; JONES, 2015).

Diversos óleos voláteis possuem uma variedade de atividades farmacológicas ansiolítica (ALMEIDA *et al.*, 2012), antiepiléptica (COSTA *et al.*, 2012), anticancerígenos (ALENCAR *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2016; ISLAM, 2017) e/ou antinociceptiva (CAMPELO *et al.*, 2011) entre outras. Estes efeitos são, provavelmente, devido à diversidade estrutural dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas (MELO *et al.*, 2010). Considerando o fato de que os óleos essenciais e os seus constituintes são utilizados em cosméticos e produtos farmacêuticos, é de grande relevância analisar o potencial farmacológico destes compostos. Além disso, deve ser destacado que a farmacologia dos óleos essenciais é influenciada por seus grupos funcionais (SADGROVE; JONES, 2015) (**Figura 4**).

Figura 4: Tipos farmacológicos de óleos essenciais definidos por grupo funcional

Grupo funcional –(nome final)	Exemplo	Grupo funcional –(nome final)	Exemplo
 Álcool (-ol)	 Alfa-terpineol	 Cetona (-ona)	 Eucarvona
 Fenol (-ol)	 Timol	 Ácido (ácido - óico)	 Ácido cinâmico
 Cumarina (-ina; ona)	 Umbelifenora	 Éster (-il; ato)	 Hexil propionato
 Ftalida (-ida)	 3-butil-ftalida	 Metoxi (-ole; ol) = Éster metil	 Metil eugenol
 Óxido (-ole) = éter cíclico	 1,8-cineole	 Furano (-furano)	 Mentofurano
 Lactona (-ona)	 Jasmolactona	 Aldeído (-al)	 Cinamaldeído

R = H ou R = molécula restante

Fonte: Sadgrove; Jones, (2015)

Grupos químicos específicos como fenol de óleos essenciais, contendo carvacrol, tem sido potencialmente implicado em atividade antioxidante (ARISTATILE *et al.*, 2011). Entretanto, em concentrações mais elevadas, juntamente com uma série de outros fenóis e mais especificamente, fenilpropanoides, como o safrole; eugenol metilado, demonstram hepatotoxicidade (BURT, 2004; JIN *et al.*, 2011; HERRMANN *et al.*, 2013). A

exemplo de aldeídos, o citronelal desempenha efeito repelente contra insetos (MAIA; MOORE, 2011).

O terpenoide cânfora, bem conhecido por ser uma cetona, este continua a ser usado para redução de dores musculares (BARKIN, 2013) e possui atividade antimicrobiana (ANAND *et al.*, 2011; CHEN; VERMAAK; VILJOEN, 2013). Os éteres quando ocorrem em estruturas cíclicas são denominados de óxidos, o representante mais conhecido desse grupo é o eucalipol. As plantas detentoras deste composto produzem efeitos expectorantes, utilizados no descongestionamento em pacientes resfriados e com tosse (BASER; BUCHBAUER, 2010). As lactonas são encontradas em diversos óleos essenciais (ZUZART; SALGUEIRO, 2015) e o seu nome é resultante do ácido láctico (C₃H₆O₃). Efeitos expectorantes desses compostos já foram observados, mas ainda existem divergências sobre a aplicação tópica, devido alguns estudos destacarem sensibilização cutânea. Entretanto, as lactonas também possuem atividade anti-inflamatória e contra o câncer (MERFORT, 2011; MATHEMA *et al.*, 2012).

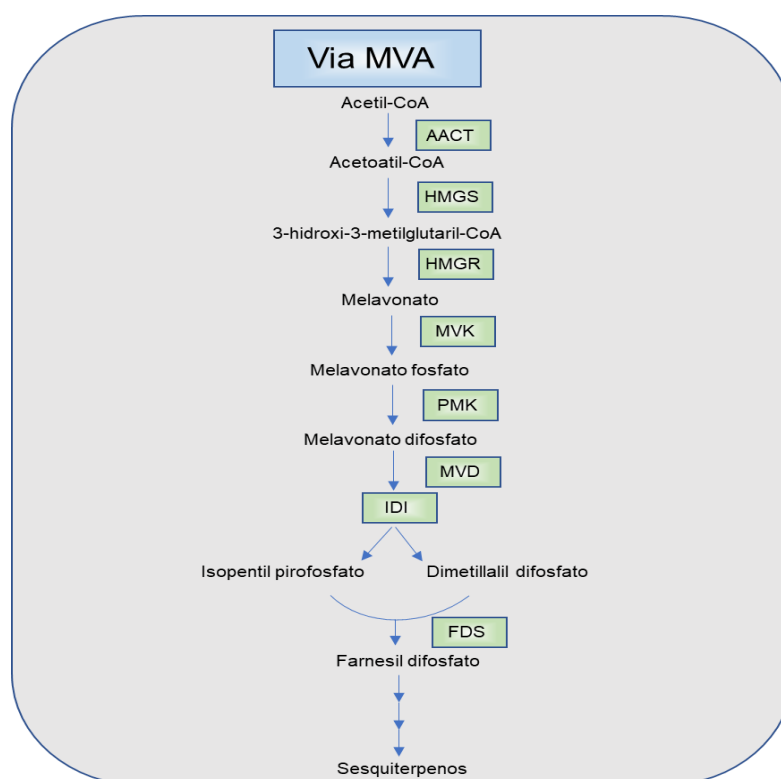
As cumarinas estão associadas à atividade anticoagulante. Esse efeito pode ser empregado no tratamento de doenças cardiovasculares (BOWLES, 2003). Estudos com cumarinas biologicamente ativas isopsoraleno, xantiletina, extraídas em óleos essenciais, podem ser implicadas nos usos terapêuticos tradicionais (SADGROVE; JONES, 2015).

3.3 Atividades farmacológicas dos sesquiterpenos

Os sesquiterpenos são compostos orgânicos encontrados nas células secretoras das *Asteraceae*, os laticíferos, assim como nos vacúolos de diversas plantas que estão sobre estresse, que são culturalmente utilizados para tratamento de diarreias, queimaduras, resfriados e neurodegradação (CHADWICK *et al.*, 2013). São biossintetizados pelas plantas no seu retículo endoplasmático por enzimas específicas e modificados por outras através de oxidação e glicosilação. Esse processo dá a capacidade de sintetizar diversas estruturas como metabolitos secundários (**Figura 5**) que são compostos por uma configuração inicial de 15 carbonos, apresentando-se em formas cíclicas quando funcionais (CHADWICK *et al.*, 2013). Estas diversas estruturações produzidas

podem ter sido decorrentes de uma dinâmica evolutiva contra qualquer injúria que a mesma tenha sido exposta (PERASSOLO *et al.*, 2018).

Figura 5: Representação esquemática da biossíntese dos sesquiterpenos



Fonte: Adaptado de Perassolo *et al.* (2018)

Notas: AACT: acetoacetil-CoA tiolase. HMGS: HMGS-CoA sintase. HMGR: HMGS-CoA redutase. MVK: melavonato quinase. PMK: fosfomelavonato quinase. MVD: melavonato difosfato descarboxilase. IDI: isoprenil difosfato isomerase. FDS: farnesil difosfato sintase.

Pela sua ampla modificação nas plantas, de tempos em tempos, são descobertos novos tipos de sesquiterpenos. Entre 2006 e 2011 foram descobertos 65; e, mais recentemente, no ano de 2017, foram descritas mais 12 estruturas inéditas, o que demonstra a ampla diversidade que existe deste composto (FRAGA, 2012; CHEN *et al.*, 2017). Por conta deste uso cultural, pesquisas mais aprofundadas foram feitas sob o seu efeito biológico. Nestes estudos foram observadas diversas atividades como anti-inflamatório, antitumoral, doenças cardiovasculares, antimutagênica, antimicrobiana, antifúngica e atividade antioxidante. As duas últimas atividades estão intimamente ligadas em que auxiliam a proteção das plantas contra agressões (CHADWICK *et al.*, 2013; KUBO *et al.*, 1996).

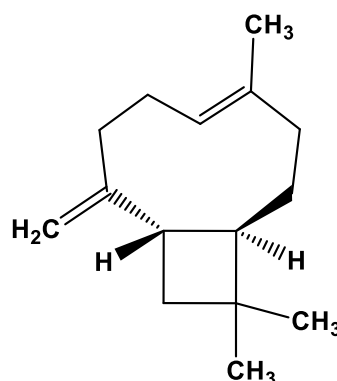
A atividade antimicrobiana atribuída de forma ampla aos sesquiterpenos está relacionada à capacidade de aumentar a permeabilidade da parede celular dos fungos e bactérias, facilitando a passagem dos antibióticos, funcionando, principalmente, como um modulador (BREHN-STECHER; JOHNSON, 2003). E, por conta desta enorme gama de atividades e mecanismos apresentados pelos sesquiterpenoides, estudos para um maior conhecimento deles são necessários (STATHAKIS; GKIZIS; ZOGRAFOS, 2016).

Uma possível justificativa da sua ação já havia sido discutida por um grupo de pesquisadores em 1996. Após análises feitas em linhagens celulares conseguiram pressupor a atuação dos sesquiterpenos, principalmente as variações do cariofileno, como atuante direto na redução da peroxidação em até 70%, dependendo da variação. Quando analisados os efeitos citotóxicos do beta-cariofileno, em diversas linhagens celulares tumorais, especialmente sobre as células de câncer de mama de isolamento clínico obteve seu maior potencial de ação antitumoral (KUBO *et al.*, 1996).

3.4 Beta-cariofileno e suas atividades biológicas e /ou farmacológicas

O beta-cariofileno (C₁₅H₂₄) (4,11,11-trimetil-8-metilenobicyclo[7,2,0]undec-4-eno) **Figura 6**, é um sesquiterpeno bicíclico encontrado em óleos essenciais de várias plantas, como por exemplo, *Piper nigrum* (POLITEO *et al.*, 2011), *Zingiber nimmonii* (SABULAL *et al.*, 2006), e no óleo, ou bálsamo, de copaíba, *Copaifera reticulata* (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007). Vem sendo muito utilizado na medicina popular nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, é uma das substâncias voláteis expelidas pelo milho, com o propósito de minimizar danos provocados por animais herbívoros ou por patógenos (RASMANN *et al.*, 2005).

Figura 6: Estrutura molecular do 4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo [7,2,0] undec-4-eno.



Fonte: dos autores

Em resposta a ataques de herbívoros ou mudança nos fatores abióticos, o beta-cariofileno (BCF) liberado pelas plantas na atmosfera (BORGES *et al.*, 2013), é também comercialmente utilizado no setor alimentício e de cosméticos, devido ao seu odor característico (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016). Além disso, o BCF tem demonstrado diferentes propriedades farmacológicas, tais como antitumoral (LEGAULT; PICHETTE, 2007), analgésico, anti-inflamatório (BAKIR *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2013), anti-hiperglicêmico (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2014) antimicrobiano (DAHAM *et al.*, 2010) antidepressivo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018) antioxidante (DAHAM *et al.*, 2015) e ansiolítico (BAHI *et al.*, 2014).

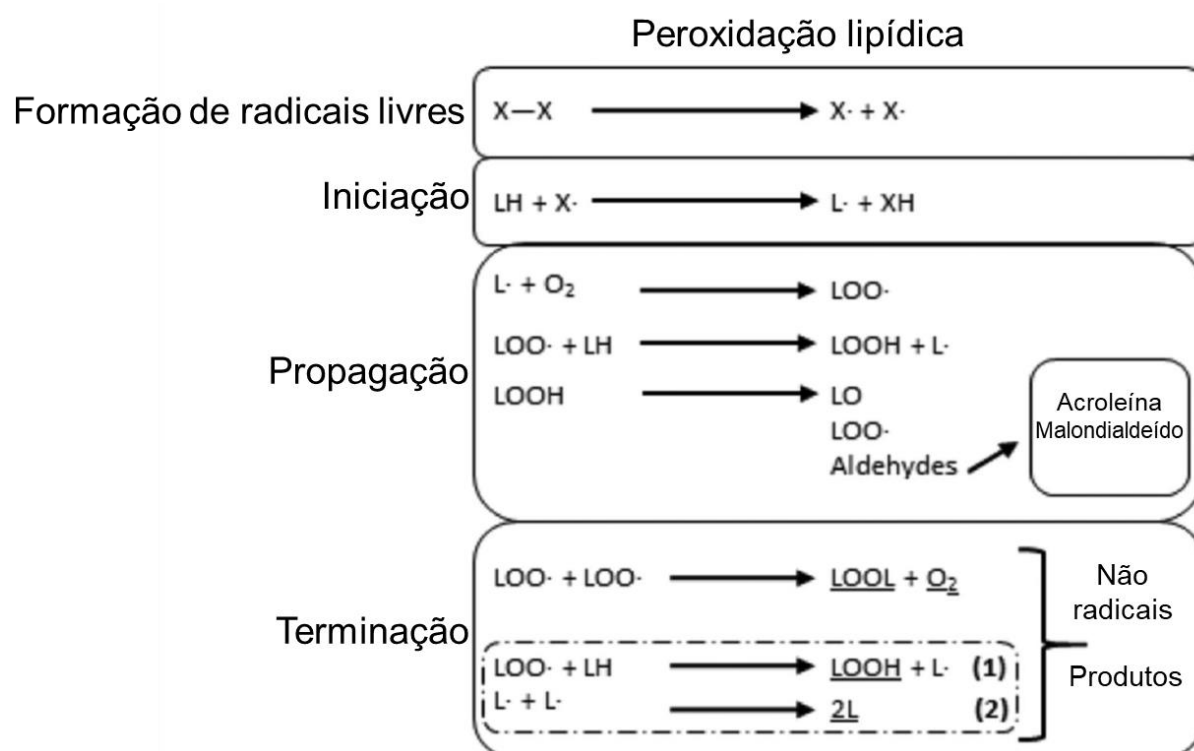
Apresenta um odor “amadeirado” e picante característico, o que tem feito com que o BCF seja utilizado em alguns alimentos e bebidas para conferir sabor cítrico; e como aromatizante em detergentes, sabões, loções e cremes. Além disso, também está presente na lista dos “Aditivos Permitidos em produtos do tabaco” no Reino Unido (DI SOTTO *et al.*, 2010). Estudos destacam o efeito protetor do sistema de sinalização canabinoide, visto que o BCF atua como um agonista do CB2, sugerindo que o composto exerce efeitos profiláticos e curativos contra distúrbios neuronais inflamatórios por meio de seu mecanismo antioxidante e anti-inflamatório (SANTOS *et al.*, 2017; GERTSCH, 2017).

O BCF foi aprovado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos e agências europeias como aditivo alimentar, intensificador de sabor e agente aromatizante (CHICCA *et al.*, 2014). É também um agonista CB2

completo que pode ser usado para tratar vários distúrbios, como isquemia cerebral (PERTWEE, 2009) e lesões (ZARRUK *et al.*, 2012), lesões cerebrais (ZHANG *et al.*, 2008), neuroinflamação (ZHANG *et al.*, 2009), bem como problemas em células gliais, do hipocampo e cerebelo (LANCIEGO *et al.*, 2011). O BCF atua como um potente antagonista dos receptores de acetilcolina nicotínicos e é desprovido de efeitos mediados por receptores serotoninérgicos e GABAérgicos (KATSUYAMA *et al.*, 2013).

3.4.1 Antioxidante

A ação antioxidante BCF foi demonstrada pela capacidade protetora contra fibrose hepática pela inibição 5-lipoxigenase, que participa ativamente do processo de fibrogênese, e reduziu na peroxidação lipídica e mostrou alta atividade de eliminação contra radical hidroxila e ânion superóxido (CALLEJA *et al.*, 2013). O modelo de fibrose hepática foi desenvolvido pela indução do estresse oxidativo. Portanto, a atividade hepatoprotetora observada se deve, principalmente, à capacidade antioxidante como o processo de inibição da peroxidação lipídica, que requer três etapas principais, com a formação de radicais livres, ocorre a iniciação em que começa via ataque desses radicais e abstração de prótons de um lipídeo insaturado para um radical lipídico, que reage com o oxigênio molecular de outro lipídeo insaturado para formar radical lipoperoxil ou se regenera para novo radical lipídico, respectivamente. A propagação desses radicais continua até a terminar peroxidação lipídica formando qualquer espécie reativa ou lipídica (REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012) (**Figura 7**).

Figura 7: Mecanismos gerais da peroxidação lipídica

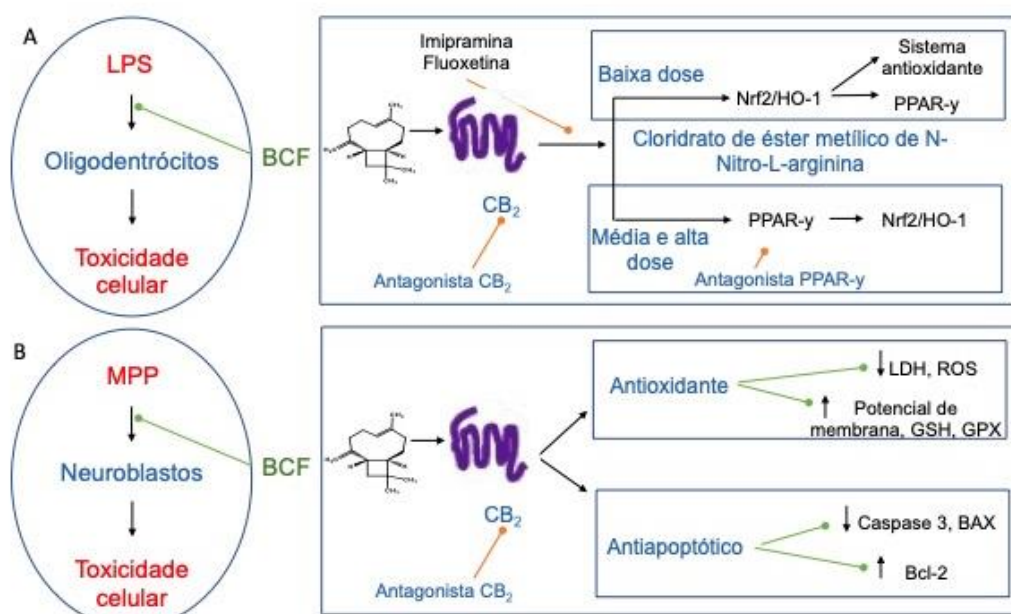
Fonte: Adaptado de Repetto; Semprine; Boveris, 2012.

Em outro estudo, o BCF a 50 mg/kg (ip) reduziu a atividade da óxido nítrico sintase indutível (iNOS), restaurando as enzimas antioxidantes e inibindo a peroxidação lipídica e depleção de glutathiona em ratos *Wistar*. Os resultados de pesquisas indicam que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e NO é conhecida por induzir toxicidade neuronal. Desta forma, o efeito antioxidante pode estar ligado à sua atividade neuroprotetora (KOUSAI *et al.*, 2004; ISLAM *et al.*, 2016).

O tratamento com BCF exerceu significativo efeito cardioprotetor por seu efeito agonista do receptor CB₂ ao recuperar os tecidos do coração, melhorando a função cardíaca, mitigando o estresse oxidativo, a inflamação e a apoptose em ratos tratados com doxorubicina (MEERAN *et al.*, 2019). Askari e Shafiee-Nick (2019) demonstraram efeitos protetores da BCF contra a toxicidade em oligodendrócitos induzidos por lipopolissacarídeo foram mediados via receptor CB₂ através de diferentes vias, em baixa (0,2 e 1 μM), e altas concentrações (10–50 μM), respectivamente (**Figura 8 A**). O efeito neuroprotetor e antioxidante do BCF é promissor ainda pela capacidade de agir, sinergicamente, com outros medicamentos, a exemplo da imipramina e fluoxetina em distúrbios

neurodegenerativos. O tratamento de BCF restaurou a viabilidade celular em células SH-SY5Y (neuroblastos) suprimindo a liberação de desidrogenase láctica induzida por 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP), a geração de espécies reativas de oxigênio, preveniu a apoptose induzida por MPP + de SH-SY5Y através da inibição da regulação positiva de Caspase-3 clivada, Bax, e restaurando a expressão de Bcl-2. Além disso, restaurou a redução no potencial de membrana mitocondrial induzida por MPP, aumentou a atividade intracelular de glutatona e glutatona peroxidase (**Figura 8 B**) (WANG; MA; DU, 2018; ASKARI e SHAFIEE-NICK, 2019).

Figura 8: Efeitos antioxidante e neuroprotetor do BCF.



Fonte: Adaptado de Askari e Shafiee-Nick (2019)

Notas: LPS: lipopolissacarídeo. CB₂: receptor canabidioide 2. Nrf2: fator nuclear fator 2 relacionado ao eritrócito 2. HO-1: heme oxigenase. PPAR-γ: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma. BAX: proteína X associada a BCL2. BCL-2: linfoma de células B2.

3.4.2 Antinociceptiva

Os efeitos antinociceptivos do BCF não foram estudados isoladamente, mas em óleo essencial de *Piper aleyreanum*, que contém elevados níveis desse composto. E foi observado redução significativa das fases neurogênicas e inflamatórias em ratos que receberam doses via oral (1000 mg/Kg) do OE contendo BCF. Também foi demonstrado efeito gastroprotetor nesses animais

com restauração dos níveis de GSH gástrico (LIMA *et al.*, 2012). O mesmo efeito antinociceptivo foi observado no OE de *Hypytis fruticosa*, com efeito significativo em doses subcutâneas de 100, 200 e 400 mg/Kg em ratos (MENEZES *et al.*, 2007).

3.4.3 Antitumoral

O BCF exibiu efeitos antiproliferativos contra células cancerosas do cólon, induzindo a apoptose via condensação nuclear e fragmentação (DAHAM *et al.*, 2015). O mesmo efeito apoptótico foi observado no efeito sinérgico com o fitol em células cancerígenas epidermoides (PAVITHRA; MEHTA; VERMA, 2018) e com doxorubicina em células de câncer de mama ativando apoptose (HANUŠOVÁ *et al.*, 2017). Dahham *et al.* (2016) demonstraram que OE de *Aquilaria crassna* contendo BCF reduziu a migração e viabilidade celular de células cancerígenas de pâncreas significativamente.

3.4.4 Antimicrobianas

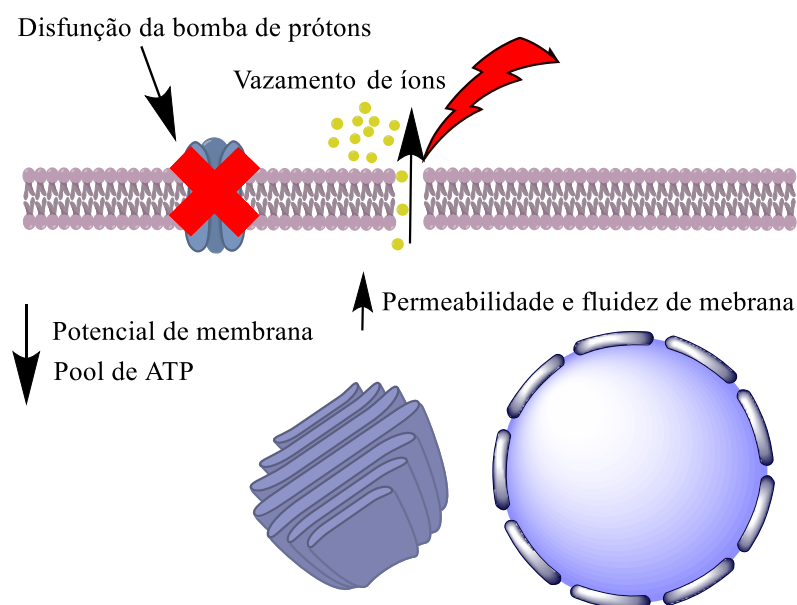
Yoo e Jwa (2018) demonstraram a atividade antimicrobiana do BCF contra *Streptococcus mutans* pela inibição de glicosiltransferase, uma das enzimas responsáveis por sintetizar glucano insolúvel que ajuda na agregação bacteriana (KRETH *et al.*, 2008). O BCF tem atividade antimicrobiana contra bactérias aeróbicas gram-positivas e bactérias aeróbicas gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (YANG; HU; FENG, 2015; DAHAM *et al.*, 2015) *Pseudomonas aeruginosa* (DE OLIVEIRA NEVES *et al.*, 2018) e antifúngico (DE OLIVEIRA NEVES *et al.*, 2018). Curiosamente, o BCF é mais eficaz contra bactérias gram-positivas do que as bactérias gram-negativas (DAHAM *et al.*, 2015).

Além disso, os extratos incluindo beta-cariofileno da *Artemisia feddei* mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias orais relacionadas à cárie dentária e periodontite (CHA *et al.*, 2007). Pode-se inferir que *S. aureus* foi mais suscetível à ação do BCF do que bactérias gram-negativas, devido à ausência de qualquer membrana externa protetora capaz de restringir a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipopolissacarídica. No entanto,

nem todos os estudos concordam com a maior suscetibilidade de gram-positivos (BURT, 2004).

Os OEs possuem mecanismos de ação contra microorganismos complexos e ainda não foram completamente explicados. Esses mecanismos são geralmente reconhecidos relacionados à natureza hidrofóbica dos OEs, que são capazes de alterar a estrutura da membrana celular, expandindo-a, aumentando sua fluidez / permeabilidade e, conseqüentemente, afetando os processos de transporte (BURT, 2004). Este mecanismo pode levar ao vazamento de íons, diminuição do potencial de membrana, disfunção da bomba de prótons e enfraquecimento do pool de ATP (**Figura 9**), efeitos que já foram atribuídos à BCF (HUANG *et al.*, 2012). Deve se ressaltar que há perspectiva no uso de OEs como o BCF em conjunto com antibióticos para tratamento de infecções (PÉREZ ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018).

Figura 9: Mecanismos de ação antibacteriano do BCF.



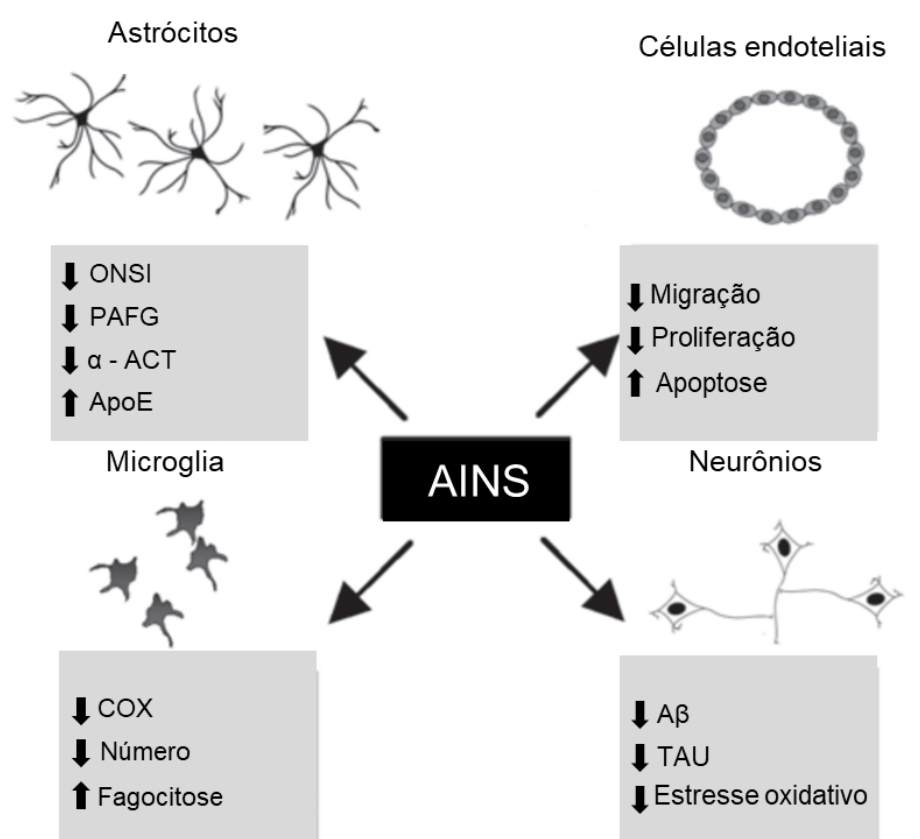
Fonte: Notas: SHARIFI-RAD *et al.*, 2018.
ATP: adenosina trifosfato.

3.4.5 Patologias neurológicas

Há um aumento na pesquisa de doenças neurológicas para a melhor elucidação de seus mecanismos patológicos e potenciais fatores de risco

(CHECKOWAY; LUNDIN; KELADA, 2011). Essas patologias estão associadas a etiologias multifatoriais, problemas sociais e financeiros (SAXENA; PICO, 2011). Nesse sentido, compostos com capacidade anti-inflamatória, que agem em diversos sistemas celulares (**Figura 10**), têm sido sugeridos para reduzir o risco do desenvolvimento ou adiar a progressão de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (MCGEER; SCHULZER; MCGEER, 1996; LLEO; GALEA; SASTRE, 2007).

Figura 10: Alvos celulares de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) visando diferentes populações celulares.



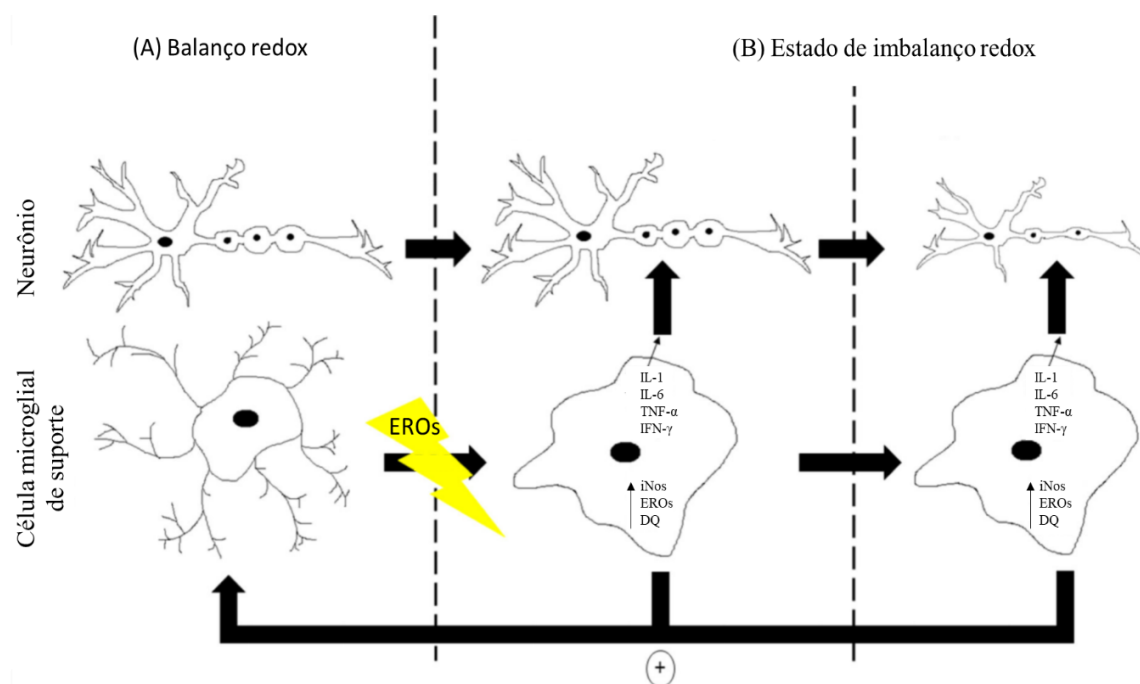
Fonte: Adaptado de Lleo; Galea; Satre, (2007).

Notas: ONSI: óxido nítrico sintase induzível. PAFG: proteína ácida fibrilar glial. α -ACT: α -quimiotripisina. ApoE: Apolipoproteína E. COX: ciclooxigenase. A β : peptídeo β -amiloide. TAU: proteína TAU. AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais.

Além disso, processos patológicos, incluindo inflamação, estresse oxidativo, apoptose, disfunção mitocondrial e fatores genéticos, levam à degeneração neuronal na doença de *Parkinson* (BEAL, 2003; FAROOQUI; FAROOQUI, 2011). O estresse oxidativo foi relatado por uma das principais causas do desenvolvimento e ou piora no quadro clínico da depressão,

ansiedade e epilepsia (PATKI *et al.*, 2013; PATEL, 2004; SHIN *et al.*, 2011). Portanto, a baixa atividade antioxidante do cérebro em relação a outros tecidos, tornou o tecido cerebral suscetível a danos oxidativos e a possíveis complicações neurológicas (**Figura 11**).

Figura 11: Modelo de ativação microglial induzida por estresse oxidativo na regulação da neurodegeneração.

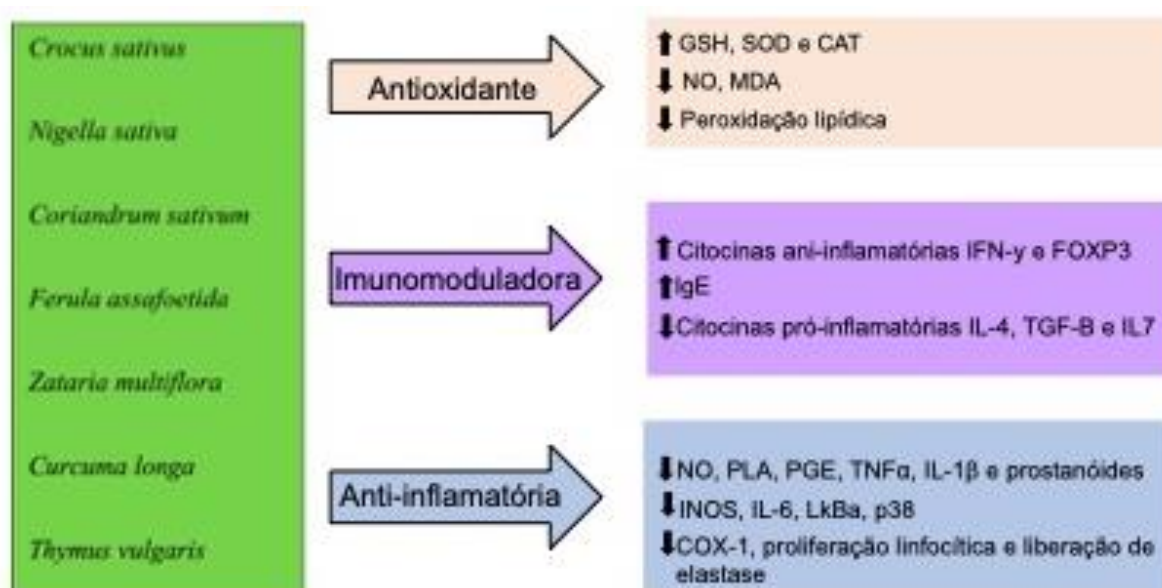


Fonte: SHIN *et al.*, 2011

Notas: ERO's: espécies reativas do oxigênio. IL-1: interleucina-1. IL-6: interleucina 6. COX-1: ciclooxygenase-1. iNOS: óxido nítrico sintase indutível. TNF- α : fator de necrose tumoral α . DQ: dopamina-quinonas. IFN- γ : interferon γ .

É observado que antioxidantes como a enzima superóxido dismutase (SOD) (CAMELLO-ALMARAZ *et al.*, 2008) e antioxidante não enzimático, como grupo tiol total (TEWARI *et al.*, 2014), estão presentes no cérebro. Também são encontrados altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, no sistema nervoso central, que são sensíveis às reações de peroxidação (CAMELLO-ALMARAZ *et al.*, 2008). A investigação de produtos naturais evidencia ser fonte de possíveis candidatos para o tratamento de patologias neurológicas por suas propriedades medicinais como antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (**Figura 12**) (KHAZDAIR *et al.*, 2019)

Figura 12: Mecanismo diferente de propriedades médicas de ervas medicinais



Fonte: Adaptado de Khazdair *et al.* (2019)

Notas: GSH: glutationa. SOD: superóxido dismutase. CAT: catalase. NO: óxido nítrico. MDA: malondialdeído. PLA: Fosfolipase A2. PGE2: Prostaglandina-E2. IL-1β: interleucina-1β. IL-6: interleucina 6. COX-1: ciclooxigenase-1. iNOS: óxido nítrico sintase indutível.

3.5 Doenças em estudo

3.5.1 Epilepsia

As crises epilépticas são conhecidas por ser uma série de convulsões, evidenciada pela incidência transitória de alguns sinais e/ou sintomas e são classificadas de acordo como a consciência atingida (convulsões conscientes focais ou conscientes generalizadas) e se há envolvimento motor. Sintomas e sinais específicos, tais como automatismos, mioclônicas ou atividade tônico-clônica, podem ser usados para sua classificação (FISHER *et al.*, 2017; FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). As crises que levam ao envolvimento motor bilateral geralmente têm a fase do endurecimento (tônico), seguidas por uma fase de contração muscular (clônica), e são conhecidas como convulsões tônico-clônicas (também conhecidas como convulsões “grande mal”) (JOHNSON, 2018).

A epilepsia é uma condição neurológica comum, representando cerca de 30 a 35% dos casos (MACCOTTA *et al.*, 2013; CURTIS; AVOLI, 2015). Pode surgir de patologias cerebrais subjacentes variadas, do neurodesenvolvimento,

de distúrbios, tumores, acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas. Portanto, não é uma doença isolada (**Figura 13**) (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). Pode ser causada também por um distúrbio genético (por exemplo, uma mutação do gene único do canal iônico neuronal) ou mesmo idiopática em que a causa não é encontrada (PANAHI *et al.*, 2019).

Figura 13: Causas da epilepsia



Fonte: Adaptado de OMS (2019)

Uma crise epiléptica é definida pela LIAE (Liga Internacional contra a Epilepsia) como uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devidos à atividade neuronal anormal excessiva; enquanto a epilepsia é a tendência duradoura de ter convulsões recorrentes (BERG; MILLICHAP, 2013; MURO; CONNOLLY, 2014; THOM, 2019). Por exemplo, uma crise epiléptica única pode ser secundária à intoxicação, infecção ou doença febril e não constitui um

diagnóstico de epilepsia. Convulsões podem ser focais ou generalizadas, com ou sem perda de consciência (GULATI; KAUSHIK, 2016).

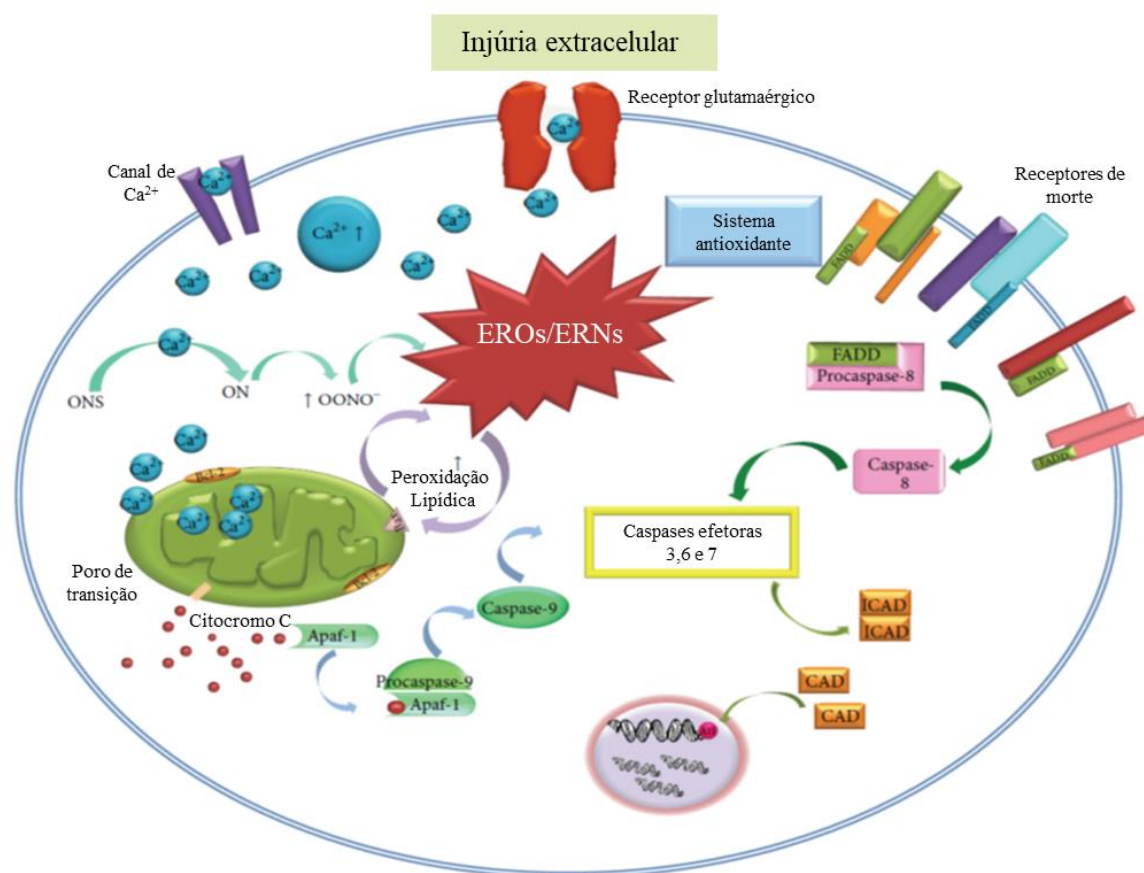
Em muitos casos, a epilepsia acaba sendo uma carga crônica que dura a vida inteira. O objetivo de qualquer terapia de epilepsia é a diminuição de convulsões sem eventos adversos associados ao tratamento (STEINHOFF, 2005). O padrão-ouro do tratamento da epilepsia é o medicamentoso com drogas antiepilépticas (DAEs). É baseado no conceito de supressão profilática da atividade convulsiva e, portanto, na redução ou mesmo eliminação do risco de novas convulsões em pessoas com suscetibilidade a convulsões recorrentes (TOMSON; STEINHOFF, 2012).

Contudo, cerca de 2/3 dos pacientes com epilepsia são sensíveis ao tratamento com DAEs. Este fato tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de novos agente antiepilépticos com maior segurança e eficácia que os disponíveis atualmente (SHORVON; GOODRIDGE, 2013; LEE, 2014; STEINHOFF; STAACK; HILLENBRAND, 2017).

Assim, convulsões em aproximadamente 1/3 das pessoas com epilepsia são mais difíceis de tratar. De acordo com uma definição recente da ILAE, a resistência das DAEs é definida como “falha de testes” de suas drogas antiepilépticas toleradas, apropriadamente escolhidas (monoterapias ou em combinação) para alcançar a diminuição das crises epiléticas (KWAN, 2010). A eficácia dessas drogas não parece afetar a progressão ou a história natural da epilepsia. Além disso, não há atualmente nenhuma droga disponível contra o desenvolvimento de epilepsia (LÖSCHER; SCHMIDT, 2012).

A lesão cerebral resultante da epilepsia é um processo dinâmico que compreende múltiplos fatores que contribuem para a morte celular neuronal (**Figura 14**). Estes podem envolver fatores genéticos, disfunção mitocondrial induzida por citotoxicidade, níveis alterados de citocinas e estresse oxidativo (FERRIERO, 2005). Atividade semelhante a convulsões, em nível celular, inicia-se com um influxo significativo de cálcio através de canais de íons dependentes de voltagem e dependentes de N- metil- d-aspartato (VAN DEN POL; OBRIETAN; BELOUSOV, 1996). Os íons intracelulares elevados levam a cascatas bioquímicas, que desencadeiam a morte neuronal aguda após o processo epilético. Além disso, altos níveis de cálcio intracelular podem induzir espécies reativas de oxigênio (ERO) (AGUIAR *et al.*, 2012).

Figura 14: Modelo de relação entre o estresse oxidativo, epilepsia e apoptose.

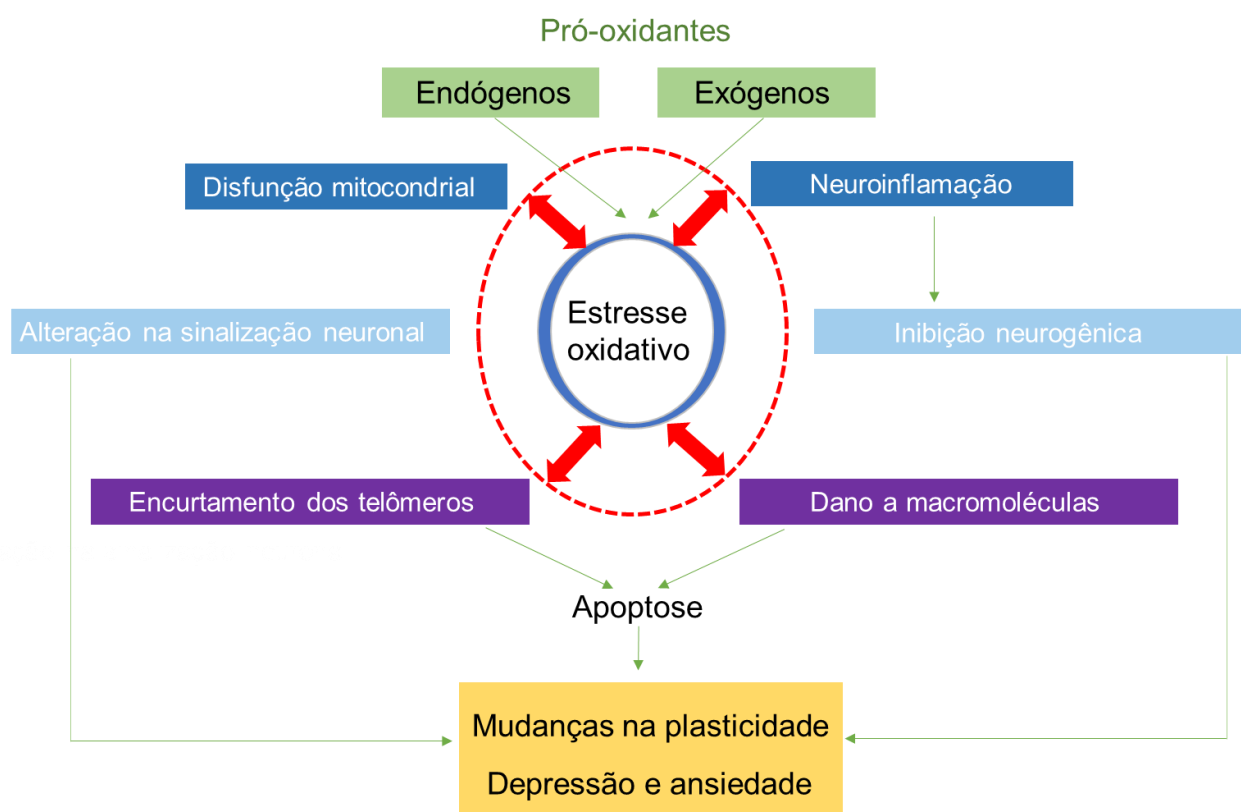


Fonte: Adaptado de Aguiar *et al.* (2012)

Notas: AIF: fator indutor de apoptose. Apaf 1: protease ativadora 1 de apoptose. Bcl-2: proteína antiapoptótica. Bax: proteínas pró-apoptóticas. CAD: DNase ativadora de caspase. ICAD: Inibidor de caspase ativada por DNase. NOS: óxido nítrico sintase. ON: óxido nítrico. OONO⁻: nitrito peróxido. ERO's: espécies reativas do oxigênio. ERN's: espécies reativas do nitrogênio. FADD: proteína FAS associada com domínio de morte.

Além do estresse oxidativo (**Figura 15**), o estresse nitrosativo é considerado um dos mecanismos na patogênese da epilepsia (CHANG; YU, 2010; XU *et al.*, 2014). Estudos já verificaram que o estado epilético altera o potencial redox e diminui o nível de ATP, o que pode levar a um colapso na produção e suprimento de energia cerebral (WASTERLAIN *et al.*, 1993). Além disso, Liang e Patel (2006) demonstraram danos oxidativos em proteínas, lipídios e DNA, resultado de convulsões persistentes. Vale ressaltar que o aumento de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, em nível mitocondrial, causa dano celular subsequente, que ocorre após convulsões persistentes (CHUANG, 2010; WALDBAUM; LIANG; PATEL, 2010).

Figura 15: Mecanismo de dano neuronal induzido por estresse oxidativo na ansiedade



Fonte: Adaptado de Xu *et al.* (2014)

Já foi constatado que a epilepsia mioclônica com fibras vermelhas irregulares é uma síndrome rara caracterizada por mioclonia, fraqueza muscular, ataxia cerebelar, bloqueio cardíaco e demência. Essa patologia é o primeiro tipo de epilepsia em que um defeito molecular foi identificado e ligado à síndrome epiléptica (WALLACE *et al.*, 1988). É caracterizada por ter como causa uma mutação de transição de A para G (mutação A8344G) do par de nucleotídeos 8344 no DNA mitocondrial humano. Esta mutação afeta a biossíntese de proteínas de fosforilação oxidativa mitocondrial (BINDOFF; ENGELSEN, 2010), bem como causa a geração ineficiente de ATP, o aumento da produção de ERO e a expressão genética desequilibrada de enzimas antioxidantes. Além disso, existem dados sobre convulsões generalizadas associadas a mutações mitocondriais em várias formas de epilepsia, incluindo DNA polimerase mitocondrial γ (WU *et al.*, 2010) e RNA transportador. Diversas mutações no DNA mitocondrial, que comprometem a cadeia respiratória mitocondrial ou a síntese

de ATP mitocondrial, têm sido associadas a fenótipos epilépticos (SUEN *et al.*, 2010).

Uma vez que a neutralização do aumento da formação de ERO's durante as convulsões depende da capacidade dos sistemas de defesa antioxidante, o potencial terapêutico antiepiléptogênico de várias substâncias que possuem atividades antioxidantes tem sido, extensivamente, estudado (SANTOS *et al.*, 2009; ROWLES; OLSEN, 2012).

3.5.2 Ansiedade

O transtorno da ansiedade é definido como uma manifestação normal da vida social e pode ser persistente ou repetitiva composta por fatores emocionais e fisiológicos. No entanto, quando atinge um alto nível de intensidade, afeta o dia a dia, diminui a qualidade da vida e interfere na capacidade das pessoas de responder a questões pessoais, profissionais ou familiares (REMES *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A ansiedade pode ser considerada uma reação natural até certo ponto, útil para proteção e adaptação a novas situações; mas, torna-se patológica quando atinge um caráter extremo e generalizado, considerada uma disfunção emocional que provoca sérios prejuízos na vida de um sujeito. E é transformada em patológica quando são exagerados, desproporcionais em relação ao estímulo, ou qualitativamente distintos do que se observa normalmente, interferindo, assim, na qualidade de vida, no conforto emocional ou no desempenho diário do indivíduo (SADOCK; SADOCK; RUIZ, 2017; MOURA *et al.*, 2018).

Do ponto de vista fisiológico, a ansiedade é caracterizada pela ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. O sistema de resposta ao estresse agudo do corpo humano é ativado, com a "luta ou fuga", resposta que acelera os batimentos cardíacos, dilata os brônquios e contrai os vasos sanguíneos (AU *et al.*, 2015; WIGLUSZ, LANDOWSKI, CUBAŁA, 2019). Refere-se a uma relação de impotência, um conflito caracterizado por processos neurofisiológicos entre a pessoa e o ambiente. Isto é desencadeado quando um indivíduo confrontado com uma dada situação ou evento não é capaz de responder a demandas do meio ambiente e sente uma ameaça à sua existência ou valores essenciais (RAMOS; STANLEY, 2018; AMORIM *et al.*, 2018).

Há vários tipos de transtornos de ansiedade, diferenciados entre si através da observação das situações desencadeantes do medo sentido pelo paciente. Dentre os transtornos de ansiedade listados pelo Manual do Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais, estão: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social (fobia social), transtorno de pânico, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento, transtorno de ansiedade devido a outra condição médica, outro transtorno de ansiedade especificado e transtorno de ansiedade não especificado (ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA, 2014; HEZEL *et al.*, 2019).

Segundo Sadock, Sadock e Ruiz (2017), as três principais opções de medicamentos a serem considerados nesse emprego são os benzodiazepínicos, a buspirona e os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs). Tradicionalmente, a terapia farmacológica é a base para o tratamento do TAG é os benzodiazepínicos (BDZ), que atuam na modulação dos receptores GABA_A, potencializando a atividade inibitória, se destacaram por muitos anos como primeira escolha para a terapia dos distúrbios de ansiedade. Porém, nas décadas de 1980 e 1990, começaram as evidências de seus inúmeros efeitos adversos como tolerância, dependência física e psicológica e síndrome de abstinência (RALVENIUS *et al.*, 2015; SIGEL; ERNST, 2018).

Os benzodiazepínicos têm sua eficácia na redução dos sintomas somáticos comprovada, porém, produzem pouca melhora nos sintomas psíquicos da ansiedade e têm eficácia questionável no tratamento crônico (FIRMINO *et al.*, 2011). Desta forma, recomenda-se também os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) e venlafaxina (inibidor seletivo da recaptação da serotonina e da noradrenalina) como terapia de primeira linha para o TAG, limitando o uso dos benzodiazepínicos a poucas semanas (AUTHIER *et al.*, 2009; BERGER *et al.*, 2012; ZMUDZKA *et al.*, 2018).

Contudo ainda é escasso a utilização de medicamentos eficazes e que provoquem poucos efeitos colaterais, sendo necessário a busca de terapias alternativas para a prevenção e tratamento dos transtornos de ansiedade com menos efeitos adversos, aumentando a qualidade de vida, principalmente em pacientes que necessitam de um manejo clínico em longo prazo. Entre estas, os produtos naturais, especialmente os compostos terpênicos, constituem uma

importante fonte de pesquisa e são intensamente testados em estudos pré-clínicos e clínicos por diversos grupos de pesquisa que visam à descoberta de novas substâncias com atividade ansiolítica (FAJEMIROYE *et al.*, 2012; RIVERA *et al.*, 2014; FEDOTOVA *et al.*, 2018).

Um dos grandes focos debatidos na literatura é que os distúrbios do estresse oxidativo no cérebro podem ser uma patogênese plausível e fator de risco para várias doenças específicas do sistema nervoso, incluindo distúrbios comportamentais (MOYLAN *et al.*, 2013). Desenvolvimentos recentes sugerem que a resposta neuroinflamatória, induzida por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, déficits neuroplásticos e vias de sinalização intracelular, pode ajudar a elucidar a interrelação entre estresse oxidativo e transtornos depressivos e ansiosos, fornecendo um novo caminho para o tratamento dessas patologias (JINDAL; MAHESH; BHATT, 2013).

3.6 Tratamento de doenças neurológicas

3.6.1 Epilepsia

O uso de drogas em terapias para epilepsia é a base do tratamento para a maioria dos pacientes e tem quatro objetivos: eliminar as convulsões ou reduzir sua frequência ao máximo possível, evadir os efeitos adversos associados ao tratamento em longo prazo e ajudar os pacientes a manter ou restaurar suas atividades psicossociais e vocacionais usuais e manter um estilo de vida normal (BAZIL *et al.*, 2005). A decisão de iniciar a terapia com drogas antiepilépticas deve basear-se em uma análise informada da probabilidade de recorrência das convulsões, das consequências das convulsões contínuas para os pacientes e dos efeitos benéficos e adversos do agente farmacológico escolhido (GOLDENBERG, 2010).

Para evitar novas convulsões, talvez seja melhor introduzir drogas antiepilépticas precocemente. A atividade de apreensão futura pode ser angustiante para aqueles que precisam dirigir, continuar a trabalhar ou cuidar de outros membros da família. A probabilidade de recorrência das convulsões varia entre os pacientes, dependendo do tipo de epilepsia e de quaisquer problemas neurológicos e médicos associados. A farmacoterapia, no entanto, acarreta um risco de efeitos adversos a uma taxa próxima de 30% após o tratamento inicial.

O tratamento de crianças apresenta problemas adicionais, especialmente no desenvolvimento, aprendizado e comportamento do cérebro, quando um medicamento é usado cronicamente (VINGERHOETS, 2006).

Existe um grande número de medicamentos atualmente aprovados para o tratamento da epilepsia. A exemplo do ácido valproico que tem sido eficaz em crises parciais e generalizadas e é indicado como monoterapia e terapia adjunta para crises parciais complexas, que começam em uma área limitada do cérebro. Essas convulsões podem ocorrer isoladamente ou em associação com outros tipos de convulsões. O medicamento também é indicado para pacientes com crises simples e complexas de ausência e como terapia adjuvante para pacientes com múltiplos tipos de crises, incluindo crises de ausência (MALANI, 2012).

A lamotrigina é indicada como uma terapia adjuvante para crises parciais, crises tônico-clônicas generalizadas primárias e convulsões generalizadas da síndrome de *Lennox-Gastaut* em pacientes com dois anos de idade ou mais. A ação desse fármaco está relacionada à inativação dos canais de sódio sensíveis à voltagem, resultando em diminuição da atividade neuronal. Esse medicamento pode influenciar, seletivamente, os neurônios que sintetizam o glutamato e o aspartato, pois diminui a liberação desses neurotransmissores excitatórios através do seu efeito nos canais de sódio (RAMARATNAM; PANEBIANCO; MARSON, 2016; NEVITT *et al.*, 2018).

A terapia adjuvante com topiramato é indicada para pacientes adultos e pediátricos de 2 a 16 anos de idade com crises parciais ou convulsões tônico-clônicas generalizadas primárias em pacientes com dois anos de idade ou mais com convulsões associadas à síndrome de *Lennox-Gastaut*. Os tabletes de topiramato ou cápsulas *sprinkle* também são indicados como monoterapia inicial em pacientes com 10 anos ou mais de idade com crises tônico-clônicas generalizadas de início parcial ou primárias (LIU; WANG; WANG, 2019).

Evidências eletrofisiológicas e bioquímicas sugerem que o topiramato, em concentrações farmacologicamente relevantes, bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes, aumenta a atividade do neurotransmissor GABA em alguns subtipos do receptor GABA A, antagoniza o subtipo AMPA / cainato do receptor de glutamato e inibe a enzima anidrase carbônica, particularmente as isoenzimas II e IV (HOY, 2016).

Quanto a medicamentos de primeira linha contra convulsões parciais, a carbamazepina é indicada para uso como droga anticonvulsivante. O mecanismo de ação anticonvulsivante da droga pode resultar do bloqueio dependente do uso de canais de sódio sensíveis à voltagem (NEVITT, 2018; TRINKA *et al.*, 2018). A etossuximida é indicada para controlar a epilepsia de ausência, suprimindo lapsos de consciência, que são comuns nas crises de ausência. A frequência de ataques epileptiformes é reduzida, aparentemente por depressão do córtex motor e elevação do limiar do SNC para estímulos convulsivos. A atividade da droga é realizada por meio da modulação das correntes de cálcio do tipo T talâmicas, bloqueando, assim, o disparo sincronizado de neurônios associados a descargas de ponta e onda (WANG *et al.*, 2019).

3.6.2 Ansiedade

A introdução de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos foi um importante avanço na farmacoterapia da ansiedade. Esses medicamentos foram estudados em rigorosos ensaios clínicos randomizados e demonstraram ter uma relação risco-benefício aceitável (BALDWIN; POLKINGHORN, 2008). O trabalho subsequente com agentes direcionados a determinados sistemas moleculares, como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina e os inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina, constituiu outro passo importante, na medida em que a qualidade dos ensaios e a relação risco-benefício melhoraram (BALDWIN *et al.*, 2011). As diretrizes de tratamento mais atuais enfatizam que os inibidores seletivos de recaptação de serotonina e os inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina são os agentes farmacoterápicos de primeira linha preferidos no tratamento da ansiedade (KOEN; STEIN, 2011; KATZMAN *et al.*, 2014). Finalmente, pesquisas recentes de psicobiologia básica e clínica em andamento levaram a novos alvos moleculares para o desenvolvimento futuro (KAPLAN; MOORE, 2011).

Como o nome sugere, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina inibem a recaptação de serotonina na membrana pré-sináptica pela bomba de transporte de serotonina (5-HT), aumentando, assim, a concentração sináptica do neurotransmissor. Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina, atualmente disponíveis para uso clínico, são citalopram, escitalopram, fluoxetina,

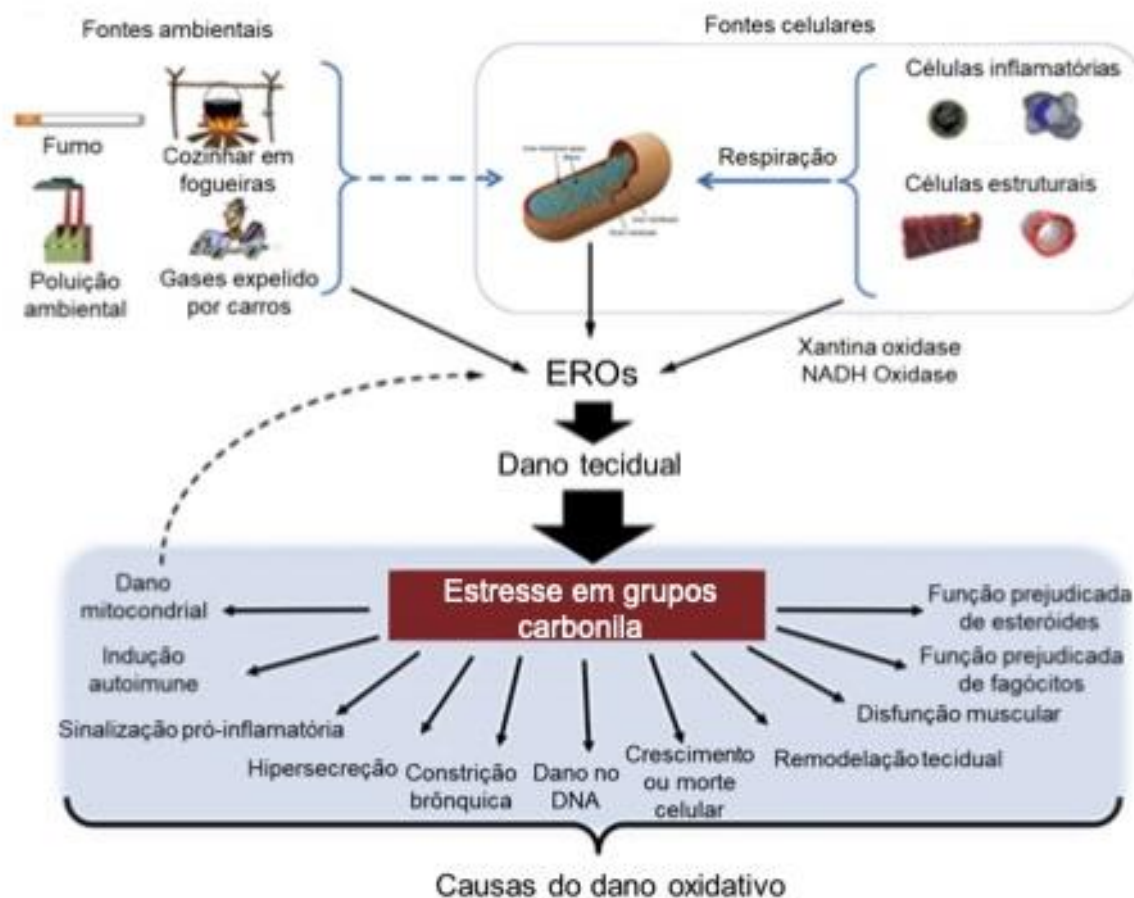
fluvoxamina, paroxetina e sertralina. Há evidências que apoiam a eficácia e a tolerabilidade do escitalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina no manejo da ansiedade em curto e longo prazo (BALDWIN *et al.*, 2005). E tanto o escitalopram como a paroxetina têm aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*) para essa indicação (RYNN; BRAWMAN-MINTZER, 2004; RAVINDRAN; STEIN, 2010; FALANI; DE CARVALHO; VARGAS, 2016).

3.7 Estresse oxidativo

Durante os últimos anos houve um grande interesse nos estudos de antioxidantes e estresse oxidativo, principalmente nos efeitos das espécies reativas nos sistemas biológicos. Estes estresses são provocados pelos radicais livres que são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons (KAPPEL, 2007; GEBICKI, 2016).

A geração dos radicais livres, nas células, ocorre tanto no meio citoplasmático, como nas mitocôndrias e estão envolvidos em funções fisiológicas básicas, como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (**Figura 16**) (RAHAL *et al.*, 2014). Porém, sua produção em excesso apresenta efeitos prejudiciais como a peroxidação lipídica, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, enzimas, carboidratos e DNA (LEE *et al.*, 2017).

Figura 16: Fontes do estresse oxidativo



Fonte: LEE *et al.* (2017).

Notas: ERO's: espécies reativas do oxigênio.

A ocorrência de estresse oxidativo no organismo acontece devido à existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou agentes oxidantes em detrimento da velocidade de remoção destes (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; SIES, 2014). As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são normalmente produzidas pelo metabolismo corporal e são altamente reativas possuindo a capacidade de retirar elétrons de outros compostos celulares, induzindo lesões oxidativas em várias moléculas, fato que leva à perda total da função celular (CRUZAT *et al.*, 2007).

Segundo Lim; Barter, 2014, os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que atuam inativando as espécies reativas de oxigênios. Os antioxidantes podem ser de origem endógena, que agem enzimaticamente, a exemplo da glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou não enzimaticamente como a glutatona, podendo ser também de

origem exógena como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (Vitamina C) e compostos fenólicos, que são os provenientes da dieta (HALIWEEL, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

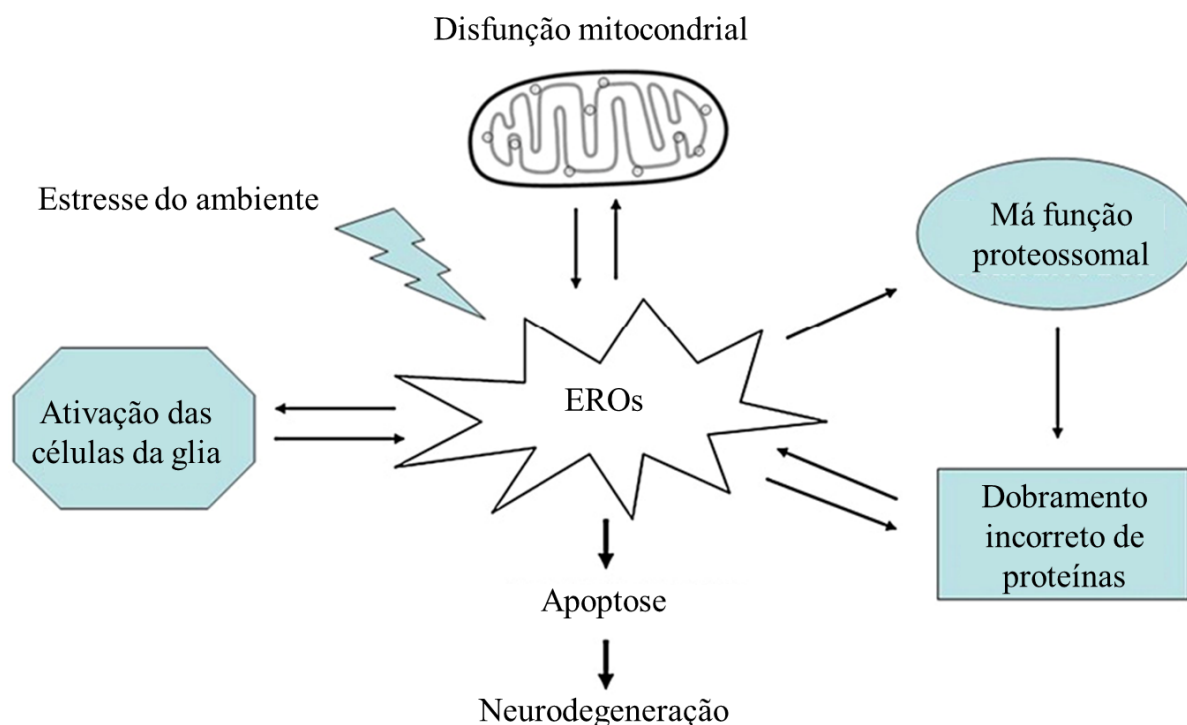
3.8 Estresse oxidativo e doenças neurológicas

Um dos maiores perigos do excesso de ERO's no organismo é a sua possível atuação sobre o material genético da célula (HASANUZZAMAN *et al.*, 2017). E quando se trata de ação sobre o sistema nervoso central (SNC), especificamente sobre os neurônios, muitas vezes estes efeitos levam à disfunção neural e/ou morte, resultando em doenças neurológicas (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; FRANCO; NAVARRO; MARTÍNEZ-PINILLA, 2019).

Os radicais livres são mais perigosos para o cérebro pela grande demanda de respiração celular que o tecido tem, o que, conseqüentemente, pode levar a uma maior produção dos radicais derivados do processo metabólico, que acabam por desempenhar um papel importante para a fisiopatogênese das doenças neurodegenerativas (**Figura 17**) (KIM *et al.*, 2015). Dentre estas doenças, temos a esclerose lateral amiotrófica, doença de *Parkinson* e doença de *Alzheimer*, que apresentam um aumento de ERO's em consequência de uma baixa nos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, o que permite inferir a grande participação deste mecanismo para as patologias (NIEDZIELSKA *et al.*, 2016).

Isto se dá pela sensibilidade dos neurônios às ERO's, uma vez que suas membranas são compostas, majoritariamente, de ácidos graxos poli-insaturados. Estes, podem sofrer peroxidação lipídica facilmente, causando danos graves ou até mesmo irreversíveis, tendo em destaque casos com estresse crônico. Sabe-se que a exposição aos radicais e a cronicidade causa uma regulação negativa das enzimas antioxidantes, deixando as células mais ainda vulneráveis a possíveis danos que podem ser causados nas membranas celulares (CHE *et al.*, 2015).

Figura 17: Diferentes mecanismos patogênicos de indução do estresse oxidativo na neurodegeneração.



Fonte CHE *et al.*, 2015.

Notas: ERO's: Espécies Reativas do Oxigênio

Muitos dos danos que resultam nessas doenças, ocorrem nas mitocôndrias por terem a função de respiração celular. E este estresse pode acarretar diversas alterações nas proteínas ou lipídios mitocondriais e até mesmo no DNA mitocondrial, o que se torna mais prejudicial aos neurônios por serem mais metabolicamente ativos do que os outros tipos de células teciduais (BHAT *et al.*, 2015). Em associação a isso, o estresse ainda consegue afetar outras organelas que estão associadas à resposta antioxidante, alterando a função lisossomal e proteossômica, que são primordiais para a eliminação das proteínas que sofreram danos decorrente dos radicais e precisam ser repostas. Porém, como o dano pode chegar ao DNA, é possível que a nova proteína que será sintetizada possa vir com algum erro estrutural, causando problemas para a célula da mesma forma (BLESA *et al.*, 2015).

Este efeito sobre as células se torna mais agravado com o avançar da idade, possivelmente pela diminuição da metabolização destes radicais pelas

enzimas (CHEIGNON *et al.*, 2018). O desequilíbrio homeostático dos metais, presentes nas enzimas antioxidantes, juntamente com todos os danos envolvidos, afetam diretamente a sinapse e a formação e atuação dos neurotransmissores causando as disfunções neurais. Como resultado desse processo, surgem as doenças neurodegenerativas, demonstrando, assim, que todo o equilíbrio redox no cérebro afeta não somente as estruturas expostas às ERO's, mas que depende do grau e do local desta intervenção (TÖNNIES; TRUSHINA, 2017).

Além de todo o dano no equilíbrio oxidativo das células, as ERO's ainda conseguem desencadear a formação de moléculas que atuam na membrana hematoencefálica aumentando a sua permeabilidade e tornando o tecido mais susceptível a infecções, inflamações e até morte das células. E como consequência destas atuações no SNC, pode ocorrer o acúmulo de proteínas defeituosas ou superexpressas. Estas, estão envolvidas em patologias, a exemplo da doença de Alzheimer, que apresenta a proteína β -amiloide e tau desdobradas formando emaranhados neurofibrilares responsáveis por matar neurônios (SALIM, 2017).

Apesar das respostas antioxidantes nesse tecido serem pouco esclarecidas, principalmente pela heterogeneidade das células, é notória a relevância da atividade de enzimas como a CAT e GTx, principalmente por estarem relacionadas à remoção do peróxido de hidrogênio no meio mitocondrial e do citoplasma, respectivamente (CHE *et al.*, 2015; FRANCO; NAVARRO; MARTÍNEZ-PINILLA, 2019). Atuam em conjunto com as SOD's que fazem a conversão dos superóxidos em H_2O_2 . Além delas, para a defesa do SNC, ainda há a atuação de outras moléculas de baixo peso como a glutathione redutase ou oxidada, ácido úrico, ácido ascórbico e melatonina (SALIM, 2017).

3.9 Defesas antioxidantes

A defesa antioxidante é vista como essencial para a sobrevivência de qualquer organismo que necessite de oxigênio, especialmente ligada pela necessidade de trocas gasosas, que é primordialmente utilizada para impedir a degradação da matéria orgânica, em termos químicos o processo é realizado

através da adição e um elétron, mecanismo de redução (FRANCO; NAVARRO; MARTÍNEZ-PINILLA, 2019).

No organismo, esta função é feita, principalmente, por seis enzimas, a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD), que, dependendo do local celular que é encontrada, recebe uma nomenclatura específica: citoplasmática (no citoplasma), mitocondrial (na organela mitocôndria) e extracelular (fora da célula); sistema tiorredoxina, flavohemoglobinas e redutases de nitrito ou nitrato (HUANG *et al.*, 2016; STAERCK *et al.*, 2017).

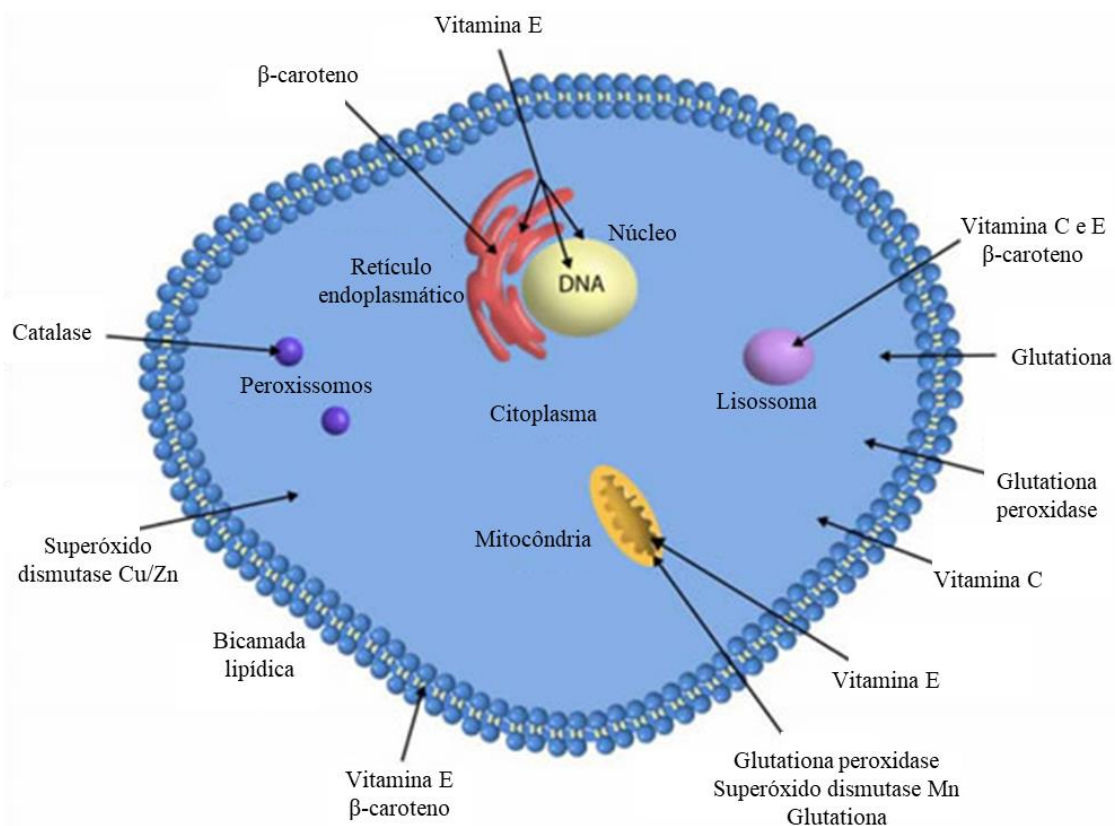
Em essência, a função das moléculas antioxidantes é trabalhar na remoção das ERO's, que caso superem a margem de ação destas enzimas, ou seja, haja o acúmulo dos ERO's há a ocorrência do estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2016; HASANUZZAMAN *et al.*, 2017). Fisiologicamente, estes metabólitos derivam de atividades necessárias da célula como respiração celular, atuando também na sinalização celular e como parte da defesa do organismo contra microorganismos patogênicos (STAERCK *et al.*, 2017).

Muitas destas espécies reativas podem ainda ser derivadas de substâncias ambientais, as quais são expostas que podem ser facilmente revertidas pelas enzimas. Porém, quando esse estresse ocorre por produtos químicos tóxicos, como certos metais xenobióticos, pode causar estresse para a célula, causando danos nas mesmas (CAROCCI *et al.*, 2016).

Nessa concepção, deve-se ressaltar da ação positiva das ERO's induzido, já que este é o mecanismo de ação de diversos quimioterápicos, que induzem um alto nível de estresse nas células cancerosas que tem seus equilíbrios e defesas completamente desestabilizados e inativadas, o que acaba por causar danos irreversíveis à célula, já que causam danos mutagênicos, ainda podendo leva-la a morte através da ativação da apoptose (SZNARKOWSKA *et al.*, 2017).

Dentre as enzimas, inicialmente testadas, as de maior destaque são a SOD, CAT e GTx, que são mais exploradas em relação ao seu mecanismo de ação por serem a primeira linha de defesa do organismo contra o estresse oxidativo (**Figura 18**). São responsáveis por coletar os radicais livres que podem ser prejudiciais para a célula, especialmente o superóxido aniônico (O_2^-) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Figura 18: Sistema de defesa antioxidante celular



Fonte: IGHODARO; AKINLOYE. (2018)

Mais especificamente como há a interação dessas enzimas na primeira linha de defesa do organismo contra o estresse, a SOD que em essência atuam causando uma dismutação de uma molécula de superóxido, sais iônicos, que em consequência produzem uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este metabólito é normalmente neutralizado pela CAT ou GTx. A CAT consegue neutralizá-lo em água (H_2O) e uma molécula de oxigênio (O_2), com alta eficiência, já que a mesma consegue fazer a neutralização de ERO's em questão de segundos, atuando, principalmente, no citoplasma (SZNARKOWSKA *et al.*, 2017; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A GTx é uma enzima categorizada em oito tipos, sendo classificada de um (1) a oito (8), que tem a capacidade de quebrar o peróxido da mesma forma que a CAT. Porém, ele atua, principalmente, na mitocôndria, sendo crucial contra a peroxidação lipídica das membranas. Dentre os subtipos, a mais predominante é a GTx-1, a GTx-2, no trato gastrointestinal; a GTx-3 nos tecidos renais; a GTx-4

tem uma isoforma mitocondrial específica que tem a capacidade de desencadear a apoptose; GTx-5 (em humanos) e GTx-6 (em roedores) são peroxidases e independem de selênio (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Caso os radicais estejam em níveis que as enzimas não sejam capazes de retornar a célula ao equilíbrio, outras linhas de defesa são utilizadas. Desta forma, enquanto a primeira linha elimina os radicais livres, a segunda linha tem a capacidade de doar elétrons para os radicais ativos, tornando-os menos nocivos e mais fáceis de serem eliminados pelas enzimas. A terceira linha só é acionada quando há algum dano causado pelas ERO's. Estas, são classificadas como enzimas de reparo da membrana e material genético e removem as que não têm mais a capacidade de serem restauradas. E a quarta e última linha de defesa se dá pela sinalização da região que está com grande concentração dos radicais, a fim de atrair enzimas capazes de eliminar os mesmos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

3.10. Modelos de estudos comportamentais, toxicológicos e antioxidantes

3.10.1 Modelo para epilepsia

A compreensão dos mecanismos complexos subjacentes à geração de crises na epilepsia do lobo temporal e outras formas de epilepsia, não pode ser totalmente adquirida em estudos clínicos com seres humanos. Como resultado, o uso de modelos animais apropriados é essencial. Podem ser utilizados quimio-circulantes em roedores para induzir convulsões recorrentes espontâneas, principalmente pilocarpina e ácido cáinico. Geralmente, esses modelos pretendem simular convulsões; portanto, os roedores devem apresentar características semelhantes à humana, incluindo uma lesão precipitante inicial que afete o hipocampo e/ou o lobo temporal (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

No modelo utilizando pilocarpina é caracterizado como sendo lesão precipitante em que período latente entre a lesão e a ocorrência de convulsões espontâneas, manifestação crônica de convulsões espontâneas (geralmente crises parciais e tônico-clônicas) e alterações histopatológicas consideradas características da epilepsia lobo temporal (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2013).

Infelizmente, os modelos animais de epilepsia crônica não são amplamente utilizados devido a limitações de tempo e custos.

O ácido caínico foi um dos primeiros compostos usados para modelar a epilepsia em roedores. Este composto é um análogo do L-glutamato, cuja administração sistêmica ou intracerebral causa despolarização e convulsões neuronais, visando, preferencialmente, o hipocampo (SHARMA *et al.*, 2007). Os roedores injetados apresentam convulsões recorrentes, geralmente secundariamente generalizadas e de frequência variável, com notáveis correlatos histopatológicos da esclerose hipocampal (RAEDT *et al.*, 2009). O ácido caínico tem a vantagem de causar lesões habitualmente restritas ao hipocampo; ao contrário da pilocarpina, que também pode produzir lesões em áreas neocorticais (SHARMA *et al.*, 2007). No entanto, áreas extra-hipocampais também estão, significativamente, comprometidas em epilepsia humana, tornando a pilocarpina outro composto químico de ação útil (BONILHA *et al.*, 2009).

A pilocarpina é um agonista do receptor de acetilcolina muscarínico. A injeção sistêmica ou intracerebral de pilocarpina causa convulsões (FURTADO *et al.*, 2002). Os danos estruturais e o subsequente desenvolvimento de crises recorrentes espontâneas assemelham-se aos das crises parciais complexas humanas. De fato, as drogas antiepilépticas, que são eficazes contra crises parciais complexas em humanos também podem interromper as convulsões espontâneas no modelo da pilocarpina (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014). Além disso, existem várias semelhanças de rede e neuroquímica entre a epilepsia humana e o modelo de pilocarpina. Por exemplo, o subículo pode gerar atividade interictal tanto na epilepsia humana como no modelo de pilocarpina (WOZNY *et al.*, 2003; KNOPP *et al.*, 2005). Além disso, as neurotrofinas são reguladas, positivamente, no hipocampo de pacientes com epilepsia mesial, bem como no hipocampo e neocórtex de ratos tratados com pilocarpina. Déficits cognitivos e de memória, comumente encontrados em pacientes com epilepsia, também estão presentes em ratos injetados com pilocarpina (FAURE *et al.*, 2014).

Outros compostos como pentilenotetrazol, estriçnina, N-metil-D, L-aspartato, toxina do tétano e penicilina são amplamente utilizados como modelos de crises agudas, e não como modelos animais de epilepsia. A diferença é que os modelos de crises podem ser úteis para o rastreamento rápido da ação de

drogas antiepiléticas, mas não necessariamente resultam em epilepsia crônica, com exceção da toxina do tétano e, provavelmente, de injeções repetidas de penicilina (NI *et al.*, 2009). Compostos que desencadeiam convulsões podem ser usados no teste de diferentes drogas antiepiléticas que atuam em diferentes tipos de crises. Por exemplo, estricnina e N-metil-D, L-aspartato produzem crises tônico-clônicas generalizadas, bem como ausência não convulsiva de pentilenotetrazol ou convulsões mioclônicas (LÖSCHER, 1997). É importante ressaltar que drogas anticonvulsivantes, como a etossuximida, a trimetadiona, o valproato e outras drogas clinicamente eficazes, foram descobertas pelo uso de modelos de convulsão (LÖSCHER, 2011). Entretanto, drogas como o levetiracetam, a vigabatrina e a tiagabina, que atuam em outros mecanismos além do bloqueio do canal de sódio, foram descobertas em modelos que predizem a eficácia do medicamento contra crises parciais (LÖSCHER, 2002).

3.10.2 Modelo para ansiedade

Vários estudos conduzidos em animais e voluntários sugeriram que experiências estressantes que ocorrem ao longo da vida podem contribuir crucialmente para o desenvolvimento e patogênese de vários transtornos psiquiátricos, incluindo transtornos de humor, esquizofrenia e ansiedade (CAMPOS *et al.*, 2013). Os transtornos de ansiedade ocorrem pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e pelas alterações nos mediadores hormonais e nos biomarcadores de glicocorticoides das respostas ao estresse (MATHEW; PRICE; CHARNEY, 2008). Estudos conduzidos sugerem que animais de laboratório submetidos a estressores crônicos exibem mudanças comportamentais em modelos relacionados a transtornos de ansiedade (MAGARI ÑOS; DESLANDES; MCEWEN, 1999; CAMPOS *et al.*, 2013).

Modelos animais de distúrbios emocionais tentam reproduzir características de distúrbios psiquiátricos em animais de laboratório, correlacionando as mudanças fisiológicas e comportamentais associadas a estados emocionais específicos (validade aparente), a etiologias de doenças (validade de construto) e a respostas a tratamentos farmacológicos (validade preditiva). É considerado que os modelos animais atuais visam refletir vários fatores (como baixo custo, velocidade e reprodutibilidade), além das relações

teóricas dominantes relacionadas à patogênese dos distúrbios específicos e ao mecanismo de ação aceito das drogas psicotrópicas, eles produziram uma contribuição significativa para a descoberta de novas drogas e a compreensão da neurobiologia das doenças psiquiátricas (BOURIN *et al.*, 2007).

Um dos testes mais utilizados como modelo de ansiedade é o Labirinto em Cruz Elevado, proposto pela primeira vez por Handley e Mithani (1984). O aparelho é elevado acima do nível do chão e é composto de dois braços fechados, opostos, perpendicularmente, por dois braços abertos. O teste se baseia na tendência natural dos roedores para explorar novos ambientes e evitar inatos lugares desprotegidos, brilhantes e elevados (representados pelos braços abertos). O confinamento dos braços abertos induz sinais fisiológicos de estresse (aumento dos níveis de defecação).

3.11 A *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo de danos oxidativos e/ou antioxidantes

Estudos pré-clínicos *in vivo* se apresentam como modelos eficientes na extrapolação de resultados, mesmo com limitações, para comparações com organismos superiores, como os mamíferos (KIRKLAND *et al.*, 2014). Organismos eucariontes simples, por serem de fácil manuseio, cultivo e rápida multiplicação celular, como a *Saccharomyces cerevisiae*, são padronizados como modelos de pesquisa para análise de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em compostos, medicamentos, extratos ou substâncias isoladas (HOSTETTER; OSBORN; DE ROSE, 2012). As linhagens de *S. cerevisiae* proficientes ou mutadas em suas defesas antioxidantes são comumente utilizadas na avaliação da atividade de compostos, naturais ou sintéticos, frente aos mecanismos de defesa antioxidante destes organismos unicelulares eucariotos. Tendo em vista a existência de enzimas antioxidantes funcionalmente semelhantes à de humanos, a extrapolação de resultados comparativos quanto à segurança na liberação do uso de fármacos e a consolidação de protocolos terapêuticos, torna-se mais eficaz (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A *S. cerevisiae* apresenta similaridades com as células mamárias em nível de organelas e componentes macromoleculares, sendo que muitas de suas proteínas podem ser, funcionalmente, intercambiáveis com proteínas humanas

homólogas. Cabe enfatizar que a manipulação genética é mais barata em relação a outros modelos, com possibilidades de modificações como ruptura de gene ou mutação e com a base de dados mais completa de todos os modelos eucarióticos. A resposta antioxidante desses fungos é semelhante à resposta de células mamárias e 30% dos genes relacionados a doenças humanas apresentam genes homólogos funcionais em leveduras (DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAM, 2015).

Dessa forma, o modelo baseado no uso de leveduras vem sendo extensamente empregado em pesquisas e constitui-se de grande importância para avaliação de possíveis compostos antioxidantes *in vivo* através, por exemplo, da avaliação dos níveis de peróxido intracelular, carbonilação de proteínas e sobrevivência de *S. cerevisiae* (CHANA-J-KACZMAREK *et al.*, 2015; DE LERMA; PEINADO; PEINADO, 2013).

Em geral, seis linhagens leveduriformes são semeadas em meios de cultura, líquidos ou sólidos, neste tipo de estudo. A linhagem EG118 foi mutada em laboratório para tornar-se deficiente no sistema enzimático quanto à enzima superóxido dismutase citoplasmática (gene *SOD1*). A EG110 não apresenta a *SOD* mitocondrial (gene *SOD2*). A linhagem EG133 é mutada para as duas enzimas, caracterizada pela ausência da *SOD1* e *SOD2*. EG223 é proficiente em defesa antioxidante para a enzima catalase (*CAT1*) e EG103 corresponde à linhagem selvagem (*SODWT*), portanto proficiente nestas enzimas mitocondriais e citoplasmáticas (CHANA-J-KACZMAREK *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. C. T.; ALMEIDA, A. B.; ARAÚJO, P. V. P.; ABREU, R. N. D. C. D.; CHAVES, E. M. C.; VALE, O. C. D.; VASCONCELOS, S. M. M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, p. 20-45, 2012.

ALENCAR, M.V.; DE CASTRO E SOUSA, J.M.; ROLIM, H.M.; DE MEDEIROS, M.D.; CERQUEIRA, G.S.; DE CASTRO ALMEIDA, F.R.; CITÓ, A.M.; FERREIRA, P.M.; LOPES, J.A.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.; ISLAM, M.T. Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 175–201, 2017.

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, p. 56-62, 2012.

AMATISTE, S.; SAGRAFOLI, D.; GIACINTI, G.; ROSA, G.; CARFORA, V.; MARRI, N.; TAMMARO, A.; BOVI, E.; ROSATI, R.. Antimicrobial activity of essential oils against staphylococcus aureus in fresh sheep cheese. **Italian Journal of Food Safety**, v.3, p.148-165, 2014.

AMORIM, D.; AMADO, J.; BRITO, I.; COSTEIRA, C.; AMORIM, N.; MACHADO, J. Integrative medicine in anxiety disorders. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 31, p. 215–219, 2018.

ANAND, A. K.; MOHAN, M.; HAIDER, S. Z.; SHARMA, A. Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Ocimum* species from Uttarakhand (India). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 223-225, 2011.

ARISTATILE, B.; AL-NUMAIR, K. S.; AL-ASSAF, A. H.; PUGALENDI, K. V. Pharmacological effect of carvacrol on D-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. **Journal of natural medicines**, v. 65, p. 568-577, 2011.

ASBAHANI, A.E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E.H.A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A.E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation, **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, p.220-243, 2015.

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.

ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-V**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

AU, D.W.; TSANG, H.W.; LING, P.P.; LEUNG, G.H.; IP, P.; CHEUNG, W. Effects of acupressure on anxiety: a systematic review and meta-analysis, **Acupuncture in Medicine**, v.33, p. 1-8, 2015.

AUTHIER, N.; BALAYSSAC, D.; SAUTEREAU, M.; ZANGARELLI, A.; COURTY, P.; SOMOGYI, A. A.; VENNAT, B.; LLORCA P.M.; ESCHALIER, A. Benzodiazepine dependence: focus on withdrawal syndrome. In: *Annales pharmaceutiques francaises*. **Elsevier Masson**, v.2009. p. 408-413, 2009.

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, p. 119–124, 2014.

BAKER, D.A.; CASWELL, H.L.; ECCLES, F.J.R. Self-compassion and depression, anxiety, and resilience in adults with epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 90, p. 154–161, 2019.

BALDWIN, D. S.; ANDERSON, I. M.; NUTT, D. J.; BANDELOW, B.; BOND, A.; DAVIDSON, J. R.; WITTCHEN, H. U. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, p. 567-596, 2005.

BALDWIN, D.; WOODS, R.; LAWSON, R.; TAYLOR, D. Efficacy of drug treatments for generalised anxiety disorder: systematic review and meta-analysis. **Bmj**, v. 342, p. 1199- 1300, 2011.

BALMUS, I.M.; CIOBICA, A.; ANTIOCH, I.; DOBRIN, R.; TIMOFTE, D. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 201, p. 1-25, 2016.

BARKIN, R. L. The pharmacology of topical analgesics. **Postgraduate medicine**, v. 125, p. 7-18, 2013.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC press, 2015.

BAŞER, K.H.C., BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, Taylor and Francis Group: London, UK, 2015.

BASHA, R.H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta Histochemica**, v. 116, p. 1469-1479, 2014.

BAZIL, C. W.; MORRELL, M. J.; PEDLEY, T. A. **Epilepsy**. In: Rowland LP, editor. *Merritt's Neurology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 990–1008, 2005.

BEAL, M. Flint. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, p. 120-131, 2003.

BERG, A. T.; MILLICHAP, J. J. The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 19, p. 571-597, 2013.

BERGER, A.; EDELSBERG, J.; TREGLIA, M.; ALVIR, J. M. J.; OSTER, G. Change in healthcare utilization and costs following initiation of benzodiazepine therapy for long-term treatment of generalized anxiety disorder: a retrospective cohort study. **BMC psychiatry**, v. 12, p. 177, 2012.

BHAT, A. H.; DAR, K. B.; ANEES, S.; ZARGAR, M. A.; MASOOD, A.; SOFI, M. A.; GANIE, S. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.

BINDOFF, L. A.; ENGELSEN, B. A. Mitochondrial diseases and epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, p. 92-97, 2012.

BLESA, J., TRIGO-DAMAS, I., QUIROGA-VARELA, A., & JACKSON-LEWIS, V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 9, p. 91, 2015.

BONIFÁCIO, B.V.; SILVA, P.B.; RAMOS, D.S.; NEGRI, K.M.; BAUAB, T.M.; M. CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review, **International Journal of Nanomedicine**. v.9, p. 1-15, 2014.

BONILHA, L.; ELM, J. J.; EDWARDS, J. C.; MORGAN, P. S.; HICKS, C.; LOZAR, C.; ECKERT, M. A. How common is brain atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy?. **Epilepsia**, v. 51, p. 1774-1779, 2010.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p. 228-237, 2010.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; NIC DHONNCHADHA, B.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 2, p. 567-574, 2007.

BOWLES, E. J. The chemistry of aromatherapeutic oils (ed.). **Crowns Nest NSW, Australia: Allen & Unwin**, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

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**, v. 109, p. 394-401, 2013.

CAMELLO-ALMARAZ, C.; GOMEZ-PINILLA, P. J.; POZO, M. J.; CAMELLO, P. J. Age-related alterations in Ca^{2+} signals and mitochondrial membrane potential in exocrine cells are prevented by melatonin. **Journal of pineal research**, v. 45, p. 191-198, 2008.

CAMPÊLO, L. M. L.; DE ALMEIDA, A. A. C.; DE FREITAS, R. L. M.; CERQUEIRA, G. S.; DE SOUSA, G. F.; SALDANHA, G. B.; DE FREITAS, R. M. Antioxidant and antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice. **BioMed Research International**, v. 2011, p.20-34, 2011.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, p. 101-111, 2013.

CAROCCI, A.; CATALANO, A.; LAURIA, G.; SINICROPI, M. S.; GENCHI, G. LEAD TOXICITY, ANTIOXIDANT DEFENSE AND ENVIRONMENT. IN: **REVIEWS OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY**. SPRINGER, CHAM, 2016. P. 45-67.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 55, p. 8-13, 2011.

CHA, J. D.; JUNG, E. K.; KIL, B. S.; LEE, K. Y. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, p. 2061-2065, 2007.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **International journal of molecular sciences**, v. 14, p. 12780-12805, 2013.

CHANAJ-KACZMAREK, J.; WYSOCKI, M.; KARACHITOS, A.; WOJCIŃSKA, M.; BARTOSZ, G.; MATŁAWSKA, I.; KMITA, H. Effects of plant extract antioxidative phenolic compounds on energetic status and viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells undergoing oxidative stress. **Journal of functional foods**, v. 16, p. 364-377, 2015.

CHANG, S. J.; YU, B. C. Mitochondrial matters of the brain: mitochondrial dysfunction and oxidative status in epilepsy. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 42, p. 457-459, 2010.

CHE, Y.; ZHOU, Z.; SHU, Y.; ZHAI, C.; ZHU, Y.; GONG, S.; CUI, Y.; WANG, J. F. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. **Neuroscience letters**, v. 584, p. 208-213, 2015.

CHECKOWAY, H.; LUNDIN, J. I.; KELADA, S. N. Neurodegenerative diseases. **IARC scientific publications**, p. 407-419, v.1, 2011.

CHEIGNON, C.; TOMAS, M.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; FALLER, P.; HUREAU, C.; COLLIN, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox Biology**, v. 14, p. 450-464, 2018.

CHEN, W.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. Camphor—a fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon—a review. **Molecules**, v. 18, p. 5434-5454, 2013.

CHUANG, Y. C. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. **Acta Neurol Taiwan**, v. 19, p. 3-15, 2010.

CIRIMINNA, R.; LOMELI-RODRIGUEZ, M.; CARA, P. D.; LOPEZ-SANCHEZ, J. A.; PAGLIARO, M. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. **Chemical Communications**, v. 50, n. 97, p. 15288-15296, 2014.

CLARY, H.M.M.; SNIVELY B.M.; HAMBERGER, M.J. Anxiety is common and independently associated with clinical features of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 85, p. 64-71, 2018.

conceitualização cognitiva no Transtorno Obsessivo Compulsivo: relato de caso. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v. 8, p. 61-66, 2012.

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.1, p. 1-16, 2018.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, p. 115-118, 2012.

CUIJPERS, P.; SIJBRANDIJ, M.; KOOLE, S.; HUIBERS, M.; BERKING, M.; ANDERSSONE, G. Psychological treatment of generalized anxiety disorder: A meta-analysis. **Clinical Psychology Review**, v. 34, p. 130-314, 2014.

CURTIS, M.; AVOLI, M. Initiation, propagation, and termination of partial (Focal) seizures, **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, p. 22-68, 2015.

DAHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; HASSAN, L. E. A.; AHAMED, M. B. K.; MAJID, A. S. A.; MAJID, A. M. S. A. In vitro antimetastatic activity of Agarwood (*Aquilaria crassna*) essential oils against pancreatic cancer cells. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, p. 141–150, 2016.

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, p. 11808-11829, 2015.

DE LA TORRES-RUIZ, M. A.; PUJOL, N.; SUNDARAM, V. Coping with oxidative stress. The yeast model. **Current Drug Targets**, v. 16, p. 2-12, 2015.

DE LERMA, N. L.; PEINADO, J.; PEINADO, R. A. In vitro and in vivo antioxidant activity of musts and skin extracts from off-vine dried *Vitis vinifera* cv. "Tempranillo" grapes. **Journal of functional foods**, v. 5, p. 914-922, 2013.

DE MATOS, S. P.; LUCCA, L. G.; KOESTER, L. S. Essential oils in nanostructured systems: challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, v.1, p. 33-45, 2018.

DE OLIVEIRA N. J. K.; APOLINÁRIO, A. C.; SARAIVA, K. L. A.; DA SILVA, D. T. C.; REIS, M. Y. D. F. A.; DE LIMA DAMASCENO, B. P. G.; DA SILVA, J. A. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

DE OLIVEIRA NEVES, J. K.; APOLINÁRIO, A. C.; SARAIVA, K. L. A.; DA SILVA, D. T. C.; REIS, M. Y. D. F. A.; DE LIMA DAMASCENO, B. P. G.; DA SILVA, J. A. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

DIXON, S.J.; LEMBERG, K.M.; LAMPRECHT, M.R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E.M.; GLEASON, C.E.; PATEL, D.N.; BAUER, A.J.; CANTLEY, A.M.; YANG, W.S.; MORRISON, B.; STOCKWELL, B.R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, p. 1060-1072, 2012.

EGGERT, U. S. The why and how of phenotypic small-molecule screens. **Nature chemical biology**, v. 9, p. 206, 2013.

EKSTEIN, D.; SCHACHTER, S. C. Natural products in epilepsy—the present situation and perspectives for the future. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 1426-1445, 2010.

ELMANN, A.; MORDECHAY, S.; RINDNER, M.; LARKOV, O.; ELKABETZ, M.; RAVID, U. Protective Effects of the Essential Oil of *Salvia fruticosa* and Its Constituents on Astrocytic Susceptibility to Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 6636–6641, 2009.

FADEL, O.; GHAZI, Z.; MOUNI, L.; BENCHAT, N.; RAMDANI, M.; AMHAMDI, H.; WATHELET, J.P.; ASEHRAOU, A.; CHAROF, R. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and traditional hydrodistillation methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 2, p. 323-328, 2011.

FALANI, F. S.; DE CARVALHO, V. N.; VARGAS, T. T. A Síndrome do QT Longo Associada ao uso de Citalopram e Escitalopram/The Long QT Syndrome Associated to Citalopram and Escitalopram. **REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE**, v. 6, p. 73-82, 2016.

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

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Parkinson's disease**, v. 2011, p.1-10, 2011.

FAURE, J. B.; MARQUES-CARNEIRO, J. E.; AKIMANA, G.; COSQUER, B.; FERRANDON, A.; HERBEAUX, K.; CASSEL, J. C. Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, p. 644-653, 2014.

FEDOTOVA, J.; KUBATKA, P.; BÜSSELBERG, D.; SHLEIKIN, A. G.; CAPRNDA, M.; DRAGASEK, J.; RUZLIAK, P. Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 437–446, 2017.

FERRIERO, D. M. Protecting neurons. **Epilepsia**, v. 46, p. 45-51, 2005.

FIRMINO, K. F.; ABREU, M. H. N. G. D.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S. M. S. Fatores associados ao uso de benzodiazepínicos no serviço municipal de saúde da cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 1223-1232, 2011.

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, p. 522–530, 2017.

FORMIGA, M.B.; GALDINO, M.K.C.; CHIAPETTI, N.; GOMES, C.M.L.C. A FRANCO, R.; NAVARRO, G. MARTÍNEZ-PINILLA, E. Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System. **Antioxidants**, v. 1, p.1-10, 2019.

FRANZ, C.M. Essential oil research: Past, present and future, *Flavour Fragrance*, v.25,p. 112-113,2010.

FURTADO, M. D. A.; BRAGA, G. K.; OLIVEIRA, J. A.; DEL VECCHIO, F.; GARCIA-CAIRASCO, N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43, p. 37-39, 2002.

GEBICKI, J. M. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 595, p. 33-39, 2016.

GERTSCH, J. Cannabimimetic phytochemicals in the diet - an evolutionary link to food selection and metabolic stress adaptation? **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1464–1483, 2017.

GOLDENBERG, M. M. Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, p. 392, 2010.

GOMES JÚNIOR, ANTONIO LUIZ ; TCHEKALAROVA, JANA DIMITROVA ; MACHADO, KEYLLA DA CONCEIÇÃO ; MOURA, ARKELLAU KENNED SILVA ; PAZ, MÁRCIA FERNANDA CORREIA JARDIM ; DA MATA, ANA MARIA OLIVEIRA FERREIRA ; NOGUEIRA, TIAGO ROCHA ; ISLAM, MUHAMMAD TOREQUL ; RIOS, MARIA ALEXSANDRA DE SOUSA ; GRAÇAS LOPES CITÓ, ANTÔNIA MARIA DAS ; UDDIN, SHAIKH JAMAL ; SHILPI, JAMIL A. ; DAS, ASISH K. ; LOPES, LUCIANO DA SILVA ; MELO-CAVALCANTE, ANA AMÉLIA DE CARVALHO . Anxiolytic effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell in mice. **IUBMB life**, v. 70, p. 420-431, 2018.

GULATI, S.; KAUSHIK, J.S. How I treat a first single seizure in a child. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v.19, p. 29-36, 2016.

HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634–58, 2006.

HAMED, H.; RAZAVI-ROHANI, S. M.; GANDOMI, H. Combination effect of essential oils of some herbs with monolaurin on growth and survival of *Listeria monocytogenes* in culture media and cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, p.304-310, 2014.

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

HANUŠOVÁ, V.; CALTOVÁ, K.; SVOBODOVÁ, H.; AMBROŽ, M.; SKARKA, A.; MURÍNOVÁ, N.; SKÁLOVÁ, L. The effects of β -caryophyllene oxide and transnerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 828-836, 2017.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews drug discovery**, v. 14, p. 111, 2015.

- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; GILL, S. S.; ALHARBY, H. F.; RAZAFINDRABE, B. H.; FUJITA, M. Hydrogen peroxide pretreatment mitigates cadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L.: an intrinsic study on antioxidant defense and glyoxalase systems. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 115, 2017.
- HERAVI, J.M.; PARASTAR, H. Recent trends in application of multivariate curve resolution approaches for improving gas chromatography–mass spectrometry analysis, **Talanta**, v. 85, p.5-22, 2011
- HERRMANN, K.; SCHUMACHER, F.; ENGST, W.; APPEL, K. E.; KLEIN, K.; ZANGER, U. M.; GLATT, H. Abundance of DNA adducts of methyleugenol, a rodent hepatocarcinogen, in human liver samples. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 1025-1030, 2013.
- HERT, J.; IRWIN, J. J.; LAGGNER, C.; KEISER, M. J.; SHOICHET, B. K. Quantifying biogenic bias in screening libraries. **Nature chemical biology**, v. 5, p. 479, 2009.
- HEZEL, D. M.; STEWART, S. E.; RIEMANN, B. C.; MCNALLY, R. J. Standard of proof and intolerance of uncertainty in obsessive-compulsive disorder and social anxiety disorder. **Journal of Behavior Therapy and Experimental**, v.1, p. 3-19, 2019.
- HOSTETTER, A. A; OSBORN, M. F.; DE ROSE, V. J. Characterization of RNA-Pt Adducts Formed from Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Chem Biol**, v. 7, p. 218–225, 2012.
- HOY, S. M. Topiramate extended release: a review in epilepsy. **CNS drugs**, v. 30, p. 559-566, 2016.
- HUANG, H.; ZHOU, H.; WANG, N. Recent advances in epilepsy management. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 73, p. 7-10, 2015.
- HUANG, M.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, p. 997-1008, 2012.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.
- ISLAM, M.T. Diterpenes and their derivatives as potential anticancer agents. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 691–712, 2017.

ISLAM, M.T.; DA MATA, A.M.; DE AGUIAR, R.P.; PAZ, M.F.; DE ALENCAR, M.V.; FERREIRA, P.M.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.

Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpenes. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 1420–1444, 2016.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Advances in phytomedicine**, v. 3, p. 29-44, 2006.

JI, H. Y.; LIU, K. H.; KONG, T. Y.; JEONG, H. U.; CHOI, S. Z.; SON, M.; CHO, Y. Y.; LEE, H. S. Evaluation of DA-9801, a new herbal drug for diabetic neuropathy, on metabolism-mediated interaction. **Archives of pharmacal research**, v. 36, p. 1-5, 2013.

JIN, M.; KIJIMA, A.; SUZUKI, Y.; HIBI, D.; INOUE, T.; ISHII, Y.; NOHMI, T.; NISHIKAWA, A.; OGAWA K.; UMEMURA, T. Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with gpt delta rats. **Toxicology**, v. 290, p. 312-321, 2011.

JINDAL, A.; MAHESH, R.; BHATT, S. Etazolate, a phosphodiesterase 4 inhibitor reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior and brain oxidative damage. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 105, p. 63-70, 2013.

JOHNSON, E. L. Seizures and Epilepsy. **Medical Clinics of North America**, v.1, p.2-14, 2018.

KANDRATAVICIUS, L.; BALISTA, P. A.; LOPES-AGUIAR, C.; RUGGIERO, R. N.; UMEOKA, E. H.; GARCIA-CAIRASCO, N.; LEITE, J. P. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 10, p. 1693, 2014.

KANDRATAVICIUS, L.; ROSA-NETO, P.; MONTEIRO, M. R.; GUIOT, M. C.; ASSIRATI JR, J. A.; CARLOTTI JR, C. G.; LEITE, J. P. Distinct increased metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) in temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. **Hippocampus**, v. 23, p. 1212-1230, 2013.

KAPLAN, G. B.; MOORE, K. A. The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 217-228, 2011.

KAPPEL, V. D. Avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*. 2007.

KATSUYAMA, S.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KOMATSU, T.; NAGAOKA, K.; NAKAMURA, H.; BAGETTA, G.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain**, v. 17, p. 664–675, 2013.

KATZMAN, M. A.; BLEAU, P.; BLIER, P.; CHOKKA, P.; KJERNISTED, K.; VAN AMERINGEN, M. Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders. **BMC psychiatry**, v. 14, p.1-14, 2014.

KHAZDAIR, M. R.; ANAEIGOUDARI, A.; HASHEMZEHI, M.; MOHEBBATI, R. Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 9, p. 98-105, 2019.

KIM, G.H.;KIM,E.; RHIE, A.L.; YOON , S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v.24, p. 325-340, 2015.

KIM, Y.; NA, K.; MYINT, A.; LEONARD, B.E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 64, p. 277–284, 2015.

KIRKLAND, D.; ZEIGER, E.; MADIA, F.; GOODERHAM, N.; KASPER, P.; LYNCH, A.; ROGIERS, V. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 775, p. 55–68, 2014.

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

KNOPP, A.; KIVI, A.; WOZNY, C.; HEINEMANN, U.; BEHR, J. Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Comparative Neurology**, v. 483, p. 476-488, 2005.

KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 13, p. 423-440, 2011.

KOUSAI, A.; MIZUNO, R.; IKOMI, F.; OHHASHI, T. ATP inhibits pump activity of lymph vessels *via* adenosine A1 receptor-mediated involvement of NO- and ATP-sensitive K⁺ channels. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. 2585–2597, 2004.

KRETH, J.; ZHU, L.; MERRITT, J.; SHI, W.; QI, F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. **Oral microbiology and immunology**, v. 23, p. 213-219, 2008.

KWAN, P.; ARZIMANOGLU, A.; BERG, A. T.; BRODIE, M. J.; ALLEN HAUSER, W.; MATHERN, G.; Moshé, S. L.; Perucca, E.; Wiebe, S.; FRENCH, J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task

Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, p. 1069-1077, 2010.

LANCIEGO, J.L.; BARROSO-CHINEA, P.; RICO, A.J.; CONTE-PERALES, L.; CALLÉN, L.; RODA, E.; GÓMEZ-BAUTISTA, V.; LÓPEZ, I.P.; LLUIS, C.; LABANDEIRA-GARCÍA, J.L.; FRANCO, R. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, p. 97–104, 2011.

LEE, J.S.; KIM, H.G.; HAN, J.M.; LEE, J.S.; SON, S.W.; AHN, Y.C.; SON, C.G. My elophil ameliorates brain oxidative stress in mice subjected to restraint stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.39, p. 339-347, 2017.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1643-1647, 2007.

LIANG, L. P.; PATEL, M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 316-322, 2006.

LIMA, D. K.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONÇALVES, H. P.; DE SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; FACUNDO, V. A. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 274-282, 2012.

LIU, J.; WANG, L. N.; WANG, Y. P. Topiramate for juvenile myoclonic epilepsy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, p.9-19, 2019.

LLEO, A.; GALEA, E.; SASTRE, M. Molecular targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurodegenerative diseases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, p. 1403-1418, 2007.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1-2, p. 105-123, 2002.

LÖSCHER, W. Animal models of intractable epilepsy. **Progress in neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 239-258, 1997.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-368, 2011.

LOZANO, A.C.C.; PINA, L.G.; URIBE, S.L; MEJIA, E.G. El orégano: propiedades y actividad biológica de sus componentes. **Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, v. 54, p. 100-111, 2004.

MACCOTTA, L.; HE, B.J.; SNYDER, A.Z.; EISENMAN, L.N.; BENZINGER, T.L.; ANCES, B.M.; CORBETTA, M.; HOGAN, R.E. Impaired and facilitated functional networks in temporal lobe epilepsy, **NeuroImage: Clinical**, v. 2, p. 862–872, 2013.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S. ; ISLAM, M. T. ; ALMEIDA, A. A. C. ; GOMES JUNIOR, A. L. ; MACHADO, K. C. ; SOUSA, D. P. ; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. ; FREITAS, R. M. . Effects of isopentyl ferulate on oxidative stress biomarkers and a possible GABAergic anxiolytic-like trait in Swiss mice. **Chemico-biological interactions**, v. 289, p. 119-130, 2018.

MAGARIÑOS, A. M.; DESLANDES, A.; MCEWEN, B. S. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. **European journal of pharmacology**, v. 371, p. 113-122, 1999.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria journal**, v. 10, p. 11-20, 2011.

MALANI, P. N. Harrison's principles of internal medicine. **JAMA**, v. 308, p. 1813-1814, 2012.

MARTINS, M. D. A. Clínica Médica. 2. ed. Barueri: Manole, v. 6, 2016.

MATHEMA, V. B.; KOH, Y. S.; THAKURI, B. C.; SILLANPÄÄ, M. Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. **Inflammation**, v. 35, p. 560-565, 2012.

MATHEW, S. J.; PRICE, R. B.; CHARNEY, D. S. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v.1, p. 89-98, 2008.

MCGEER, P. L.; SCHULZER, M.; MCGEER, E. G. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. **Neurology**, v. 47, p. 425-432, 1996.

MECOCCI, P.; POLIDORI, M.P. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 631-638, 2012.

MEERAN, M. N.; AL TAE, H.; AZIMULLAH, S.; TARIQ, S.; ADEGHATE, E.; OJHA, S. β -Caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activation of myocardial cannabinoid type-2 (CB2) receptors in rats. **Chemico-biological interactions**, 2019.

MENEZES, I. A.; MARQUES, M. S.; SANTOS, T. C.; DIAS, K. S.; SILVA, A. B.; MELLO, I. C.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192-195, 2007.

- MERFORT, I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. **Current drug targets**, v. 12, p. 1560-1573, 2011.
- MOYLAN, S.; EYRE, H. A.; MAES, M.; BAUNE, B. T.; JACKA, F. N.; BERK, M. Exercising the worry away: how inflammation, oxidative and nitrogen stress mediates the beneficial effect of physical activity on anxiety disorder symptoms and behaviours. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, p. 573-584, 2013.
- MURO, V. M.; CONNOLLY, M. B. Classifying Epileptic Seizures and the Epilepsies. **Epilepsy**, p. 10-14, 2014.
- NEVITT, S. J.; SMITH, C. T.; WESTON, J.; MARSON, A. G. Lamotrigine versus carbamazepine monotherapy for epilepsy: an individual participant data review. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, p.10-29, 2018.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NI, H.; JIANG, Y. W.; TAO, L. Y.; CEN, J. N.; WU, X. R. Effects of penicillin-induced developmental epilepticus on hippocampal regenerative sprouting, related gene expression and cognitive deficits in rats. **Toxicology letters**, v. 188, p. 161-166, 2009.
- NIEDZIELSKA, E.; SMAGA, I.; GAWLIK, M.; MONICZEWSKI, A.; STANKOWICZ, P.; PERA, J.; FILIP, M. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4094-4125, 2016.
- of essential oils, **Talanta**, v.85, p. 835-849, 2011.
- OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H.; BERNEGOSI, J.; SATO, C. S.; BRUNETTI, I. L.; SCARPA, M. A. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**, v.3, p. 55-69, 2014.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. **Epilepsy**. 2019. Acessado 08/04/2019. Disponível em : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.
- ORAV, A.; STULOVA, I.; KAILAS, T.; MÜÜRSEPP M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 2582-2586, 2004.
- PANAHI, Y.; SABOORY, E.; ROSHAN-MILANI, S.; DRAFSPHOOR, L.; RASMI, Y.; RASSOULI, A.; SADEGHI-HASHJIN, G. Acute and chronic effects of morphine on Low-Mg²⁺ ACSF-induced epileptiform activity during infancy in mice hippocampal slices. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 46-54, 2019.
- PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 1951-1962, 2004.

- PATKI, G.; SOLANKI, N.; ATROOZ, F.; ALLAM, F.; SALIM, S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain research**, v. 1539, p. 73-86, 2013.
- PAVITHRA, P. S.; MEHTA, Alka; VERMA, Rama S. Synergistic interaction of β -caryophyllene with aromadendrene oxide 2 and phytol induces apoptosis on skin epidermoid cancer cells. **Phytomedicine**, v. 47, p. 121-134, 2018.
- PEARSON, J.N.; ROWLEY, S.; LIANG, L.P.; WHITE, A.M.; DAY, B.J.; PATEL, M. Reactive oxygen species mediate cognitive deficits in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 289–297, 2015.
- PERASSOLO, M.; CARDILLO, A. B.; BUSTO, V. D.; GIULIETTI, A. M.; TALOU, J. R. Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Plants and Metabolic Engineering for Their Biotechnological Production. In: **Sesquiterpene Lactones**. Springer, Cham, 2018. p. 47-91.
- PÉREZ ZAMORA, C.; TORRES, C.; NUÑEZ, M. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, p. 544, 2018.
- PERTWEE, R.G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 397–411, 2009.
- PERUCCA, E., BATTINO, D., TOMSON, T. Gender issues in antiepileptic drug treatment. **Neurobiology of Disease**, v.72, p. 217–223, 2014.
- PETROVIĆ, G. M.; STAMENKOVIĆ, J. G.; KOSTEVSKI, I. R.; STOJANOVIĆ, G. S.; MITIĆ, V. D.; ZLATKOVIĆ, B. K. Chemical composition of volatiles; antimicrobial, antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of *Chaerophyllum aromaticum* L.(Apiaceae) essential oils and extracts. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, p. 160-185, 2017.
- RAEDT, R.; VAN DYCKE, A.; VAN MELKEBEKE, D.; DE SMEDT, T.; CLAEYS, P.; WYCKHUYS, T.; BOON, P. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. **Acta neurologica scandinavica**, v. 119, p. 293-303, 2009.
- RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-14, 2014.
- RALVENIUS, W.; BENKE, D.; ACUÑA, M.A.; RUDOLPH, U.; ZEILHOFER, H.U. Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subtype. **Nature Communications**, v.6, p. 1-10, 2015.

RAMARATNAM, SRIDHARAN; PANEBIANCO, MARIANGELA; MARSON, ANTHONY G. Lamotrigine add-on for drug-resistant partial epilepsy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 6, p.6-23, 2016.

RAMOS, K.; STANLEY, M. A. Anxiety Disorders in Late Life. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 14, p. 55–64, 2018.

RAVINDRAN, Lakshmi N.; STEIN, Murray B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, p. 839-854, 2010.

REHMAN, M. U.; WALI, A. F.; AHMAD, A.; SHAKEEL, S.; RASOOL, S.; ALI, R.; RASHID, S. M.; MADKHALI, H.; GANAIE, M. A.; KHAN, R. Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update. **Current neuropharmacology**, v. 17, p. 247-267, 2019.

REMES, O.; BRAYNE, C.; VAN DER LINDE, R.; LAFORTUNE, L. A systematic review of reviews on the prevalences of anxiety disorders in adult populations, **Brain Behavior**, v.6, p.2-11, 2016.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: **Lipid peroxidation**. InTechOpen, 2012.

ROSAS, E. C.; CORREA, L. B.; DAS GRAÇAS HENRIQUES, Maria. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: A target for discovering new therapies based on natural products. In: **Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis**. IntechOpen, 2017.

ROWLES, J.; OLSEN, M. Perspectives on the development of antioxidant antiepileptogenic agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, p. 1015-1027, 2012.

RYNN, M. A.; BRAWMAN-MINTZER, O. Generalized anxiety disorder: acute and chronic treatment. **CNS spectrums**, v. 9, n. 10, p. 716-723, 2004.

SADGROVE, N.; JONES, G. A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. **Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 48-102, 2015.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201-205, 2017.

SANTOS, Í. M. S.; TOMÉ, A. D. R.; SALDANHA, G. B.; FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C. G.; DE FREITAS, R. M. Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, p. 214-221, 2009.

SANTOS, N.A.; 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.

SAXENA, S.; CARONI, P. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. **Neuron**, v. 71, p. 35-48, 2011.

SCHENONE, M.; DANČÍK, V.; WAGNER, B. K.; CLEMONS, P. A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. **Nature chemical biology**, v. 9, p. 232-250, 2013.

SCHNAUBELT, K. the book entitled “Medical Aromatherapy. **Healing with Essential Oils**”, Frog, Ltd., Berkeley, Calif, 1999.

SHAFIEE, M.; AHMADNEZHAD, M.; TAYEFI, M.; AREKHI, S.; VATANPARAST, H.; ESMAEILI, H.; MOOHEBATI, M.; FERNS, G.A.; MOKHBER, N.; AREFHOSSEINI, S.R.; MOBARHAN, M.G. Depression and anxiety symptoms are associated with prooxidant-antioxidant balance: a population-based study. **Journal of Affective Disorders**, v. 1, p. 2-10, 2018.

SHARIFI-RAD, M.; NAZARUK, J.; POLITO, L.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; ROCHA, J. E.; COUTINHO, H. D. M.; YOUSAF, Z. Matricaria genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. **Microbiological research**, 2018.

SHARMA, A. K.; REAMS, R. Y.; JORDAN, W. H.; MILLER, M. A.; THACKER, H. L.; SNYDER, P. W. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicologic pathology**, v. 35, p. 984-999, 2007.

SHIN, E. J.; JEONG, J. H.; CHUNG, Y. H.; KIM, W. K.; KO, K. H.; BACH, J. H.; KIM, H. C. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry international**, v. 59, n. 2, p. 122-137, 2011.

SHORVON, S. D.; GOODRIDGE, D. M. G. Longitudinal cohort studies of the prognosis of epilepsy: contribution of the National General Practice Study of Epilepsy and other studies. **Brain**, v. 136, n. 11, p. 3497-3510, 2013.

SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SIGEL, E.; ERNST, M. The Benzodiazepine Binding Sites of GABA A Receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.39, p. 659–67, 2018.
SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CYEWSKI, R.; LERIN, L.; ROTAV, I.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHE, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589-594, 2010.

SONG, X.; XIAO, H. T.; LIAO, C. H.; LI, L.; KANG, Q. R.; JIANG, Y. C.; HU, X. P.; ZHENG, K.; FAN, L.; ZHANG, H. J.; HE, Z. D. Natural products: the master regulators of antiviral cytokines. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 18, p. 1805-1823, 2017.

STAERCK, C.; GASTEBOIS, A.; VANDEPUTTE, P.; CALENDIA, A.; LARCHER, G.; GILLMANN, L.; PAPON, N.; BOUCHARA, J. P.; FLEURY, M. J. J. Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 56-65, 2017.

STATHAKIS, C.I.; GKIZISA, P.L.; ZOGRAFOS, A.L. Metal-catalyzed cycloisomerization as a powerful tool in the synthesis of complex sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v.12, p.1-10, 2016.

STEINHOFF, B. J., STAACK, A. M. Is there a place for surgical treatment of nonpharmacoresistant epilepsy? *Epilepsy & Behavior*, 2018.
doi:10.1016/j.yebeh.2018.05.025

SUEN, D.F.; NARENDRA, D.P.; TANAKA, A.; MANFREDI, G.; YOULE, R.J. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p.11835-11840, 2010.

SZNARKOWSKA, A.; KOSTECKA, A.; MELLER, K.; BIELAWSKI, K. P. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15996, 2017.

TEWARI, A.; MAHENDRU, V.; SINHA, A.; BILOTTA, F. The new frontier for translational research in cerebroprotection. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 30, p. 160, 2014.

TOMSON, T.; STEINHOFF, B. J. Principles of drug treatment in adults. In: **Handbook of clinical neurology**. Elsevier, 2012. p. 683-698.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017.

TRINKA, E.; BEN-MENACHEM, E.; KOWACS, P. A.; ELGER, C.; KELLER, B.; LÖFFLER, K.; SOARES-DA-SILVA, P. Efficacy and safety of eslicarbazepine acetate versus controlled-release carbamazepine monotherapy in newly diagnosed epilepsy: A phase III double-blind, randomized, parallel-group, multicenter study. **Epilepsia**, v. 59, p. 479-491, 2018.

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Stability of Essential Oils: A Review, **Reviews in Food Science and Nutrition**, v.12, p. 40-53, 2013.

VALDERRAMA, F.; RUIZ, F. An optimal control approach to steam distillation of 463 essential oils from aromatic plants. **Computers & Chemical Engineering**, v.117, p. 25-31, 2018.

VAN DEN POL, A. N.; OBRIETAN, K.; BELOUSOV, A. Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. **Neuroscience**, v. 74, p. 653-674, 1996.

VAVAKOVA, M.; DURACKOVA, Z.; TREBATICKA, J. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder. **Oxidative Medicine and Cell Longevity**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

VERROTTI, A.; CARROZZINO, D.; MILIONI, M.; MINNA, M.; FULCHERI, M. Epilepsy and its main psychiatric comorbidities in adults and children. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 343, p. 23-29, 2014.

VIDAURRE, J.; GEDELA, S.; YAROSZ, S. Antiepileptic Drugs and Liver Disease. **Pediatric Neurology**, v.77, p. 23-36, 2017.

VINGERHOETS, G. Cognitive effects of seizures. **Seizure**, v. 15, p. 221-226, 2006.

WALDBAUM, S.; LIANG, L. P.; PATEL, M. Persistent impairment of mitochondrial and tissue redox status during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. **Journal of neurochemistry**, v. 115, p. 1172-1182, 2010.

WALLACE, D. C.; ZHENG, X.; LOTT, M. T.; SHOFFNER, J. M.; HODGE, J. A.; KELLEY, R. I.; HOPKINS, L. C. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. **Cell**, v. 55, p. 601-610, 1988.

WALSH, S.; DONNAN, J.; FORTIN, Y.; SIKORA, L.; MORRISSEY, A.; COLLINS, K.; MACDONALD, D. A systematic review of the risks factors associated with the onset and natural progression of epilepsy. **Neurotoxicology**, v.61, p. 64-77, 2016.

WANG, G.; MA, W.; DU, J. β -Caryophyllene (BCP) ameliorates MPP⁺ induced cytotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1086-1091, 2018.

WANG, J.; CHEN, Y.; WANG, Q.; VAN LUIJTELAAR, G.; SUN, M. The effects of lamotrigine and ethosuximide on seizure frequency, neuronal loss, and astrogliosis in a model of temporal-lobe epilepsy. **Brain research**, v. 1712, p. 1-6, 2019.

WASTERLAIN, C. G.; FUJIKAWA, D. G.; PENIX, L.; SANKAR, R. Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. **Epilepsia**, v. 34, p. 37-53, 1993.

WIGLUSZ, M. S.; LANDOWSKI, J.; CUBAŁA, W. J. Psychometric properties of

the Polish version of the Hamilton Anxiety Rating Scale in patients with epilepsy with and without comorbid anxiety disorder. **Epilepsy & Behavior**, v. 94, p. 9–13, 2019.

WOZNY, C.; KIVI, A.; LEHMANN, T. N.; DEHNICKE, C.; HEINEMANN, U.; BEHR, J. Comment on "on the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". **Science**, v. 301, p. 463-463, 2003.

WU, S. B.; MA, Y. S.; WU, Y. T.; CHEN, Y. C.; WEI, Y. H. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. **Molecular neurobiology**, v. 41, p. 256-266, 2010.

XU, Y.; WANG, C. J.; KLABNIK, J.; M O'DONNELL, J. Novel therapeutic targets in depression and anxiety: antioxidants as a candidate treatment. **Current neuropharmacology**, v. 12, p. 108-119, 2014.

YANG, C.; HU, D. H; FENG, Y. Antibacterial activity and mode of action of the *Artemisia capillaris* essential oil and its constituents against respiratory tract infection-causing pathogens. **Molecular medicine reports**, v. 11, p. 2852-2860, 2015.

YOO, H. J.; JWA, S. K. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of oral biology**, v. 88, p. 42-46, 2018.

YOUSEFI A. M.; KHORSHIDIAN, N.; MORTAZAVIAN, A. M.,; HOSSEINI, H. A review on the impact of herbal extracts and essential oils on viability of probiotics in fermented milks. **Current Nutrition and Food Science**, v. 13, p.6-15, 2017.

ZARRUK, J.G.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, D.; GARCÍA-YÉBENES, I.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M.S.; VIVANCOS, J.; NOMBELA, F.; TORRES, M.; BURGUETE, M.C.; MANZANARES, J.; LIZASOAIN, I.; MORO, M.A. Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. **Stroke**, v. 43, p. 211–219, 2012.

ZHANG, M.; ADLER, M.W.; ABOOD, M.E.; GANEA, D.; JALLO, J.; TUMA, R.F. CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. **Microvascular Research**, v. 78, p. 86–94, 2009.

ZHANG, M.; MARTIN, B.R.; ADLER, M.W.; RAZDAN, R.K.; GANEA, D.; TUMA, R.F. Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. **Neuroscience**, v. 152, p. 753–760, 2008.

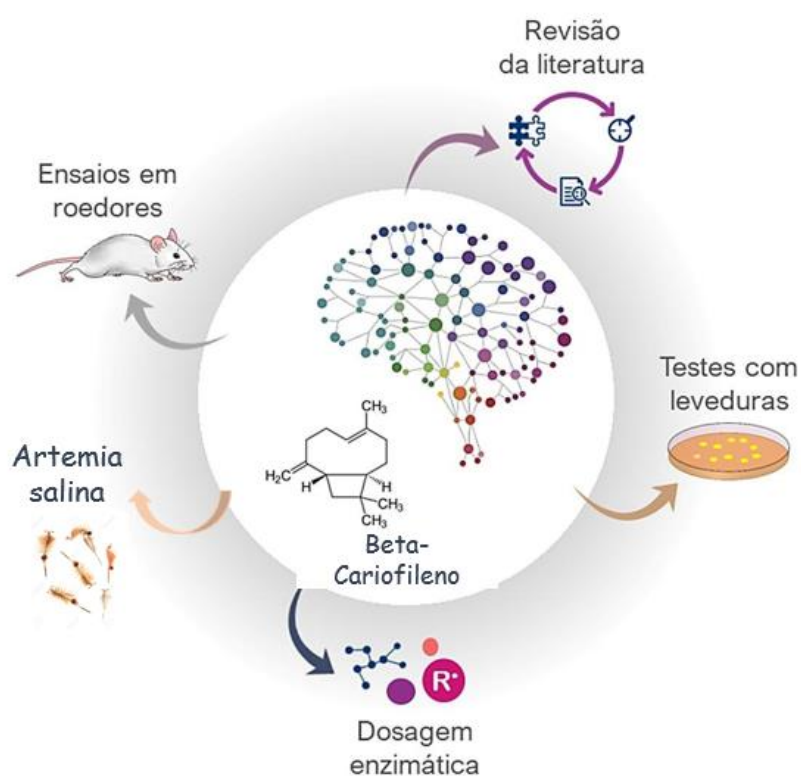
ZHU, L.; ZHONG, M.; ZHAO, J.; RHEE, H.; CAESAR, I.; KNIGHT, E. M.; VOLPICELLI-DALEY, L.; BUSTOS, V.; NETZER, W.; LIU, L.; LUCAST, L.; EHRlich, M. E.; ROBAKIS, N. K.; GANDY, S.E.; CAI, D. Reduction of synaptojanin 1 accelerates A β clearance and attenuates cognitive deterioration

in an Alzheimer mouse model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 32050-32063, 2013.

ZMUDZKA, E., SAŁACIAK, K.; SAPA, J.; PYTKA, K. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life Science**, v.1, p.44-77, 2018.

ZUZARTE, M.; SALGUEIRO, L. Essential oils chemistry. In: Bioactive essential oils and cancer. **Springer**, v.1, p. 19-61, 2015.

4. ANÁLISE EXPERIMENTAL



4.1 1º CAPÍTULO

Uma revisão sistemática sobre as perspectivas neuroprotetoras do beta-cariofileno

A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta caryophyllene

(Artigo publicado na *Phytotherapy Research*, v. 32, 2018)

**UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE AS PERSPECTIVAS
NEUROPROTETORAS DO BETA-CARIOFILENO
A SYSTEMATIC REVIEW ON THE NEUROPROTETRIC PERSPECTIVES OF
BETACARYPHYLENE**

Keylla da Conceição Machado¹; Muhammad Torequul Islam^{2,3}; Eunüs S. Ali^{4,5}; Razina Rouf⁶; Shaikh Jamal Uddin⁷; Shrabanti Dev⁷; Jamil A. Shilpi⁷; Manik Chandra Shill⁸; Hasan Mahmud Reza⁸; Asish Kumar Das⁷; Subrata Shaw⁹; Mohammad S. Mubarak¹⁰; Siddhartha Kumar Mishra¹¹; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹

¹Rede de Biotecnologia do Nordeste (RENORBIO), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil

²Departamento de Gestão do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Universidade Ton Duc Thang, Cidade de Ho Chi Minh, Vietnã

³Faculdade de Farmácia, Universidade Ton Duc Thang, Cidade de Ho Chi Minh, Vietnã

⁴Departamento de desenvolvimento de produto, Gaco Pharmaceuticals Limited, Dhaka, Bangladesh

⁵ Universidade Flinders, Bedford Park, 5042, Adelaide, Austrália

⁶Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências da Vida, Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Universidade de Ciência e Tecnologia, Gopalganj, Bangladesh

⁷Dicente de Farmácia, Escola de Ciências da Vida, Universidade Khulna, Khulna, Bangladesh

⁸Departamento de Ciências Farmacêuticas, North South University, Dhaka, Bangladesh

⁹ Instituto do MIT e Harvard, 415 Main Street, Cambridge, MA 02142, EUA

¹⁰Departamento de Química, Universidade da Jordânia, Amã, Jordânia ¹¹Laboratório de Biologia do Câncer, Escola de Ciências Biológicas (Zoologia), Dr. Harisingh Gour Central University, Sagar, Índia

RESUMO

O beta-cariofileno é um importante sesquiterpeno de vários óleos essenciais de plantas com várias atividades farmacológicas importantes, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, cardioprotetora, hepatoprotetora, gastroprotetora, nefroprotetora, antimicrobiana e imunomoduladora. Estudos recentes sugerem que ele também possui efeito neuroprotetor. Este estudo revisa os trabalhos publicados referentes às atividades neurofarmacológicas do beta-cariofileno (BCF). Bases de dados como *PubMed*, *Scopus*, *MedLine Plus* e *Google Scholar* com palavras-chave: beta-cariofileno e outras palavras-chave associadas a atividades neurológicas foram pesquisadas. Os dados foram extraídos de artigos que relatavam informações sobre a dose ou concentração/via de administração, sistema de teste e mecanismo de ação proposto. Um total de 545 artigos foram registrados e, após critérios de exclusão, apenas 41 estudos foram incluídos nesta revisão. Os resultados da pesquisa sugerem que o beta-cariofileno apresenta um papel protetor em vários distúrbios relacionados ao sistema nervoso, incluindo dor, ansiedade, espasmo, convulsão, depressão, alcoolismo e doença de *Alzheimer*. Além disso, o BCF tem atividade semelhante a anestésicos local, podendo proteger o sistema nervoso do estresse oxidativo e da inflamação, e pode atuar como um agente imunomodulador. A maioria das atividades neurológicas deste produto natural tem sido associada aos receptores canabinoides (CBR's), especialmente o CB2R. Esta revisão sugere uma possível aplicação do BCF como agente neuroprotetor.

Palavras-chave: fitocanabinoide; antioxidante; anti-inflamatório; neuroproteção.

ABSTRACT: Beta (β)-caryophyllene (BCAR) is a major sesquiterpene of various plant essential oils reported for several important pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, cardioprotective, hepatoprotective, gastroprotective, nephroprotective, antimicrobial, and immunomodulatory activity. Recent studies suggest that it also possesses neuroprotective effect. This study reviews published reports pertaining to the neuropharmacological activities of BCAR. Databases such as PubMed, Scopus, MedLine Plus, and Google Scholar with keywords “beta (β)-caryophyllene” and other neurological keywords were searched. Data were extracted by referring to articles with information about the dose or concentration/route of administration, test system, results and discussion, and proposed mechanism of action. A total of 545 research articles were recorded, and 41 experimental studies were included in this review, after application of exclusion criterion. Search results suggest that BCAR exhibits a protective role in a number of nervous system-related disorders including pain, anxiety, spasm, convulsion, depression, alcoholism, and Alzheimer's disease. Additionally, BCAR has local anesthetic-like activity, which could protect the nervous system from oxidative stress and inflammation and can act as an immunomodulatory agent. Most neurological activities of this natural product have been linked with the cannabinoid receptors (CBRs), especially the CB2R. This review suggests a possible application of BCAR as a neuroprotective agent.

Keywords: anti-inflammatory, antioxidant, neuro-protection, phytocannabinoid

INTRODUÇÃO

Os canabinoides são uma classe de diversos compostos químicos que atuam nos receptores canabinoides nas células que modulam a liberação de neurotransmissores no cérebro. Ligantes para estes receptores incluem endocanabinoides (origem animal), fitocanabinoides (origem vegetal) e canabinoides sintéticos (origem artificial) (PERTWEE, 2009). Entre os canabinoides mais notáveis está o tetraidrocanabinol, um fitocanabinoide que age como um composto psicoativo primário a partir da cannabis, seu outro constituinte principal é o canabidiol (PERTWEE, 2009). Os canabinoides são mediados, principalmente, pela ação dos receptores canabinoides tipo 1 e 2 acoplados à proteína G (CB1Rs/CB2Rs). Inicialmente, pensava-se que os CB2Rs eram expressos principalmente em microglia e em células imunes periféricas, regulando os antígenos, a produção de citocinas/quimiocinas e a migração celular (CABRAL *et al.*, 2009). Os CB2Rs assumem papéis importantes na inflamação, fisiopatologia isquêmica (IADECOLA; ANRATHER, 2011) e

efeitos protetores em vários órgãos periféricos (MONTECUCCO *et al.*, 2009). Portanto, eles podem ser direcionados para o tratamento de muitas doenças e distúrbios neurológicos (DNs). DNs são as doenças ou distúrbios do cérebro, coluna vertebral e nervos. Até o momento, foram identificadas mais de 600 doenças do sistema nervoso, como tumores cerebrais, epilepsia, doença de *Parkinson* (DP), acidente vascular cerebral (AVC), bem como doenças menos familiares, como demência frontal temporal (VILALTA E BROWN, 2017).

A busca de medicamentos para aliviar a dor e curar várias doenças neurológicas é um processo antigo (até 60.000 anos atrás) e ainda está em andamento (SUMMER, 2000). Muitos metabolitos secundários estão presentes nas plantas com inúmeras bioatividades e importância farmacêutica, que também têm efeitos terapêuticos e quimiopreventivos contra várias doenças (AKTAR; FOYZUN, 2017). O uso de plantas medicinais e/ou produtos naturais derivados de plantas está ganhando interesse dos cientistas devido ao seu perfil de segurança, maior eficácia e uso antigo em várias práticas tradicionais. Os terpenos são metabolitos secundários das plantas e estão abundantemente presentes na natureza (ISLAM, 2017a). Muitos terpenos são usados como aditivos alimentares e na indústria cosmética (ISLAM *et al.*, 2016a). Óleos essenciais (OEs) de várias plantas consistem, principalmente, de sesquiterpenos, alguns diterpenos e também podem conter fenólicos simples. Semelhante aos OEs totais, os componentes individuais dos terpenos possuem importantes propriedades biológicas, como antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios e anticancerígenos (ALENCAR *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2016a, b; ISLAM, 2017a). Até o momento, vários terpenoides foram introduzidos como agentes contra DNs como depressão, ansiedade, epilepsia, acidente vascular cerebral, doença de *Alzheimer* (DA), DP, entre outros. Essas propriedades sugerem que esse grupo de OEs pode ser uma fonte alternativa para o desenvolvimento de medicamentos neurológicos (CHANG *et al.*, 2007).

Beta-cariofileno (BCF) é um sesquiterpeno bicíclico natural, e é um constituinte comum em muitos óleos essenciais, especialmente óleo de cravo, *Cannabis sativa*, alecrim e lúpulo (GHELARDINI *et al.*, 2001). O cariofileno também exerce atividade neuroprotetora (GHALIB *et al.*, 2012; KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015). Por outro lado, o BCF é um ligante de canabinoide derivado de planta (ou alimento) (GERTSCH, 2017) que é um sesquiterpeno

bicíclico natural e é encontrado em OEs de várias plantas (**Tabela 1**). A biossíntese do BCF é apresentada no **Esquema 1**.

Tabela 1. Fontes de beta-cariofileno (BCF) (porcentagens de óleos essenciais contendo seu conteúdo)

Fonte	Referências
<i>Cinnamomum tamala</i> (25.3%)	Ahmed et al., 2000
<i>Syzygium aromaticum</i> (1.7–19.5%)	Ghelardini et al., 2001
<i>Piper nigrum</i> (7.29%)	Jirovetz et al., 2002
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (6.9 – 11.1%)	Kaul et al., 2003
<i>Sinularia nanolobata</i> (soft coral)	Ahmed et al., 2004
<i>Ocimum micranthum</i> (4.0 –19.8%)	Silva et al., 2004
<i>Carum nigrum</i> (7.8%)	Singh et al., 2006
<i>Lavandula angustifolia</i> (4.62 – 7.55%)	Prashar et al., 2004; Umezu et al., 2006
<i>Cananga odorata</i> (3.1–10.7%)	Manner et al., 2006
<i>Hyptis fruticosa</i> (leaf)	Menezes et al., 2007
<i>Humulus lupulus</i> (5.1 – 14.5%)	Bernotienė et al., 2004; Wang et al., 2008
<i>Eremanthus erythropappus</i>	Sousa et al., 2008
<i>Cannabis sativa</i> (flower, 3.8–37.5%)	Gertsch et al., 2008
<i>Ocimum gratissimum</i> (5.3 – 10.5%)	Zheljazkov et al., 2008
<i>Origanum vulgare</i> (4.9 – 15.7%)	Harvala et al., 1987; Mockute et al., 2001; Calvo-Irabien et al., 2009
<i>Rosmarinus officinalis</i> (0.1 – 8.3%)	Ormeño et al., 2008; Jamshidi et al., 2009
<i>Senecio rufinervis</i>	Mishra et al., 2010
<i>Baccharis uncinella</i>	Ascari et al., 2012
<i>Didymocarpus tomentosa</i> (leaf, sesquiterpenes 78.7%)	Gowda et al., 2012
<i>Copaifera</i> spp.	Sousa et al., 2011; Leandro et al., 2012
<i>Pterodon emarginatus</i>	Alberti et al., 2014
<i>Aegle marmelos</i>	Sain et al., 2014
<i>Vitex agnus-castus</i>	Khalilzadeh et al., 2015
<i>Ocimum basilicum</i>	Rabbani et al., 2015
<i>Valeriana officinalis</i>	Ricigliano et al., 2016

O BCF é aprovado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos e agências Europeias como aditivo alimentar, intensificador de sabor e agente aromatizante (CHICCA et al., 2014). Além disso, este composto apresenta

importantes atividades farmacológicas, como anticâncer (FIDYT *et al.*, 2016), cardioprotetor, hepatoprotetor, gastroprotetor, nefroprotetor, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, imunomodulatório e neuroprotetor (CHICCA *et al.*, 2014; FIDYT *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2016). É também um agonista CB2R completo e pode ser usado para tratar vários DNs, como isquemia cerebral (PERTWEE, 2009) e lesões (ZARRUK *et al.*, 2012), lesões cerebrais (ZHANG *et al.*, 2008), neuroinflamação (ZHANG *et al.*, 2009), bem como problemas em neurônios corticais, hipocâmpais e cerebelares e células gliais (LANCIEGO *et al.*, 2011). Além disso, o BCF pode ativar as isoformas dos receptores ativadas por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e pode inibir as vias desencadeadas pela ativação do complexo receptor do tipo: CD14/TLR4/MD2. Assim, reduz os processos imuno-inflamatórios e exibe sinergia com as vias dependentes do receptor opioide μ . Além disso, BCF foi encontrado por atuar como um potente antagonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais (nAChRs) sendo desprovido de efeitos mediados por receptores serotoninérgicos e GABAérgicos (KATSUYAMA *et al.*, 2013). Coletivamente, esses estudos destacam o efeito protetor do sistema de sinalização canabinoide em DNs, enquanto o BCF atua como um agonista do CB2R. Esses estudos também sugerem que o BCF exerce efeitos profiláticos e curativos contra distúrbios neuronais inflamatórios por meio de seu mecanismo antioxidante e anti-inflamatório. Com base na discussão acima, este estudo apresenta uma revisão sistemática sobre os efeitos neurológicos do BCF, analisando os relatórios publicados que tratam de estudos experimentais em neuroproteção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estratégia de pesquisa

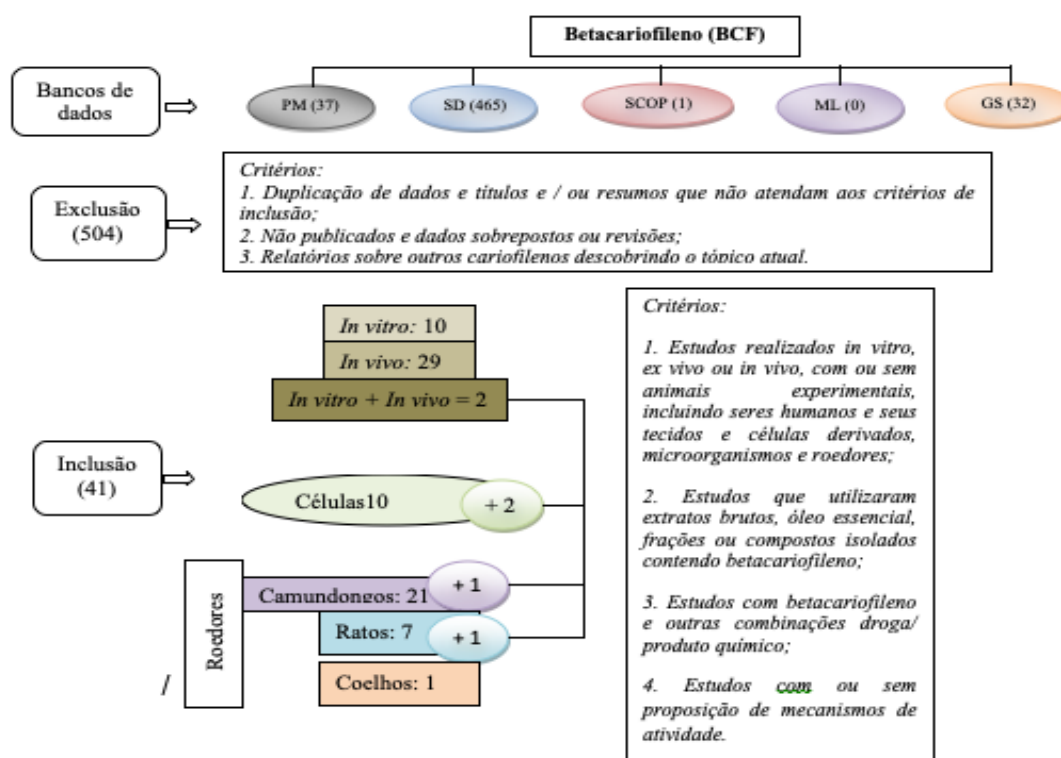
Bancos de dados: a pesquisa foi feita em bancos de dados como *PubMed*, *Scopus*, *MedLine Plus* e *Google Scholar* até novembro de 2017.

Seleção do estudo: As palavras-chave para pesquisa foram beta-cariofileno, juntamente com sistema nervoso, neuroproteção, neuroinflamação, ansiedade,

depressão, sedativo ou hipnótico, imunomodulador, analgésico/antinociceptiva, efeito psicológico, miorelaxante, antiespasmódico, doenças anticonvulsivas, epilépticas, *Alzheimer*, *Parkinson* e neurodegenerativas. Nenhuma restrição de idioma foi imposta.

Extração de dados: Os artigos foram avaliados quanto à informação sobre a dose ou concentração/via de administração, sistema de teste, resultados e discussão, conclusões finais e o possível mecanismo de ação. Os achados gerais da pesquisa, juntamente com os critérios de inclusão e exclusão de evidências, foram mostrados no fluxograma da **Figura 1**.

Figura 1. Fluxograma para inclusão/exclusão e curso geral de processamento de dados.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 545 estudos foram obtidos nas bases de dados: *PubMed*, 37; *ScienceDirect*, 465; *Scopus*, 1; *MedLine Plus*, 0; e o *Google Acadêmico*, 32. Após a exclusão (**Figura 1** para os critérios de exclusão), um total de 41 investigações experimentais foram incluídas nesta revisão. Dez estudos foram diretamente associados às fontes naturais do BCF, enquanto os outros não. Outras estudos

do BCF mencionados neste artigo foram 22 fontes, que indicam conter esse composto. De todos os artigos relevantes, 24,39% dos estudos pertencem a estudos *in vitro*, enquanto 70,73 e 4,88% foram *in vivo* e a combinação de estudos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Dez estudos foram realizados em linhagens celulares (derivadas de humanos e roedores), 28 em roedores (camundongos, 21; ratos, 7), 1 com coelho e 2 como uma mistura de estudos não clínicos e pré-clínicos. Os achados gerais foram categorizados em ações farmacológicas específicas.

EFEITOS NEUROFARMACOLÓGICOS DO BETA-CARIOFILENO ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO BCF

BCF contra o estresse oxidativo no cérebro

Suspeita-se que os fatores ambientais desempenham um papel importante no início e na gravidade das DNs. No entanto, a hereditariedade, o envelhecimento e outros fatores, como o estresse oxidativo, estão ligados a muitas patologias neurológicas (ISLAM, 2017b).

Na linhagem celular de glioma C6, BCF em 0,5 e 1,0 μM foi demonstrado melhorar as respostas antioxidantes celulares através da ativação do fator nuclear relacionado ao fator eritroide 2 (Nrf2) dependendo da estimulação CB2R (ASSIS *et al.*, 2014). Em outro estudo, Oiha e colaboradores (2016) mostraram que o BCF a 50 mg/kg (i.p) reduz a atividade da óxido nítrico sintase indutível (iNOS), restaurando as enzimas antioxidantes e inibindo a peroxidação lipídica e depleção de glutathiona em ratos *Wistar*. De maneira semelhante, a inibição da iNOS também foi evidente com o BCF a 50 mg/kg (v.o) em ratos *Wistar* (JAVED *et al.*, 2016), enquanto o BCF a 10, 25 e 50 μM inibiu, significativamente, a produção de óxido nítrico (NO) em células microgliais BV2 (HU *et al.*, 2017). Além disso, descobriu-se que o BCF a 25 e 50 mg/kg/dia (v.o.) inibe a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e NO em camundongos (FONTES *et al.*, 2017).

Os resultados da pesquisa indicaram que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e NO é conhecida por induzir toxicidade neuronal em neurônios corticais e estriados (ISLAM *et al.*, 2016c). O NO aumenta o efeito da ciclooxigenase (COX) (KOUSAI *et al.*, 2004) levando à formação de ácido araquidônico e prostaglandina PGH_2 , que, por sua vez, pode desencadear

a síntese de PGD₂ e PGE₂ causando inflamação. Por outro lado, o estresse oxidativo e oncogenes (por exemplo, KRAS, BRAF, MYC) podem induzir a expressão de Nrf2 a fim de desintoxicar ERO's (DENICOLA *et al.*, 2011). Portanto, o efeito antioxidante mediado pelo Nrf2 do BCF pode estar ligado à sua atividade neuroprotetora.

BCF em neuroinflamação

As respostas inflamatórias são agudas ou crônicas e o tipo de resposta determina seus efeitos finais nas funções sistêmicas. A inflamação aguda é benéfica e atua como uma defesa primária contra a infecção no processo de cura. Já as inflamações crônicas são prejudiciais devido ao seu tempo prolongado de reação inflamatória. No entanto, a inflamação crônica pode ocorrer após um ataque de inflamação aguda (SKAPER, 2017). Os monócitos permanecem no local, secretam citocinas e quimiocinas e estimulam a resposta adicional dos macrófagos, permitindo um fluxo contínuo de quimiocinas e citocinas. Interleucinas como IL-1 β e IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são capazes de aderir leucócitos ao endotélio, permitindo, assim, a produção de citocinas que resultam em inflamação. Por outro lado, as enzimas COX, devido à sua capacidade de sintetizar prostaglandinas, são mediadores conhecidos da neuroinflamação (ISLAM *et al.*, 2016d).

OEs de *Eremanthus erythropappus*, ricos em BCF, exibiram efeito anti-inflamatório em ratos *Wistar* (SOUSA *et al.*, 2008). Além disso, verificou-se que o BCF a 500 nM e 5 mg/kg (v.o.) exercia efeitos anti-inflamatórios não psicoativos em monócitos humanos primários e camundongos que não possuíam receptores canabinóide tipo 2 (GERTSCH *et al.*, 2008). De maneira semelhante, Chang e colaboradores (2013), mostraram que o BCF a 10 mg/kg inibe a expressão de RNAm de iNOS, interleucinas IL-1 β e IL-6 e COX-2 em células microgliais C6. Adicionalmente, verificou-se que o BCF (0,5, 5 e 50 μ M) suprime a resposta neuroinflamatória induzida por hipóxia através da inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) na linhagem celular BV2 murina (GUO *et al.*, 2014).

Os péptidos beta-amiloide (β A), consistindo em 36-43 aminoácidos, derivados da proteína precursora da amiloide, estão crucialmente envolvidos na DA como o principal componente das placas amiloides nos cérebros de pacientes

com DA (HAMLEY, 2012). Iba-1 é uma proteína idêntica do fator inflamatório de aloenxerto 1 [Aif-1, também conhecida como molécula adaptadora de ligação a cálcio ionizada 1 (IBA1)], é especificamente expressa em macrófagos/microglia e é suprarregulada durante a ativação dessas células uma lesão do nervo (ITO *et al.*, 1998), isquemia do sistema nervoso central (SNC) e várias outras doenças cerebrais. Por outro lado, a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é uma proteína de filamento intermediário que é expressa por numerosos tipos de células do SNC, incluindo astrócitos (JACQUE *et al.*, 1978) e células ependímicas (ROESSMANN *et al.*, 1980). Está envolvida em muitos processos importantes do SNC, como a comunicação celular e o funcionamento da barreira hematoencefálica na mitose (ajuste da rede de filamentos presentes na célula), interações astrócito-neurônio, comunicação célula-célula e reparo após lesão do SNC. A regulação negativa da GFAP é um marcador de alguns DNs (BUNGE *et al.*, 1961), como a doença de Alexander, que é uma desordem genética rara caracterizada por retardo mental e físico, demência, aumento do cérebro e da cabeça, espasticidade (rigidez braços e/ou pernas) e convulsões (HEALTHLINK, 2007), encefalopatia de Wernicke (CULLEN; HALLIDAY, 1994), síndrome de *Down*, esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (JOHNSTON-WILSON *et al.*, 2000).

Nas células microgliais BV2, os resultados da pesquisa indicaram que o BCF (10, 25 e 50 μ M) reduz, significativamente, a produção de NO e PGE₂, a expressão de iNOS e COX-2 e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (HU *et al.*, 2017). Além disso, uma notável atenuação da superexpressão de TLR4 ativada por A β 1-42 também foi observada. Além disso, Ojha *et al.* (2016) demonstraram que o BCF a 50 mg/kg (i.p.) pode salvar os neurônios dopaminérgicos e diminuir a ativação da microglia e dos astrócitos, conforme indicado pela expressão reduzida de Iba-1 e GFAP. O BCF também atenuou citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios como COX-2 e iNOS, restaurou enzimas antioxidantes e inibiu a peroxidação lipídica e a depleção de glutatona em ratos *Wistar* (OJHA *et al.*, 2016).

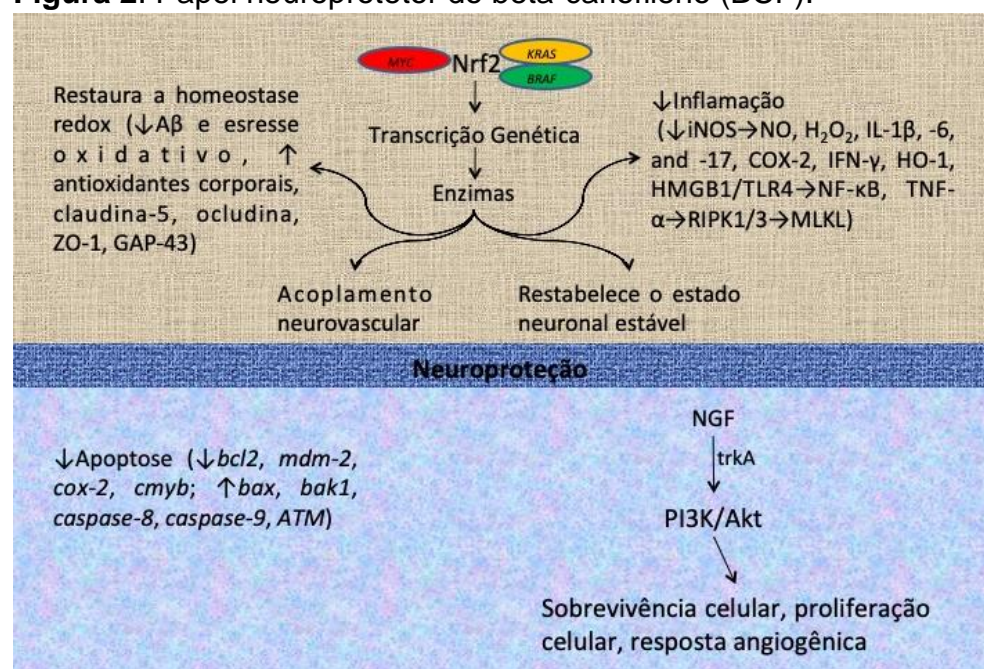
BCF como citoprotetor

Durante o tratamento com drogas, especialmente no câncer, a segurança das células normais é uma das principais preocupações (SASTRY *et al.*, 2017). Além disso, células normais sob estresse excessivo devem ser adequadamente protegidas. Neste contexto, antioxidantes e agentes anti-inflamatórios desempenham um papel importante como moléculas citoprotetoras (JAROSZ *et al.*, 2017). Antioxidantes podem agir através de várias vias, incluindo a eliminação de ERO's, enquanto fortalecem os sistemas antioxidantes/reparadores do corpo. Os agentes anti-inflamatórios reduzem ou inibem a geração e a secreção de mediadores pró-inflamatórios ou inflamatórios.

Em células de *Jurkat* e neuroblastoma humano (IMR-32), descobriu-se que o BCF (50 µg/mL) isolado de *Aegle marmelos* regula, negativamente, os genes antiapoptóticos, bcl-2, mdm2, cox-2 e cmyb, e até - regula genes pró-apoptóticos como bax, bak1, caspase-8 e -9 e ATM) (SAIN *et al.*, 2014). Além disso, o BCF, a 0,5 e 1,0 µM, exerceu um efeito citoprotetor na linhagem de glioma C6, melhorando as respostas antioxidantes celulares via ativação de Nrf2, que por sua vez é dependente da ativação do CB2R (ASSIS *et al.*, 2014). Além disso, o BCF a 50 mg/kg (v.o) apresentou capacidade de neuroproteção pela redução de IL-1β e -6, TNF-α, NF-kB, COX-2 e iNOS, mediada pela ativação de CB2R (JAVED *et al.*, 2016). Lou *et al.* (2016) demonstraram que o BCF a 34, 102 e 306 mg/kg (v.o) aumenta a expressão de Nrf2 e heme oxigenase 1 (HO-1) para melhorar o dano oxidativo e a apoptose neuronal em ratos *Wistar* (LOU *et al.*, 2016). Além disso, em células endoteliais microvasculares do cerebral, neurônios e astrócitos, o BCF a 10 µM/L diminuiu, significativamente, a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a apoptose neuronal, mitigou o estresse oxidativo e reduziu a liberação de citocinas inflamatórias. Também regulou negativamente a expressão de Bax e metalopeptidase de matriz 9 (MMP-9), enquanto regulava positivamente a claudina-5, ocludina, zônula de oclusão 1 (ZO-1), proteína associada ao crescimento 43 (GAP-43) e Bcl- 2 expressão (TIAN *et al.*, 2016). Recentemente, BCF a 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µM, ativou os receptores de tirosina quinase A (TrKA) e induziu a neuritogênese por um mecanismo independente do fator de crescimento do nervo (NGF) ou receptores de canabinoides nas células de neuroblastoma PC12 e SH-SY5Y (SANTOS *et al.*, 2016).

Achados recentes de pesquisa indicaram que o BCF (25 e 50 mg/kg/dia, v.o) (a) inibe a produção de H_2O_2 , NO, TNF- α , interferon gama (IFN- γ) e IL-17, (b) reduz o número de infiltrados inflamatórios, e (c) atenua danos neurológicos em camundongos EAE (FONTES *et al.*, 2017). De maneira semelhante, Viveros-Paredes *et al.* (2017) sugeriram que o BCF a 10 mg/kg (i.p.) exerce neuroproteção mediada pelo receptor CB2 e inibição da ativação da glia em camundongos. Além disso, BCF [0,2, 1, 5 e 25 μ M (*in vitro*) e 8, 24, 72 mg/kg (i.p) (*in vivo*)] exibiram efeitos neuroprotetores em neurônios primários de ratos pela regulação negativa do domínio da quinase de linhagem mista como (MLKL) e diminuindo os volumes de infarto, necrose neuronal, proteína quinase de interação de receptor (RIPK) -1 e -3 expressão, grupo de alta mobilidade caixa 1 (HMGB1), receptor do tipo Toll 4 (TLR4), IL -1 β e níveis de TNF- α (YANG *et al.*, 2017). Mostrado na **Figura 2** são as vias de neuroproteção do BCF.

Figura 2. Papel neuroprotetor do beta-cariofileno (BCF).



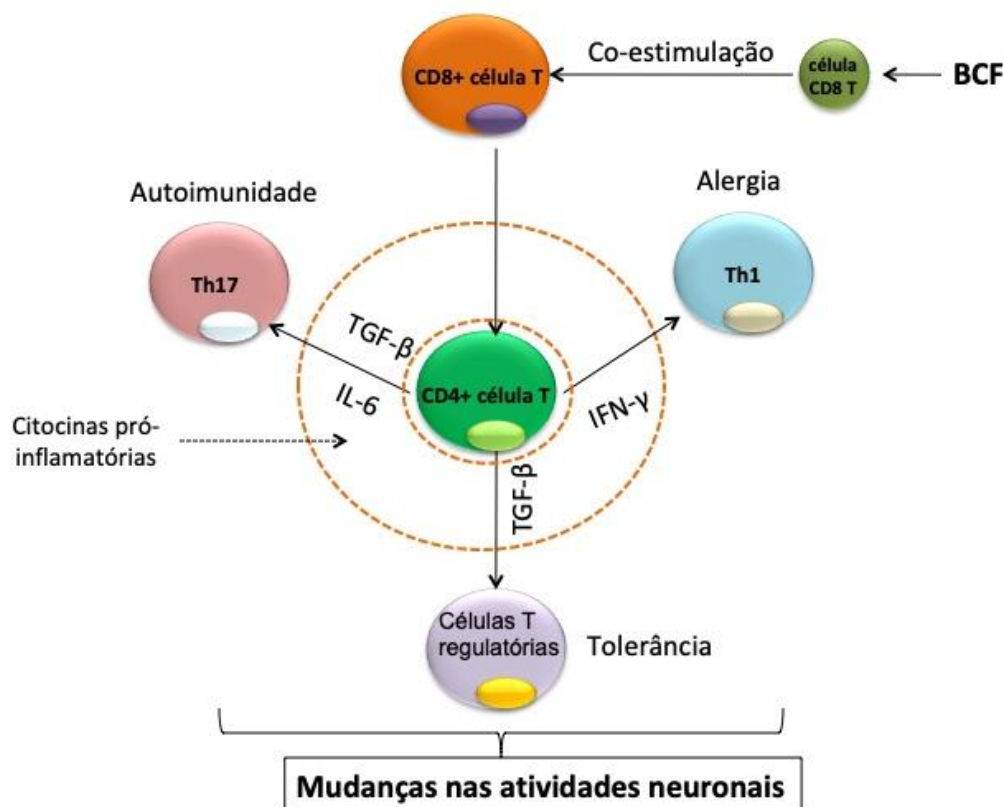
O BCF através da regulação positiva do fator nuclear 2 (NF2) causa a transcrição gênica que pode estimular as enzimas que podem manter o acoplamento neurovascular, restabelecer o estado estacionário neuronal, reduzir o estresse oxidativo (através de múltiplas vias), e reduzir ou inibe a neuroinflamação de várias maneiras. Além disso, o BCF é evidente para reduzir a

morte celular neuronal apoptótica regulando positivamente os genes antiapoptóticos (por exemplo, bax, bak1, caspase-8, caspase-9, ATM), enquanto a regulação negativa de genes apoptóticos (por exemplo, bcl2, mdm-2, cox -2, cmub). Adicionalmente, o BCF pode estimular o fator de crescimento nervoso (NGF) sobre a ação da quinase A (trkA) da tropomiosina, que regula positivamente a via da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (PI3K)/ proteína quinase B (Akt). O resultado final é a sobrevivência celular, proliferação celular e resposta angiogênica às células nervosas.

EFEITO IMUNOMODULATÓRIO

A esclerose múltipla (EM), uma grave doença desmielinizante inflamatória do SNC, é a causa mais comum de incapacidade neurológica não traumática em adultos jovens, e afeta mais de dois milhões de pessoas em todo o mundo. A este respeito, a desmielinização é evidente nos resultados do SNC de uma resposta autoimune mediada por células T, especialmente células Th17 e Th1 encefalitogênicas (WAGNER; GOVERMAN, 2015). O trabalho de Alberti e colaboradores (2014), revelaram que o OE, rico em BCF de *Pterodon emarginatus*, a 50 e 100 mg/kg (v.o.) melhora a encefalomielite autoimune através da modulação do equilíbrio de células Th1/Treg em camundongos *Swiss*. Além disso, em camundongos fêmeas C57BL/6, BCF a 1, 10 e 100 μ M (*in vitro*), e 25 e 50 mg/kg (v.o.) (*in vivo*) exerceram um efeito imunomodulador inibindo as células microgliais, CD4+ e CD8+ linfócitos T e expressão de citocinas pró-inflamatórias; diminuição da desmielinização axonal, enquanto modula o equilíbrio imunológico Th1/Treg através da ativação do CB2R (ALBERTI *et al.*, 2017). As vias imunomoduladoras mediadas pelo BCF estão representadas na **Figura 3**.

Figura 3. Possíveis vias neuro-imunomodulatórias do beta-cariofileno (BCF). [BCF pode estimular as células T CD8, que eventualmente estimula as células T CD4 a converter as células T CD4 em (células T CD4 +). As citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6, TNF- α , TGF- β , IFN- γ) por ação das células T CD4 + podem estimular as células Th1, Th17 e Treg e modular as atividades neurológicas.]



ATIVIDADE ANALGÉSICA/ANTINOCICEPTIVA

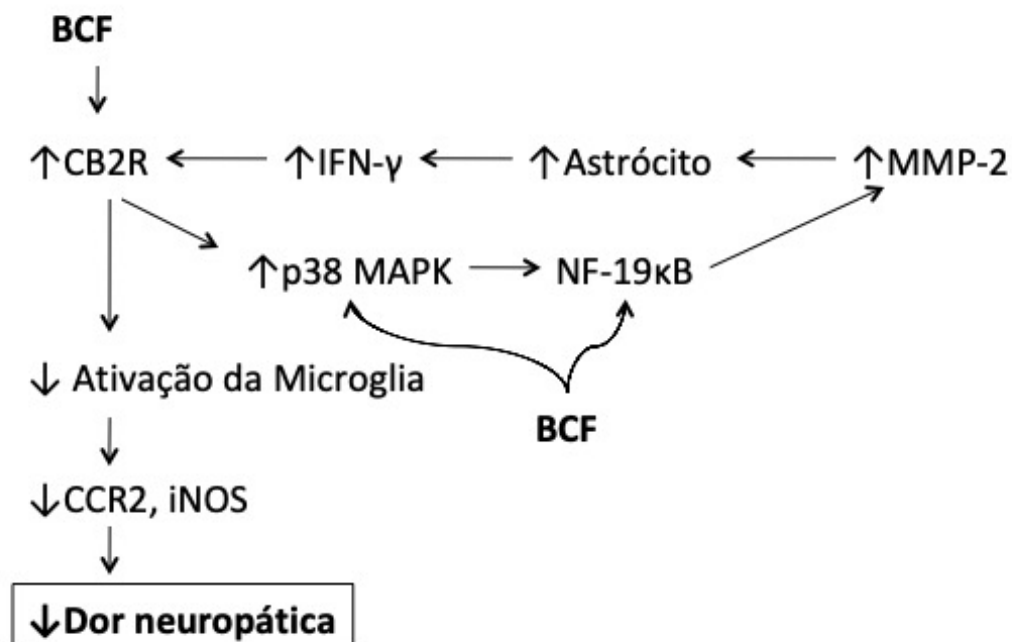
A dor crônica é um componente frequente de muitas patologias, afetando 20% a 40% dos pacientes com DN primária (BORSOOK, 2012). As drogas analgésicas atuam de várias maneiras no sistema nervoso periférico (SNP) e no SNC. Devido aos efeitos colaterais dos analgésicos, os medicamentos à base de plantas são frequentemente uma escolha popular (THOMAS *et al.*, 2016). OE, rico em BCF de *E. eritropappus*, na dose de 200 e 400 mg/kg (v.o.) mostrou efeito analgésico significativo em ratos *Wistar* (SOUSA *et al.*, 2008). Por outro lado, o OE do *Senecio rufinervis* contém 6,21% de BCF, seu óleo essencial (50 e 75 mg/kg, v.o.) também mostrou efeito analgésico dose-dependente significativo em camundongos (MISHRA *et al.*, 2010). Adicionalmente, a pesquisa publicada indicou que o BCF a 1 e 5 mg/kg (i.p.) exerce um efeito analgésico mediado por CB2R em camundongos (KLAUKE *et al.*, 2014). Além disso, o BCF (2,6

mg/kg/dia durante 2 semanas, p.o.) e/ou ácido docosa-hexaenoico também mostrou um efeito analgésico significativo em camundongos (FIORENZANI *et al.*, 2014). Neste último caso, uma melhor atividade foi observada no grupo de co-tratamento do que nos grupos tratados individualmente.

De um modo semelhante, o OE do BCF contendo folhas de *Hyptis fruticosa* exerceu um efeito antinociceptivo significativo em camundongos nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (s.c.) (MENEZES *et al.*, 2007). Por outro lado, o OE de *Vitex agnus-castus*, que contém BCF (6,9%), exerceu efeito antinociceptivo em modelos de teste de nocicepção em formol, ácido acético e imersão na cauda em ratos *Wistar* quando administrado em doses de 25 e 62,5 mg/kg, v.o) (KHALILZADEH *et al.*, 2015). Além disso, Katsuyama *et al.* (2012) demonstraram que o BCF (2,25; 4,5; 9 e 18 µg, i.p.) exibe um efeito antinociceptivo, possivelmente pela via dependente de CB2Rs em camundongos (KATSUYAMA *et al.*, 2012).

A inibição posterior da ativação da p38 MAPK/NF-κB está associada a efeitos anti-inflamatórios (JIA *et al.*, 2017). Recentemente, Segat e colaboradores relataram que o BCF a 25 mg/kg (v.o) atenua, efetivamente, a neuropatia periférica, possivelmente através da ativação do CB2R no SNC e posterior inibição da ativação de p38 MAPK/NF-κB e liberação de citocinas em camundongos (SEGAT *et al.*, 2017). MAPK-p38 e NF-κB desempenham papéis importantes na inflamação e fisiopatologia. Estudos demonstram que o bloqueio da atividade da p38 atenua a atividade transicional do fator de transcrição pró-inflamatório NF-κB sem alterar sua atividade de ligação ao DNA. O bloqueio da atividade de p38 tem sido associado à anti-inflamação em astrócitos primários humanos através da supressão da atividade mas não da atividade de ligação a DNA, o fator nuclear κB (NF-κB) e regulação negativa da expressão de iNOS (um produto gênico transicional dependente de NF-κB). A exploração dos mecanismos moleculares da regulação mediada por p38 do NF-κB continua sendo um caminho aberto no desenvolvimento de drogas para várias respostas inflamatórias, incluindo a neurodegeneração. O mecanismo do efeito analgésico/antinociceptivo mediado pelo BCF é mostrado na **Figura 4**.

Figura 4. Possível efeito analgésico do beta-cariofileno (BCF). [Através da estimulação do CB2R, ou sistema p38 MAPK / NF- κ B, o BCF pode regular negativamente a ativação da microglia, levando à regulação negativa do receptor de quimiocina C-C tipo 2 (CCR2) e iNOS, o que acabará reduzindo a dor neuropática.]



EFEITOS SEDATIVOS

A sedação (tranquilização) é a redução da irritabilidade ou agitação através da administração de drogas sedativas (por exemplo, propofol, etomidato, cetamina, fentanil, lorazepam, midazolam etc.). Estes medicamentos são geralmente usados em procedimentos cirúrgicos menores (por exemplo, endoscopia, vasectomia ou odontologia), cirurgia reconstrutiva, algumas cirurgias estéticas, remoção de dentes do siso ou para pacientes com ansiedade alta (BROWN *et al.*, 2005). Mishra e colaboradores (2013), demonstraram que o midazolam inibe o crescimento em leucemia humana de células de câncer de cólon, *in vitro* e *in vivo*. Além disso, induziu a via de apoptose intrínseca mitocondrial e a suspensão do ciclo celular na fase S e inibiu o crescimento tumoral em camundongos HT29 através de um mecanismo possivelmente independente da sinalização do receptor GABA_A (MISHRA *et al.*, 2013). Esses pesquisadores ainda sugerem que a dose e a condição para o uso de anestésicos devem ser levadas em consideração. Assim, antes da administração

destes fármacos, certas preocupações, tais como condições fisiopatológicas do paciente, incluindo AVC ou ataque isquêmico transitório, devem ser tomadas em consideração as perturbações neuromusculares (por exemplo, distrofia muscular). Entre os efeitos colaterais comuns associados com drogas sedativas, atualmente disponíveis, estão a dependência física e psicológica, inquietação, insônia a convulsões e até a morte devido à dosagem crônica (BONNET; SCHERBAUM, 2017; LI; QU, 2017). Portanto, a busca por novas drogas sedativas e mais seguras é crucial. Os fitoterápicos estão cada vez mais em destaque, como o BCF. Observou-se que o OE de *Baccharis uncinella*, contendo BCF a 50 ou 100 mg/kg (v.o.), exercia um efeito sedativo em camundongos (ASCARI *et al.*, 2012). Similarmente, observou-se que o OE de *Ocimum basilicum*, rico em BCF a 100, 150 e 200 mg/kg (i.p.), exerce um efeito sedativo significativo em camundongos sírios (RABBANI *et al.*, 2015). No entanto, os efeitos sedativos e mecanismo de ação do BCF precisam de mais investigações.

EFEITO ANSIOLÍTICO

A ansiedade é geralmente uma reação normal ao estresse que cria mais estresse e desconforto (MACKENZIE *et al.*, 2011). Benzodiazepínicos e inibidores seletivos de recaptção de serotonina são os ansiolíticos frequentemente utilizados. No entanto, produzem inúmeros efeitos colaterais, incluindo sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada, risco de acidentes, efeitos psicomotores, reações paradoxais, tolerância, risco teratológico, dependência, parto prematuro, doenças cardiovasculares, anormalidades neonatais, redução da densidade mineral óssea e aumento do risco de fratura óssea (CUNNINGHAM *et al.*, 2010; HANEY *et al.*, 2010; OLIVIER *et al.*, 2011; DELL'OSSO; LADER, 2013). Fitoquímicos tendo atividades diversas, por exemplo, fitol (um diterpenoide de origem vegetal) é evidente por exercer um efeito semelhante a ansiolíticos em camundongos *Swiss* (COSTA *et al.*, 2014). Geralmente, os OEs e seus componentes são citoprotetores, pois a maioria age como antioxidante (ISLAM, 2016). O BCF é encontrado em muitos OEs e tem sido amplamente relatado por seus efeitos antioxidantes e citoprotetores em vários sistemas de teste. Verificou-se que o OE, rico em BCF de *O. basilicum* a 100, 150 e 200 mg/kg (i.p.), exerce um efeito ansiolítico significativo em

camundongos sírios (RABBANI *et al.*, 2015). Além disso, o BCF a 200 mg/kg (v.o) exerceu um efeito ansiolítico significativo (GALDINO *et al.*, 2012), bem como na dose de 50 mg/kg (v.o) também evidenciou um efeito ansiolítico em camundongos *Swiss* (BAHI *et al.*, 2014), com um possível mecanismo de ação envolvendo os CB2Rs.

EFEITOS MIORRELAXANTE E ANTIESPASMÓDICOS

Um espasmo é uma contração involuntária súbita do músculo, um grupo de músculos ou órgão oco (por exemplo, coração). Sua causa pode ser devido a várias condições médicas, incluindo distonia, câibras musculares com súbita explosão de dor, cólicas, entre outras (KOLKER *et al.*, 2017). Os miorrelaxantes, geralmente designados como bloqueadores neuromusculares e espasmolíticos, são usados para diminuir o tônus muscular e os espasmos, a dor e a hiperreflexia. Uma pesquisa de Leonhardt e colaboradores (2009), indicaram que o BCF a 1-1000 µg/mL exibe um efeito miorrelaxante e antiespasmódico no íleo isolado de ratos de uma maneira dependente da concentração. Além disso, o BCF (10 ou 20 mg/kg, v.o.) reduziu, significativamente, a hiperalgesia mecânica e aumentou os limiares de abstinência muscular em camundongos *Swiss* (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2016).

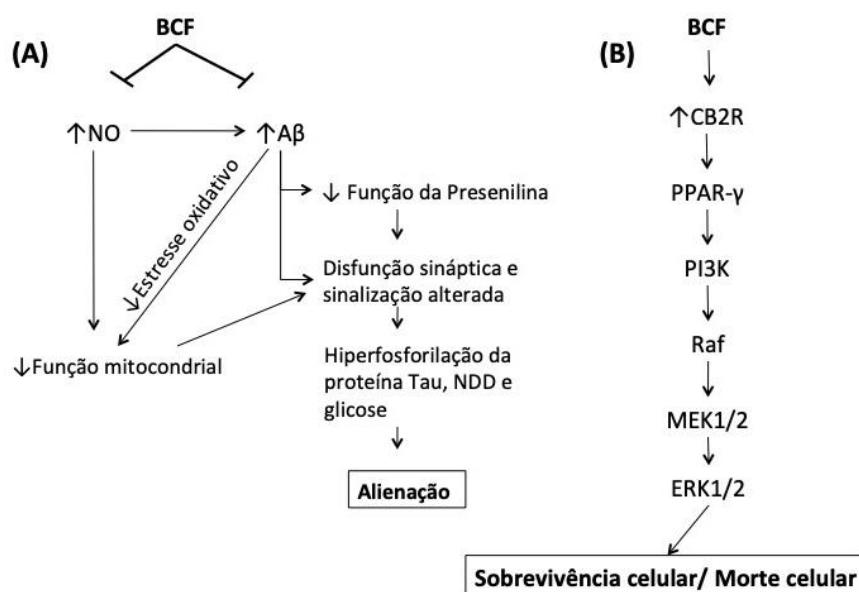
EFEITO ANTICONVULSIVANTE

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a epilepsia é um tipo grave de DN, caracterizada, principalmente, por convulsões recorrentes devido a uma hiperexcitabilidade neuronal anormal no cérebro, afetando, aproximadamente, 50 milhões de pessoas em todo o mundo (STALEY, 2015; OMS, 2015). Embora o uso de drogas isoladas e/ou sintéticas tenha se tornado mais popular que as plantas medicinais ou suas combinações para tratar ou prevenir várias doenças, incluindo convulsões, o uso de OE e seus componentes em tais doenças é notável (SOUSA, 2011). A este respeito, o BCF a 10, 30 ou 100 mg/kg (v.o.) demonstrou exercer um efeito anticonvulsivante em camundongos C57BL/6 de um modo dependente da dose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

EFEITO ANTI-ALZHEIMER

A DA é uma ND crônica responsável por 60 a 70% dos casos de demência (BURNS; ILIFFE, 2009). Causou 1,9 milhões de mortes em 2015 (GBD, 2016). Não apenas o beta amiloide ($A\beta$) (HAMLEY, 2012), mas também vários processos inflamatórios e citocinas foram ligados na patologia da DA. A ativação do PPAR- γ inibe a expressão gênica inflamatória, melhora a patologia relacionada com a DA, incluindo capacidade de aprendizagem e memória. Desta forma, é considerado como um alvo molecular potencial para o tratamento da DA (LANDRETH *et al.*, 2008). Nesse contexto, o BCF, nas doses de 16, 48 e 144 mg/kg (v.o), melhorou o fenótipo semelhante à doença de *Alzheimer*, possivelmente pela ativação do CB2R e pela via dependente do PPAR- γ , em camundongos transgênicos APP/PS1 (CHENG *et al.*, 2014). Os possíveis efeitos anti-Alzheimer do BCF estão ilustrados na **Figura 5**.

Figura 5. Possível efeito anti-Alzheimer do beta-cariofileno (BCF).



[(A) O BCF pode inibir a síntese de óxido nítrico (NO) e beta-amilóide ($A\beta$), responsável por proteger as funções mitocondriais e sinápticas, juntamente com a transdução de sinal neuronal. O processo global inibe a neurodegeneração, a gliose e a hiperfosforilação da proteína tau, sugerindo um efeito anti-Alzheimer. (B) O BCF, via ativação do CB2R, pode ativar o PPAR- γ e, eventualmente, o PI3K, Raf (membro da família serina / treonina-proteína cinase), quinase quinase MAP (MEK) -1/2 e ERK-1/2, que causa a sobrevivência das células neuronais.]

EFEITO ANTIDEPRESSIVO

A depressão é um estado de mau humor e aversão à atividade que pode afetar os pensamentos, o comportamento, os sentimentos e a sensação de bem-estar de uma pessoa. Tem várias causas, incluindo doenças físicas e mentais, efeitos colaterais de alguns medicamentos e tratamentos médicos, entre outros. O tratamento envolve o uso de antidepressivos, como a cetamina, que tem sido usada em pacientes idosos com depressão resistente ao tratamento (RIBEIRO; RIVA-POSSE, 2017). Drogas que atuam sobre CBRs exercem grande controle sobre a atividade neuronal, ativando-as, onde podem modular a ação do co-transportador de bicarbonato de sódio, levando à hiperpolarização do neurônio (STEMPEL *et al.*, 2016). Num estudo de Bahi e colaboradores (2014), verificou-se que o BCF, nas doses de 50 mg/kg (v.o.), exibe atividade antidepressiva mediada por CB2R em camundongos albinos *Swiss*.

DIVERSOS

OEs de *Copaifera multijuga*, ricas em BCF (36%), exercem efeitos neurofarmacológicos significativos em camundongos *Swiss* (KOBAYASHI *et al.*, 2011). Geralmente, os anestésicos regionais ou locais bloqueiam a transmissão de impulsos nervosos entre uma parte específica do corpo e o SNC, causando perda de sensibilidade na parte do corpo visada e o paciente permanece consciente (BAMBAREN *et al.*, 2017). Nesse contexto, o BCF, a 10-1000 µg/mL, diminuiu de forma dependente da dose o número de estímulos necessários para provocar o reflexo, sugerindo atividade anestésica local desse composto em ratos *Wistar* e coelhos albinos (GHELARDINI *et al.*, 2001).

Por outro lado, o alcoolismo, também conhecido como transtorno do uso de álcool (TUA), é uma das principais causas de problemas de saúde mental e física, juntamente com problemas na sociedade, sendo responsável por 3,3 milhões de mortes (por 5,9% de adultos) por ano (LITTRELL, 2014). Os medicamentos comumente usados para esse fim são benzodiazepínicos, dissulfiram, naltrexona e carbimida de cálcio. Essas drogas estão associadas a vários efeitos colaterais graves, incluindo tolerância cruzada, dependência e dependência cruzada com o álcool. Os CBRs têm papéis importantes em várias funções comportamentais e cerebrais e podem ser uma pista para novos

candidatos a drogas no TUA (PATEL *et al.*, 2017). Verificou-se que o BCF a 50 mg/kg (v.o.) reduz o alcoolismo mediado por CB2R em camundongos Swiss (AL MANSOURI *et al.*, 2014). Listados na **Tabela 2** estão mecanismos moleculares de diferentes atividades neurofarmacológicas do BCF em diferentes sistemas de teste.

Tabela 2: Mecanismos moleculares de atividades neurofarmacológicas mediadas pelo beta-cariofileno

Dose/concentração (via de administração)	Sistema de teste (<i>in vitro/in vivo</i>)	Mecanismo (s) possível (s)	Referências
Atividade analgésica			
1 e 5 mg/kg (i.p.)	Camundongos (n = 12)	Mediado por CB2R	Klauke <i>et al.</i> , 2014
Atividade ansiolítica e antidepressiva			
50 mg/kg (v.o.)	Camundongos (n = 7-10)	Expressão ↑CB2R	Bahi <i>et al.</i> , 2014
Antialcolismo			
50 mg/kg (v.o.)	Camundongos (n = 14)	Expressão ↑CB2R	Al Mansouri <i>et al.</i> , 2014
Efeitos Anti-Alzheimer			
16, 48, ou 144 mg/kg (v.o.)	Camundongos transgênicos APP/PS1 (n = 5-7)	Atividade de ↑CB2R via dependente de PPAR γ	Cheng <i>et al.</i> , 2014
Anti-inflamatória			
0.5, 5 e 50 μ M	Linhagem celular murina BV2	Ativação ↓NF- κ B	Guo <i>et al.</i> , 2014
Encefalomielite autoimune			
50 e 100 mg/kg (v.o.) contendo OE de <i>Pterodon emarginatus</i>	Camundongos (n = 10)	Modulação do equilíbrio de células Th1/Treg	Alberti <i>et al.</i> , 2014
Efeito imunomodulador			
1, 10 e 100 μ M (<i>in vitro</i>); 25 e 50 mg/kg (v.o.) (<i>in vivo</i>)	Camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 6-8) e seus linfócitos	↓ células microgliais, linfócitos T CD4+ e CD8+, expressão de citocinas pró-inflamatórias e CB2R	Alberti <i>et al.</i> , 2017
Neuroproteção			
2.25, 4.5, 9 e 18 μ g (i.p.)	camundongos da estirpe ddY (n = 10)	Mediada por CB2R	Katsuyama <i>et al.</i> , 2012

10 mg/kg	Células microglial C6	↓ expressão de mRNA de iNOS, IL-1 β , IL-6 e COX-2	Chang <i>et al.</i> , 2013
0.5 e 1.0 μ M	Linhagem de células de glioma C6	Respostas antioxidantes celulares via ativação de Nrf2 dependente da ativação do CB2R	Assis <i>et al.</i> , 2014
50 μ g/mL, isolados de <i>Aegle marmelos</i>	Células de <i>Jurkat</i> e neuroblastoma humano (IMR-32)	↓ genes anti-apoptóticos (bcl-2, mdm2, cox2 e cmyb); ↑ genes pró-apoptóticos (bax, bak1, caspase-8 e -9 e ATM)	Sain <i>et al.</i> , 2014
50 mg/kg (v.o.)	Ratos <i>Wistar</i> (n = 3)	↓ IL-1 β e -6, TNF- α , NF-kB, COX-2 e iNOS; expressão do receptor CB2	Javed <i>et al.</i> , 2016
34, 102 e 306 mg/kg (v.o.)	Ratos (n = 3)	↑ expressão de Nrf2 e HO-1	Lou <i>et al.</i> , 2016
50 mg/kg (i.p.)	Ratos <i>Wistar</i> (n = 6-8)	Neurônios dopaminérgicos resgatados, ↓ microglia e ativação de astrócitos via expressão reduzida de Iba-1 e GFAP; ↓ COX-2 e iNOS; restauraram enzimas antioxidantes e inibiram a peroxidação lipídica e a depleção de glutatona	Ojha <i>et al.</i> , 2016
0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 μ M	Células de neuroblastoma PC12 e SH-SY5Y	↑ receptores TrkA e neuritogênese	Santos <i>et al.</i> , 2016
10 μ M/L	Células endoteliais microvasculares cerebrais (BMECs), neurônios e astrócitos	↓ BBB permeabilidade, apoptose neuronal, estresse oxidativo, liberação de citocinas inflamatórias, expressão de Bax e MMP-9; Expressão	Tian <i>et al.</i> , 2016

		de claudina-5, ocludina, ZO-1, GAP-43 e Bcl-2	
25 e 50 mg/kg/dia (v.o.)	Camundongo EAE (n = 5)	↓ H ₂ O ₂ , NO, TNF- α , IFN- γ , IL-17 e número de infiltrados inflamatórios e danos neurológicos	Fontes <i>et al.</i> , 2017
10, 25, e 50 μ M	Células microgliais BV2	↓ NO, PGE ₂ , iNOS, COX-2, citocinas pró-inflamatórias e superexpressão de TLR4 ativada por A β 1-42	Hu <i>et al.</i> , 2017
25 mg/kg (v.o.)	Camundongo (n = 5)	↓ neuropatia periférica; ↑ ativação CB2R; ↓ ativação de p38 MAPK / NF- κ B e liberação de citocinas	Segat <i>et al.</i> , 2017
10 mg/kg (i.p.)	Camundongo (n = 6)	Mediada por CB2R	Viveros-Paredes <i>et al.</i> , 2017
0.2, 1, 5 e 25 μ M (<i>in vitro</i>); 8, 24, 72 mg/kg (i.p.) (<i>in vivo</i>)	Neurônios de ratos primários (n = 6)	↓ similar ao domínio da quinase da linhagem mista (MLKL), volumes de infarto, necrose neuronal, proteína quinase (PCK1), expressão de proteína quinase 3 (PKC3), grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), Níveis de TLR4, IL-1 β e TNF- α	Yang <i>et al.</i> , 2017

CONCLUSÃO

Achados gerais sugerem que o BCF, um fitocanabinoide, possui uma capacidade neuroprotetora através de suas atividades farmacológicas mediadas pelo SNC, como analgésico, ansiolítico e antidepressivo, anti-Alzheimer, anti-inflamatório e imunomodulador. Além disso, o BCF atua contra o alcoolismo e a encefalomielite autoimune. Os efeitos neuroprotetores do BCF podem estar

ligados às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Atualmente, os dados disponíveis sugerem que o BCF tem um efeito sobre o sistema nervoso e pode ser útil para o desenvolvimento de agentes neuroativos para o tratamento e a prevenção de DNs.

Conflitos de interesse

Nenhum declarado.

Referências

AHMED, A.; CHOUDHARY, M.I.; FAROOQ, A.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; HUSNU, K.; BASER, K.H.C. Essential oil constituents of the spice *Cinnamomum tamala* (Ham.) Nees & Eberm. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 388–390, 2000.

AHMED, A.F.; SU, J.H.; SHIUE, R.T.; PAN, X.J.; DAI, C.F.; KUO, Y.H.; SHEU, J.H. New beta-caryophyllene-derived terpenoids from the soft coral *Sinularia nanolobata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 592–597, 2004.

AKTAR, K.; FOYZUN, T. 2017. Phytochemistry and Pharmacological Studies of *Citrus macroptera*: A Medicinal Plant Review. *Evid-Based Complement Alternat Med*. Article ID: 9789802. doi: 0.1155/2017/9789802.

AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M.; SYED, M. NURULAIN, AMINE BAH. 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, p. 260–268, 2014.

ALBERTI, T.B.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.L.F.; RAPOSO, N.R.B.; DUTRA, R.C. (-)- β -caryophyllene, a CB2 receptor-selective phytocannabinoid, suppresses motor paralysis and neuroinflammation in a murine model of multiple sclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1–14, 2017.

ALBERTI, T.B.; MARCON, R.; BICCA, M.A.; RAPOSO, N.R.; CALIXTO, J.B.; DUTRA, R.C. Essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating Th1/Treg cell balance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 485–494, 2014.

ASCARI, J.; SENS, S.L.; NUNES, D.S.; WISNIEWSKI, A.J.; ARBO, M.D.; LINCK, V.M.; LUNARDI, P.; LEAL, M.B.; ELISABETSKY, E. Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 1, p. 113–119, 2012.

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.

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, p. 119–124, 2014.

BAMBAREN, I.A.; DOMINGUEZ, F.; ELIAS MARTIN, M.E.; DOMÍNGUEZ, S. Anesthesia and Analgesia in the Patient with an Unstable Shoulder. **The Open Orthopaedics Journal**, v.11, p. 848–860, 2017.

BERNOTIENĖ, G.; NIVINSKIENĖ, O.; BUTKIENĖ, R.; MOCKUTĖ, D. Chemical composition of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.) growing wild in Auktaitija. *Chemija*. 2. **Vilnius, Lithuania: Lithuanian Academy of Sciences**, v. 4, p. 31–36, 2004.

BONNET, U.; SCHERBAUM, N. How addictive are gabapentin and pregabalin? A systematic review. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1185-1215, 2017.

BORSOOK, D. Neurological diseases and pain. **Brain**, v. 135, p. 320–344, 2012.

BROWN, T.B.; LOVATO, L.M.; PARKER, D. Procedural sedation in the acute care setting. **American Family Physician**, v. 71, p. 85–90, 2005.

BUNGE, M.B.; BUNGE, R.P.; RIS, H. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. **Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 10, p. 67–94, 1961.

BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's disease. **The BMJ**, v. 338, p. b158, 2009.

CABRAL, G.A.; GRIFFIN-THOMAS, L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.11, p. 1-25, 2009.

CALVO-IRABIEN, L.M.; YAM-PUC, J.A.; DZIB, G.; ESCALANTE-EROSA, F.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Effect of Postharvest Drying on the Composition of Mexican Oregano (*Lippia graveolens*) Essential Oil. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 15, p. 281–287, 2009.

CHANG, H.-J.; KIM, H.-J.; CHUN, H.-S. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. **Life Science**, v. 80, p. 835–841, 2007.

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, p. 471–480, 2013.

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, p. 1–12, 2014.

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, p. 1499–1507, 2014.

COSTA, J.P.; DE OLIVEIRA, G.A.; DE ALMEIDA, A.A.; ISLAM, M.T.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34–42, 2014.

CULLEN, K.M.; HALLIDAY, G.M. Chronic alcoholics have substantial glial pathology in the forebrain and diencephalon. **Alcohol Alcoholism**, v. 2, p. 253–257, 1994.

CUNNINGHAM, C.M.; HANLEY, G.E.; MORGAN, S. Patterns in the use of benzodiazepines in British Columbia: examining the impact of increasing research and guideline cautions against long-term use. **Health Policy**, v. 97, p. 122–129, 2010.

ALENCAR, M.V.; DE CASTRO E SOUSA, J.M.; ROLIM, H.M.; DE MEDEIROS, M.D.; CERQUEIRA, G.S.; DE CASTRO ALMEIDA, F.R.; CITÓ, A.M.; FERREIRA, P.M.; LOPES, J.A.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.; ISLAM, M.T. Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 175–201, 2017.

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

DELL’OSSO, B.; LADER M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A Critic Reappraisal. **European Psychiatry**, v. 28, p. 7–20, 2013.

DENICOLA, G.M.; KARRETH, F.A.; HUMPTON, T.J.; GOPINATHAN, A.; WEI, C.; FRESE, K.; MANGAL, D.; YU, K.H.; YEO, C.J.; CALHOUN, E.S.; SCRIMIERY, F.; WINTER, J.M.; HRUBAN, R.H.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; KERN, S.E.; BLAIR, I.A.; TUVESON, D.A. Oncogene- induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. **Nature**, v. 475, p. 106–109, 2011.

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

FIORINZANI, P.; LAMPONI, S.; MAGNANI, A.; CECCARELLI, I.; ALOISI, A.M. In vitro and in vivo characterization of the new analgesic combination beta-caryophyllene and docosahexaenoic acid. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 596312, 2014.

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.; FLORENTINO, I.F.; LINO, R.C.; FAJEMIROYE, J.O.; CHAIBUB, B.A.; DE PAULA, J.R.; DE LIMA, T.C.; 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 & Biological Psychiatry**, v. 38, p. 276–284, 2012.

GBD. 2015. Mortality and Causes of Death, Collaborators. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet** 388: 1459–1544.

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, p. 9099–9104, 2008.

GERTSCH, J. Cannabimimetic phytochemicals in the diet - an evolutionary link to food selection and metabolic stress adaptation? **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1464–1483, 2017.

GHALIB, R.M.; HASHIM, R.; SULAIMAN, O.; MEHDI, S.H.; VALKONEN, A.; RISSANEN, K.; TRIFUNOVIĆ, S.R.; KHADEER AHAMED, M.B.; MAJID, A.M.; KAWAMURA, F. A novel caryophyllene type sesquiterpene lactone from *Asparagus falcatus* (Linn.); structure elucidation and anti-angiogenic activity on

HUVECS. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 601–607, 2012.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **Farmaco**, v. 56, p. 387–389, 2001.

GOWDA, P.J.; RAMAKRISHNAIAH, H.; KRISHNA, V.; NARRA, S.; JAGANNATH, N. Caryophyllene-rich essential oil of *Didymocarpus tomentosa*: chemical composition and cytotoxic activity. **Natural Product Communications**, v. 7, p. 1535–1538, 2012.

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, p. 41–48, 2014.

HAMLEY, I.W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 5147–5192, 2012.

HANEY, E.M.; WARDEN, S.J.; BLIZIOTES, M.M. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on bone health in adults: time for recommendations about screening, prevention and management? **Bone**, v. 46, p. 13–17, 2010.

HARVALA, C.; MENOUNOS, P.; ARGYRIADOU, N. Essential oil from *Origanum dictamnus*. **Planta Medica**, v. 53, p. 107–109, 1987.

HealthLink. 2007. Alexander Disease. Medical College of Wisconsin.

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.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nature Medicine**, v. 17, p. 796–808, 2011.

ISLAM, M.T.; ALENCAR, M.V.O.B.; MATA, A.M.O.F.; PAZ, M.F.C.J.; MATOS, L.A.; SOUSA, J.M.C.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Coffee: A health fuel-blot popular drinking. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 1–7, 2016d.

ISLAM MT, ALI ES, SOUSA JMC, SANTOS, J.V.O.; PAZ, M.F.C.J.; LIMA, R.M.T.; SOUSA, L.R.; ALENCAR, M.V.O.B.; CAVALCANTE, A.A.C.M. Physiological contributions of reactive oxygen species. **Photon eBooks**. Ed. I, Pages 1–13. UBN: 015-A94510112030, 2016c.

ISLAM, M.T.; DA MATA, A.M.; DE AGUIAR, R.P.; PAZ, M.F.; DE ALENCAR, M.V.; FERREIRA, P.M.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A. Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpenes. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 1420–1444, 2016a.

ISLAM, M.T.; DA SILVA, C.B.; DE ALENCAR, M.V.; PAZ, M.F.; ALMEIDA, F.R.; MELO-CAVALCANTE, A.A. Diterpenes: Advances in neurobiological drug research. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 915–928, 2016b.

ISLAM, M.T. Concentration-Dependent-Activities of Diterpenes: Achieving Anti-/Pro-Oxidant Links. **Asian Journal of Ethnopharmacology and Medicinal Foods**, v. 2, p. 12–15, 2016.

ISLAM, M.T. Diterpenes and their derivatives as potential anticancer agents. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 691–712, 2017a.

ISLAM, M.T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 39, p. 73–82, 2017b.

ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K.; NAKAJIMA, K.; FUKUUCHI, Y.; KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Molecular Brain Research**, v. 57, p. 1–9, 1998.

JACQUE, C.M.; VINNER, C.; KUJAS, M.; RAOUL, M.; RACADOT, J.; BAUMANN, N.A. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 35, p. 147–155, 1978.

JAMSHIDI, R.; AFZALI, Z.; AFZALI, D. Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. **American-Eurasian Journal Of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 5, p. 78–81, 2009.

JAROSZ, M.; OLBERT, M.; WYSZOGRODZKA, G.; MŁYNIĘC, K.; LIBROWSKI, T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. **Inflammopharmacology**, v. 25, p. 11–24, 2017.

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, p. 1-14, 2016.

JIA, X.J.; LI, X.; WANG, F.; LIU, H.Q.; ZHANG, D.J.; CHEN, Y. Berbamine Exerts Anti-Inflammatory Effects via Inhibition of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 2307–2318, 2017.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M.B.; GEISSLER, M. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from

Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry. **Journal of Chromatography A**, v. 976, p. 265–275, 2002.

JOHNSTON-WILSON, N.L.; SIMS, C.D.; HOFMANN, J.P.; ANDERSON, L.; SHORE, A.D.; TORREY, E.F.; YOLKEN, R.H. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. **Molecular Psychiatry**, v. 5, p. 142–149, 2000.

KATSUYAMA, S.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KOMATSU, T.; NAGAOKA, K.; NAKAMURA, H.; BAGETTA, G.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain**, v. 17, p. 664–675, 2013.

KAUL, P.N.; BHATTACHARYA, A.K.; RAO, B.R.; SYAMASUNDAR, K.V.; RAMESH, S. Volatile constituents of essential oils isolated from different parts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 53–55, 2003.

KHALILZADEH, E.; VAFAEI SIAH, G.; HASANNEJAD, H.; GHADERI, A.; GHADERI, S.; HAMIDIAN, G.; MAHMOUDI, R.; ESHGI, D.; ZANGISHEH, M. Antinociceptive effects, acute toxicity, and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 218–230, 2015.

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

KLEIN-JÚNIOR, L.C.; DOS SANTOS PASSOS, C.; TASSO DE SOUZA, T.J.; GOBBI DE BITENCOURT, F.; SALTON, J.; DE LORETO BORDIGNON, S.A.; HENRIQUES, A.T. The monoamine oxidase inhibitory activity of essential oils obtained from *Eryngium* species and their chemical composition. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 1071–1076, 2016.

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T.O.; ENZWEILER, B.G.; DE BONA, L.R.; MASSONI, T.; APEL, M.A.; HENRIQUES, A.T.; RICHTER, M.F.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E.S. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 306–313, 2011.

KOLKER, S.; TZIVONI, D.; ROSENMAN, D.; MEYLER, S.; IOSCOVICH, A. Neostigmine induced coronary artery spasm: A case report and literature

review. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, p. 402–405, 2017.

KOUSAI, A.; MIZUNO, R.; IKOMI, F.; OHHASHI, T. ATP inhibits pump activity of lymph vessels via adenosine A1 receptor-mediated involvement of NO- and ATP-sensitive K⁺ channels. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. H2585–2597, 2004.

LANCIEGO, J.L.; BARROSO-CHINEA, P.; RICO, A.J.; CONTE-PERALES, L.; CALLÉN, L.; RODA, E.; GÓMEZ-BAUTISTA, V.; LÓPEZ, I.P.; LLUIS, C.; LABANDEIRA-GARCÍA, J.L.; FRANCO, R. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, p. 97–104, 2011.

LANDRETH, G.; JIANG, Q.; MANDREKAR, S.; HENEKA, M. PPAR γ agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, v. 5, p. 481–489, 2008.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.D.E.S.; BARBOSA, P.C.; NEVES, J.K.; DA SILVA, J.A.; DA VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866–3889, 2012.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A.A.; PORTO, R.S.; CELEDÔNIO, N.R.; OLIVEIRA, A.C.; PEREIRA, R.F.; SILVA, L.P.; GARCIA-TEÓFILO, T.M.; SILVA, A.P.; MAGALHÃES, P.J.; DUARTE, G.P.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 749–758, 2010.

LI, C.; QU, J. Efficacy of dexmedetomidine for pain management in knee arthroscopy: A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, p. 1-5, 2017.

LITTRELL, J. Understanding and Treating Alcoholism Volume I: An Empirically Based Clinician's Handbook for the Treatment of Alcoholism: Volume II: Biological, Psychological, and Social Aspects of Alcohol Consumption and Abuse. Hoboken: Taylor Francis. p. 55. ISBN: 9781317783145, 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, 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, p. 1291–1304, 2016.

MACKENZIE, C.S.; REYNOLDS, K.; CHOU, K.L.; PAGURA, J.; SAREEN, J. Prevalence and correlates of generalized anxiety disorder in a national sample of older adults. **Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 19, p. 305–315, 2011.

MANNER, H.; CRAIG, E. **Traditional Tree Initiative: Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**, Permanent Agricultural Resources, Honolulu, Hi, 2006.

MEDEIROS DA FROTA RIBEIRO, C.; RIVA-POSSE, P. Use of Ketamine in Elderly Patients with Treatment-Resistant Depression. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, p. 1- 5, 2017.

MENEZES, I.A.; MARQUES, M.S.; SANTOS, T.C.; DIAS, K.S.; SILVA, A.B.; MELLO, I.C.M.; LISBOA, A.C.C.D.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; MARÇAL, R.M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192–195, 2007.

MISHRA, D.; BISHT, G.; MAZUMDAR, P.M.; SAH, S.P. Chemical composition and analgesic activity of *Senecio rufinervis* essential oil. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1297–1301, 2010.

MISHRA, S.K.; KANG, J-H.; LEE, C.W.; OH, S.H.; RYU, J.S.; BAE, Y.S.; KIM, H.M. Midazolam induces cellular apoptosis in human cancer cells and inhibits tumor growth in xenograft mice. **Molecules Cells**, v. 36, p. 219–236, 2013.

MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in vilnius district (Lithuania). **Phytochemistry**, v. 57, p. 65–69, 2001.

MONTECUCCO, F.; LENGLET, S.; BRAUNERSREUTHER, V.; BURGER, F.; PELLI, G.; BERTOLOTTI, M.; MACH, F.; STEFFENS, S. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. **Journal of Molecular Cell Cardiology**, v. 46, p. 612–620, 2009.

MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; LEE, J.Y.; SURH, Y.J.; KIM, H.W.; KAWABATA, K.; NAKAMURA, Y.; JIWAJINDA, S.; OHIGASHI, H. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. **International Journal of Cancer**, v. 110, p. 481–490, 2004.

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 Cell Biochemistry**, v. 418, p. 59–70, 2016.

OLIVIER, J.D.A.; BLOM, T.; ARENTSEN, T.; HOMBERG, J.R. The age-dependent effects of selective serotonin reuptake inhibitors in humans and rodents: a review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1400–1408, 2011.

ORMEÑO, E.; BALDY, V.; BALLINI, C.; FERNANDEZ, C. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1219–1229, 2008.

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

PERTWEE, R.G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 397–411, 2009.

PRASHAR, A.; LOCKE, I.C.; EVANS, C.S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 37, p. 221–229, 2004.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARAÚJO, A.A.; BRITO, R.G.; SANTOS, P.L.; QUINTANS, J.S.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; SILVA, G.F.; CARVALHO, F.M.; 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 Science**, v. 149, p. 34–41, 2016.

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

RICIGLIANO, V.; KUMAR, S.; KINISON, S.; BROOKS, C.; NYBO, S.E.; CHAPPELL, J.; HOWARTH, D.G. Regulation of sesquiterpenoid metabolism in recombinant and elicited *Valeriana officinalis* hairy roots. **Phytochemistry**, v. 125, p. 43–53, 2016.

ROESSMANN, U.; VELASCO, M.E.; SINDELY, S.D.; GAMBETTI, P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. **Brain Research**, v. 200, p. 13–21, 1980.

SAIN, S.; NAOGHARE, P.K.; DEVI, S.S.; DAIWILE, A.; KRISHNAMURTHI, K.; ARRIGO, P.; CHAKRABARTI, T. Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agents against lymphoma and neuroblastoma cells. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 45–55, 2014.

SANTOS, N.A.; 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.

SASTRY, K.S.; CHOUCANE, A.I.; WANG, E.; KULIK, G.; MARINCOLA, F.M.; CHOUCANE, L. Cytoprotective effect of neuropeptides on cancer stem cells: vasoactive intestinal peptide-induced antiapoptotic signaling. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 6, 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.

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

SILVA, M.G.V.; MATOS, F.J.A.; LOPES, P.R.O.; SILVA, F.O.; HOLANDA, M.T. 2004. Cragg, Gordon M.; Bolzani, Vanderlan S.; Rao, G. S. R. Subba, eds. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction. *Arkivoc*. ARKAT USA, Inc. **2004**: 66–71.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; DE HELUANI, C.S.; CATALAN, C.A. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 174–181, 2006.

SKAPER, S.D. Impact of Inflammation on the Blood-Neural Barrier and Blood-Nerve Interface: From Review to Therapeutic Preview. **International Review of Neurobiology**, v. 137, p. 29–45, 2017.

SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233–2252, 2011.

SOUSA, J.P.; BRANCALION, A.P.; SOUZA, A.B.; TURATTI, I.C.; AMBRÓSIO, S.R.; FURTADO, N.A.; LOPES, N.P.; BASTOS, J.K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 653–659, 2011.

SOUSA, O.V.; SILVÉRIO, M.S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; MATHEUS, F.C.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 771–777, 2008.

STALEY, K. Molecular mechanisms of epilepsy. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 367–372, 2015.

STEMPEL, A.V.; STUMPF, A.; ZHANG, H.Y.; ÖZDOĞAN, T.; PANNASCH, U.; THEIS, A.K.; OTTE, D.M.; WOJTALLA, A.; RÁCZ, I.; PONOMARENKO, A.; XI, Z.X.; ZIMMER, A.; SCHMITZ, D. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. **Neuron**, v. 90, p. 795–809, 2016.

SUMMER, J. *The Natural History of Medicinal Plants*, vol. 16, Timber Press, London, UK, 2000.

THOMAS, D.A.; MASLIN, B.; LEGLER, A.; SPRINGER, E.; ASGERALLY, A.; VADIVELU, N. Role of Alternative Therapies for Chronic Pain Syndromes. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, p. 29, 2016.

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, p. 757–768, 2016.

UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 713–721, 2006.

VILALTA, A.; BROWN, G.C. Neurophagy - the phagocytosis of live neurons and synapses by glia - contributes to brain development and disease. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p. 3566-3575, 2018.

VIVEROS-PAREDES, J.M.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, R.E.; GERTSCH, J.; CHAPARRO-HUERTA, V.; LÓPEZ-ROA, R.I.; VÁZQUEZ-VALLS, E.; BEAS-ZARATE, C.; CAMINS-ESPUNY, A.; FLORES-SOTO, M.E. Neuroprotective Effects of β -Caryophyllene against Dopaminergic Neuron Injury in a Murine Model of Parkinson's Disease Induced by MPTP. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 10, n. 3, p. 1-18, 2017.

WAGNER, C.A.; GOVERMAN, J.M. Novel insights and therapeutics in multiple sclerosis. **F1000Research**, v. 4, p. 1-8, 2015.

WANG, G.; TIAN, L.; AZIZ, N.; BROUN, P.; DAI, X.; HE, J.; KING, A.; ZHAO, P.X.; DIXON, R.A. Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop. **Plant Physiology**, v. 148, p. 1254–1266, 2008.

WHO. 2015. The Myanmar Epilepsy Initiative: Paving the Way for Sustainable Treatment, World Health Organization.

YANG, M.; LV, Y.; TIAN, X.; LOU, J.; AN, R.; ZHANG, Q.; LI, M.; XU, L.; DONG, Z. Neuroprotective effect of β -caryophyllene on cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of necroptotic neuronal death and inflammation: in vivo and in vitro. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 1-13, 2017.

ZARRUK, J.G.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, D.; GARCÍA-YÉBENES, I.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M.S.; VIVANCOS, J.; NOMBELA, F.; TORRES, M.; BURGUETE, M.C.; MANZANARES, J.; LIZASOAIN, I.; MORO, M.A. Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. **Stroke**, v. 43, p. 211–219, 2012.

ZHANG, M.; ADLER, M.W.; ABOOD, M.E.; GANEA, D.; JALLO, J.; TUMA, R.F. CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Microvascular Research*, v. 78, p. 86–94, 2009.

ZHANG, M.; MARTIN, B.R.; ADLER, M.W.; RAZDAN, R.K.; GANEA, D.; TUMA, R.F. Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. **Neuroscience**, v. 152, p. 753–760, 2008.

ZHELJAZKOV, V.D.; CANTRELL, C.L.; TEKWANI, B.; KHAN, S.I. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 380–385, 2008.

4.2 2º CAPÍTULO

Caracterização farmacológica do agonista do receptor canabinoide 2, β -cariofileno em modelos de convulsão em camundongos

Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice

(Artigo publicado na *Seizure*, v.57, 2018)

Caracterização farmacológica do agonista do receptor canabinóide 2, β -cariofileno em modelos de convulsão em camundongos

Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice

Jana Tchekalarova^{1*}, Keylla Machado^{2,3}, Antonio Luiz Gomes Júnior^{2,3}, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante⁴, Albena Momchilova⁵, Rumyana Tzoneva⁵

¹Instituto de Neurobiologia, Academia Búlgara de Ciências, Sofia, Bulgária¹ Instituto de Neurobiologia, Academia Búlgara de Ciências, Sofia, Bulgária.

²Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina – Brasil.

³Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina – Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64049-550, Teresina - Brasil.

⁵Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica, BAS, Sofia, Bulgária.

RESUMO: A ativação dos receptores CB1 produz efeito anticonvulsivante acompanhado de distúrbios de memória, tanto em testes de convulsão animal como em pacientes com epilepsia. Poucos relatos consideraram o papel do receptor CB2 na suscetibilidade de crises e funções cognitivas. O objetivo do presente estudo foi explorar o efeito de um seletivo agonista do receptor CB2 beta-cariofileno (BCF) em modelos de convulsões e cognição em camundongos. Os efeitos dependentes da dose de BCF foram estudados no teste de convulsões por eletrochoque máximo (ECM), teste subcutâneo pentilenotetrazol (PTZsc) e teste do labirinto aquático de Morris. Fenitoína e diazepam foram usados como medicamentos de referência nos testes de convulsões. O efeito do tratamento subcrônico com BCF por 7 dias (50 e 100 mg/kg) foi avaliado com base no estado epilético induzido pelo modelo de ácido caínico (AC) e estresse oxidativo através da medida do nível de malondialdeído (MDA) no hipocampo. A neurotoxicidade aguda foi determinada pelo teste *Rota Rod*. O BCF exerceu uma proteção no teste MES na dose mais baixa de 30 mg/kg no intervalo de 4 horas em que foi testado, comparável à droga fenitoína referente. O agonista CB2 foi ineficaz no teste PTZsc. O BCF não apresentou neurotoxicidade no teste *Rota Rod*. O BCF diminuiu os escores de convulsão no estado epilético induzido por AC, cujo efeito se correlacionou com uma menor peroxidação lipídica. O agonista CB2 exerceu uma diminuição de latência dependente da dose para atravessar a área alvo durante os três dias de teste no labirinto aquático de Morris. Nossos resultados sugerem que os agonistas do receptor CB2 podem ser clinicamente úteis como um tratamento adjunto contra a disseminação de crises e estado epilético e estresse oxidativo concomitante neurotoxicidade e comprometimentos cognitivos.

Palavras-chave: agonista do receptor CB2; Teste MES, teste PTZsc; ácido caínico; estresse oxidativo; ratos.

ABSTRACT: Purpose: Activation of CB1 receptors, produces anticonvulsant effect accompanied by memory disturbance both in animal seizure tests and in patients with epilepsy. Few reports considered the role of CB2 receptor on seizure susceptibility and cognitive functions. The aim of the present study was to explore the effect of a selective CB2 receptor agonist b-caryophyllene (BCP) in models of seizures and cognition in mice. Methods: Dose-dependent effects of BCP was studied in maximal electroshock seizure (MES) test, subcutaneous pentylenetetrazole (scPTZ) test and Morris water maze test. Phenytoin and diazepam were used as reference drugs in seizure tests. The effect of sub-chronic treatment with BCP for 7 days (50 and 100 mg kg⁻¹) was assessed on status epilepticus (SE) induced by kainic acid (KA) model and oxidative stress through measurement of malondialdehyde (MDA) level in the hippocampus. The acute neurotoxicity was determined by a rotarod test. Results: The BCP exerted a protection in the MES test at the lowest dose of 30 mg kg⁻¹ at the 4-h interval tested comparable to that of the referent drug phenytoin. The CB2 agonist was ineffective in the scPTZ test. The BCP displayed no neurotoxicity in the rotarod test. The BCP decreased the seizure scores in the KA-induced SE, which effect correlated with a diminished lipid peroxidation. The CB2 agonist exerted a dose-dependent decrease of latency to cross the target area during the three days of testing in the Morris water maze test. Conclusion: Our results suggest that the CB2 receptor agonists might be clinically useful as an adjunct treatment against seizure spread and status epilepticus and concomitant oxidative stress, neurotoxicity and cognitive impairments.

Keywords: CB2 receptor agonist; MES test; scPTZ test; Kainic acid; Oxidative stress; Mice

INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio neurológico que se caracteriza por convulsões espontâneas, bem como pelo comprometimento da aprendizagem e da memória como um fator de risco comórbido. O tratamento com drogas antiepilépticas (DAE's) previne as convulsões, mas, na maioria dos casos, sua eficácia contra o distúrbio cognitivo em pacientes com epilepsia é negligenciada e incerta (AGRAWAL; GOVENDER, 2011). A pesquisa atual, neste campo, está focada na concepção e desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas que previnam a epileptogênese após o estado de mal epilético (EME) e suas consequências deletérias, incluindo estresse oxidativo, danos neuronais e agravamento resultante em funções cognitivas. Durante a última década, drogas com efeitos potenciais de melhora da memória são exploradas como adjuvantes à terapia anticonvulsivante para o tratamento de alterações comportamentais comórbidas deletérias.

Dados experimentais e clínicos acumulados corroboram a sugestão de que o sistema endocanabinoide (SEC) representa uma ferramenta terapêutica potencial para o tratamento de condições patológicas em doenças neurodegenerativas, incluindo epilepsia, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e doença de *Parkinson* (SHARMA *et al.*, 2015; ROSENBERG; PATRA; WHALLEY, 2017). Numerosos estudos foram focados no papel dos receptores CB1 no SNC e, nesta linha, tem sido sugerido que o SEC tem um papel na excitabilidade cerebral, principalmente pela ativação dos receptores CB1 (BAMBICO; GOBBI, 2008; HUIZENGA *et al.*, 2017). Por outro lado, o papel dos receptores CB2, que estão distribuídos, principalmente nos tecidos periféricos e, em particular, nos linfócitos B, macrófagos, mastócitos, microglia e células natural killer, bem como no baço, amígdalas e timo são pouco exploradas no Sistema Nervoso Central (SNC) (SHARMA *et al.*, 2017).

Além disso, os ligantes para os receptores CB2 são considerados como drogas promissoras para o tratamento da dor periférica com aplicação na neuropatia diabética (DHOPESHWARKAR; MACKIE, 2014). Estudos relatam dados que corroboram com a suposição de que drogas agindo através de receptores CB2 podem ser exploradas como novos agentes farmacológicos no tratamento de distúrbios no SNC (GALDINO *et al.*, 2012; BAHÍ *et al.*, 2014). Os compostos, cujos efeitos são mediados por receptores CB2, merecem maior exploração devido à falta de atividade psicotrópica lateral dos ligantes dos receptores CB1. Nos últimos anos, novos compostos sintéticos e naturais mostrando alta afinidade por receptores CB2 são explorados como uma boa alternativa de drogas convencionais para distúrbios do SNC. Entre eles, o beta-cariofileno (BCF), um sesquiterpeno natural, componente comum de óleos essenciais de diversas especiarias (*Cinnamomum verum*, *Piper nigrum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum*) e várias plantas, principalmente *Cannabis sativa* e *Copaifera sp* (GERTSCH *et al.*, 2008).

O BCF possui alta afinidade pelos receptores CB2 e é considerado um fitocanabinoide alimentar promissor, merecendo maior exploração. Verificou-se que este agonista do receptor CB2 exerce um efeito protetor contra a inflamação da dependência do álcool (AL MANSOURI *et al.*, 2014), nocicepção (KATSUYAMA *et al.*, 2013), depressão (VALENZANO *et al.*, 2005), isquemia cerebral (CHOI *et al.*, 2013) e doença de *Alzheimer* (CHENG *et al.*, 2014). Até o

momento, alguns estudos relataram sua atividade potencial contra convulsões em testes com roedores (DE CARVALHO *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; HUIZENGA *et al.*, 2017).

O ácido caínico (AC), um análogo do aminoácido excitatório glutamato, tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta para a indução do EME. Estudos anteriores revelaram que algumas substâncias naturais como curcumina, vineatrol, resveratrol e capsaicina demonstram promissora atividade anticonvulsivante, neuroprotetora e antioxidante em testes de convulsão aguda e modelo de ácido caínico em roedores (GUPTA *et al.*, 2002; SAUDI, 2013). A principal razão deste estudo foi explorar a atividade neurobiológica do BCF em modelos de crises epiléticas, como também sob memória espacial em camundongos. Para o estudo da atividade anticonvulsivante, utilizou-se o teste de convulsão por eletrochoque máximo (ECM) e o teste de pentilenotetrazol subcutâneo (PTZsc). A neurotoxicidade aguda da BCF foi avaliada pelo teste de coordenação motora. Por causa dos efeitos protetores observados no BCF, descritos anteriormente, levantamos a hipótese de que o agonista do receptor CB2 pode ser efetivo contra o estado de mal epilético induzido por AC por sua atividade antioxidante. Foi investigado o efeito do pré-tratamento subcrônico com BCF no EME induzido por AC e peroxidação lipídica no hipocampo em camundongos. Além disso, o efeito do agonista do receptor CB2 nas funções cognitivas dependentes do hipocampo foi explorado pelo teste do labirinto aquático de Morris.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, albinos, machos, pesando entre 25 a 30g, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração tipo *pellets* (Purina®) com livre acesso e foram mantidos sob iluminação controlada (12 h de ciclo claro/escuro) e temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Os experimentos comportamentais foram realizados entre 8h-12 h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias

2010/63/EU. O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional do Instituto de Neurobiologia da Bulgária.

Drogas e dosagem

O composto isolado beta-cariofileno (C₁₅H₂₄) foi adquirido por meio da empresa *Sigma-Aldrich*. Grupo controle (n = 8) (tratado com veículo, *Tween* 80 a 0,05% dissolvido em solução salina a 0,9%, controle negativo) e grupos experimentais (n = 8) (tratados com drogas de referência fenitoína sódica e diazepam (DZP) ou BCF foram injetados intraperitonealmente (ip) em diferentes doses e foram dissolvidos em *Tween* 80 em um volume de 10 mg/kg, BCF (30, 100 e 300 mg/kg) foram administrados 30 min e 4 h, respectivamente, antes do ECM, teste de PTZsc e teste de *Rota Rod*. A fenitoína (30 mg/kg) foi utilizada como droga de referência no teste ECM e o diazepam (5 mg/kg) como droga de referência no teste PTZsc.

Um grupo separado foi usado para o teste do labirinto aquático de Morris. Doses de 10, 25 e 50 mg/kg, respectivamente, foram aplicadas 30 minutos antes de cada teste de sonda no 2º, 3º e 4º dia. A administração de AC foi realizada 24h após um tratamento com BCF (50 e 100 mg/kg) por 7 dias.

Teste de Eletrochoque Máximo (ECM)

O rastreio inicial em ECM foi realizado em dois intervalos de tempo, como se segue: 30 min e 4h, respectivamente. Uma gota de anestésico local foi aplicada aos olhos de cada animal e eletrodos de córnea foram aplicados seguidos por um estímulo elétrico de 50 mA, 60 Hz administrados por 0,2 s (Constant Current Shock Generator). A extensão do membro posterior, após o tratamento com droga, foi determinada como um ponto final do teste. O componente tônico foi considerado abolido quando a extensão do membro posterior não ultrapassou 180º com o plano do corpo. A diminuição do componente extensor tônico dos membros posteriores da convulsão, em metade ou mais dos animais, foi definida como proteção (LUSZCZKI *et al.*, 2013).

Teste de Convulsão por Pentilenotetrazol Subcutâneo (PTZsc)

Para o teste PTZsc, uma dose de 85 mg/kg de PTZ produziu convulsões crônicas que duraram por um período de pelo menos cinco segundos em 97% dos animais de controle testados. Os camundongos foram ainda observados durante um período de 30 minutos e 4 horas. A proteção contra crises crônicas, em metade ou mais dos animais, foi definida como uma atividade anticonvulsivante (BRITO *et al.*, 2006).

Teste da *Rota Rod*

A deficiência motora mínima em camundongos foi medida usando o teste de *Rota Rod* segundo Angelova *et al.*, 2017 e adaptações. Os camundongos foram treinados na haste de 3,2 cm de diâmetro que gira a uma velocidade de 12 rpm. O animal pode manter seu equilíbrio por 3 minutos. A neurotoxicidade foi indicada pela incapacidade do animal de manter o equilíbrio na haste durante, pelo menos, um minuto em cada um dos três ensaios.

Crise epiléptica induzida pelo ácido caínico (AC)

No 7º dia de administração do BCF/veículo (i.p.), os camundongos receberam via i.p. AC (Merck, EUA) em dose única de 30 mg/kg, dissolvida em soro fisiológico estéril (0,9% NaCl) em volume de 10 ml por quilograma de peso corporal. A intensidade das convulsões foi pontuada de acordo com a escala de Racine *et al.* 1977, que caracteriza em: estágio 1 (clônus facial), estágio 2 (inclinação da cabeça), estágio 3 (clônus do membro dianteiro), estágio 4 (clônus do membro anterior com elevação) e estágio 5 (elevação, salto e queda). O início da crise epiléptica foi definido como o tempo em que os animais experimentaram as convulsões contínuas do estágio 4 ou 5. Após um período de 3h de observação e detecção da intensidade das convulsões, os animais foram decapitados em guilhotina após uma anestesia moderada com pentobarbital sódico (40 mg/kg; i.p.). Os cérebros foram rapidamente dissecados no gelo e os hipocampos foram removidos bilateralmente. As amostras de tecido foram

congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C antes da análise (LEITE *et al.*, 2002).

Teste do labirinto aquático de Morris

O labirinto é constituído por uma piscina circular (120cm de diâmetro, 30cm de altura) com água morna (23°C) e estava localizado em um quarto com iluminação fraca (45 lx) e isolamento acústico com quatro sugestões visuais extra-labirínticas (tamanho A4). Folhas de papel laminado branco foram colocadas com símbolos geométricos pretos. A piscina foi dividida em quatro quadrantes iguais. Uma plataforma de escape (9cm de diâmetro, 21cm de altura) em um local fixo foi feita de acrílico transparente e foi imersa 1cm abaixo da superfície de água no centro do quadrante sudoeste (quadrante alvo). Quatro testes, dos quais o primeiro (o teste de aquisição) foi comparado com os três testes seguintes (o teste de sonda), realizados durante três dias consecutivos com uma sessão por dia. Cada sessão consistiu em quatro tentativas, separadas por um intervalo de 10 minutos.

O animal foi retirado da gaiola de origem e colocado no labirinto de água. Nas posições de início, semi-aleatórias, com a cabeça voltada para o centro do labirinto aquático. Quando o camundongo subia na plataforma, o teste era interrompido e a latência de escape registrada. O comprimento máximo do ensaio foi de 60s. O camundongo que não conseguiu encontrar a plataforma submersa dentro de 60s, foi colocado nela por 15s. O animal foi mantido na plataforma antes de iniciar o próximo teste. Em seguida, foi colocado na piscina novamente; e, desta vez, em um local diferente, trinta minutos após a administração de BCF ou veículo.

O segundo, terceiro e quarto dia, um teste de sonda foi realizado para estimar a capacidade de aprendizado espacial dos camundongos sobre a localização da plataforma oculta. Os parâmetros de observação foram calculados usando uma câmera e um sistema de rastreamento de vídeo (*software SMART PanLab, Harvard Apparatus, EUA*). O parâmetro calculado foi a latência no primeiro cruzamento da localização da plataforma (área alvo) (MULLER *et al.*, 2010).

Ensaio de peroxidação lipídica (MDA)

Homogenatos de tecido foram preparados a 10% (p/v) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos, e alíquotas dos sobrenadantes foram separadas e utilizadas para estimativa bioquímica. O malondialdeído (MDA) foi medido por um leitor de ELISA com o comprimento de onda 540 nm usando o kit de teste Elisa (*Abcam*, UK, ab118970), de acordo com as instruções do fabricante e foi expresso como nmol.grama.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância da fase de convulsão foi analisada usando ANOVA para dados não paramétricos (*Kruskal-Wallis* nas classificações) seguido pelo teste U de *Mann-Whitney*. Outros dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias, seguido por *Student-Newman-Keuls* como teste *post hoc* pelo *GraphPad Prism* (versão 6.0; GraphPad San Diego, Califórnia, EUA. Copyright © 1994-1999). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeitos do BCF na suscetibilidade de crises e neurotoxicidade aguda

O efeito anticonvulsivante de BCF foi avaliado nos testes ECM e PTZsc, após a administração i.p. de BCF nas doses iniciais de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. Paralelamente, a neurotoxicidade aguda foi determinada pelo teste de comprometimento motor mínimo (*Rota Rod*). Fenitoína e diazepam foram usados como medicamentos de referência. A avaliação de triagem foi realizada em dois momentos, 30 min e 4 h. Os resultados são mostrados na **Tabela 1**. No teste ECM, o BCF suprimiu as convulsões tônico-clônicas na menor dose de 30 mg/kg em 4,0 h, o que proporcionou 66,6% em comparação com a proteção de 100% fornecida pela fenitoína. No teste PTZsc, o BCF foi ineficaz nas três doses utilizadas, sugerindo que o composto é incapaz de aumentar o

limiar convulsivo. No teste do *Rota Rod*, não foram observados sinais de neurotoxicidade em todas as doses aplicadas, comparados aos fármacos de referência fenitoína e diazepam, respectivamente nos dois momentos (30 min e 4h).

Tabela 1. Dados que representam atividade anticonvulsivante e neurotoxicidade de beta-cariofileno (camundongos, i.p.).

Testes Fármacos	ECM ^a		PTZsc ^b		Rota-rod ^c	
	30 min	4.0 h	30 min	4.0 h	30 min	4.0 h
Beta-cariofileno 30, 100 e 300 mg/kg	-	30	-	-	-	-
Fenitoína 30 mg/kg	30	30			30	30
Diazepam 5 mg/kg			5	5	5	5

Os dados na Tabela 1 indicam a dose mínima em que bioatividade ou neurotoxicidade foi demonstrada em pelo menos 50% dos animais tratados. O traço indica a ausência de atividade ou neurotoxicidade na dose máxima administrada (300 mg/kg). ^aTeste de eletrochoque (ECM); ^bTeste de pentilenotetrazol subcutâneo (PTZsc); ^cTeste de neurotoxicidade (*Rota Rod*).

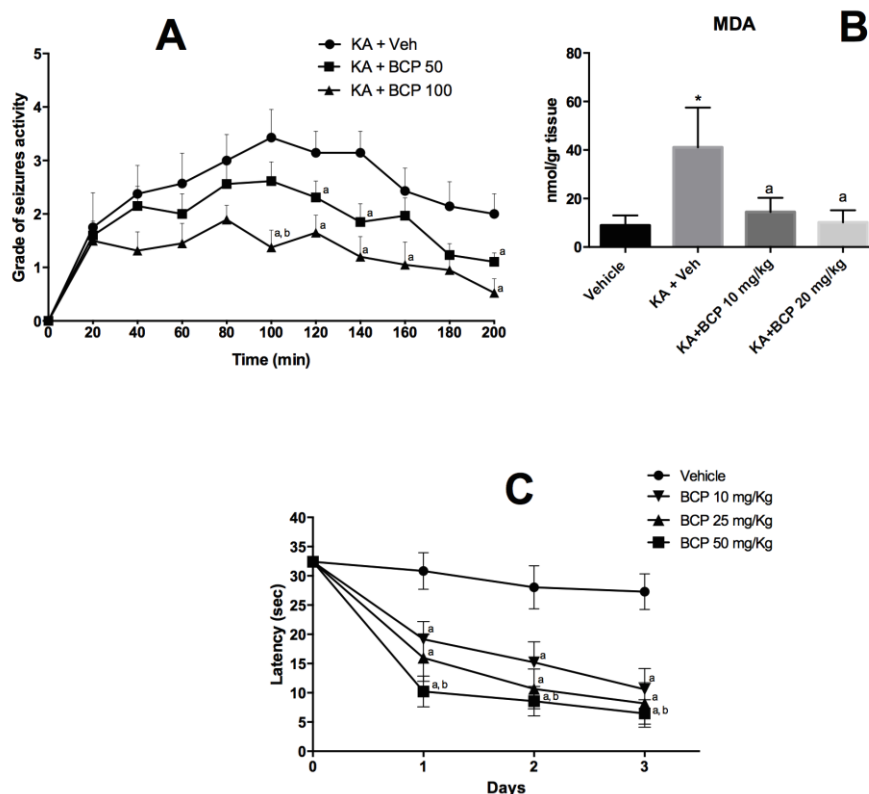
Os camundongos foram pré-tratados com BCF nas doses de 50 e 100 mg/kg, i.p. durante 7 dias para avaliar a protecção do agonista do receptor CB2 contra o EME induzido por AC. O grupo correspondente foi tratado com veículo da mesma maneira antes do AC. Vinte e quatro horas após a última administração de BCF, a neurotoxina foi administrada na dose de 30 mg/kg. A intensidade da convulsão foi pontuada por um período de observação de 3 horas. A administração de uma única dose excitotóxica de AC consistiu de automatismos faciais e levantamentos de cabeça que ocorreram dentro de 20 minutos após a administração. Além disso, esta atividade motora progrediu para o clônus anterior no grupo AC + Vei (**Fig. 1A**). A diminuição nos números das crises foi detectada nos grupos BCF, que alcançaram uma diferença significativa após 100 minutos (100 mg/kg BCF) e 120 minutos (50 mg/kg).

Os efeitos da administração subcrônica (i.p) de BCF na peroxidação lipídica, concomitante com EME, induzida por AC são apresentados na Figura 1. O agonista do receptor CB2 causou um aumento significativo no nível de

peroxidação lipídica no hipocampo do grupo AC + Veh ($p < 0,05$ vs grupo Veículo) (**Fig. 1B**). A ativação dos receptores CB2 atenuou, significativamente, a elevação da peroxidação lipídica induzida por AC no hipocampo de camundongos tratados subcronicamente com BCF 50 e 100 mg/kg, respectivamente ($p < 0,05$ vs. AC + grupo Veh).

Atividade dose-dependente de BCF no teste do labirinto de água de Moris

Figura 1A: O efeito do beta-cariofileno (BCF) na atividade convulsiva comportamental em camundongos tratados com ácido caínico (AC). **1B:** O efeito da BCF nos níveis de peroxidação lipídica (MDA) no hipocampo após o estado epiléptico induzido por AC em camundongos. **1C:** O efeito do BCF na latência de escape no primeiro cruzamento da localização da plataforma (área alvo) em camundongos usando o teste do labirinto aquático de Morris



A atividade convulsiva comportamental foi avaliada de acordo com as escalas elaboradas por Racine. Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. (a) Significância: $ap < 0,05$ vs. AC + Veh, $p < 0,01$ AC + BCF 50 vs. AC + BCF 100 (teste de *Kruskal-Wallis*). Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. (a) Significância: $ap < 0,05$ vs. Veículo, $p < 0,05$ vs. AC + Veh (One-way ANOVA). Os valores são apresentados como a média \pm S.E.M. Significância: $^ap < 0,05$ vs. Veículo, $^bp < 0,01$ vs. BCF 10 mg/kg vs. BCF 50 mg/kg (*Two-way ANOVA*).

A administração de BCF, 30 minutos antes de cada “teste de sonda”, em três doses diferentes de 10, 25 e 50 mg/kg, respectivamente, por via i.p.,

melhorou, significativamente, a capacidade de aprendizado espacial. Foi observado dois fatores de efeito principal do tratamento [F3,160 = 288; $p < 0,0001$] e Dia [F3,160 = 472,9, $p < 0,0001$], bem como interação entre os dois fatores [F9,160 = 34,14, $p < 0,0001$] para a latência no primeiro cruzamento da localização da plataforma anterior (área alvo). Comparações revelaram uma diminuição significativa na latência para alcançar a localização da plataforma nos três grupos de camundongos com PCP da 1ª a 3ª sessão ($p < 0,05$) (Fig. 1C). Além disso, uma diminuição na latência para atingir o alvo da plataforma foi, significativamente, diferente no grupo tratado com a maior dose de 50 mg/kg de BCF em comparação ao grupo tratado com a menor dose de 10 mg/kg ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Apesar da ampla gama de testes de epilepsia com diferentes mecanismos de ação, os dois testes de convulsão, ECM e PTZsc, são aceitos como referência para a ferramenta inicial de triagem para avaliação de substâncias recém-projetadas. No presente trabalho, conduzimos uma avaliação primária de um agonista seletivo do receptor de CB₂, BCF, seguindo o protocolo do *Epilepsy Therapy Screening Program* (SWINYARD, 1982). Com base nesses dados de triagem preliminar em camundongos, descobrimos que a BCF é ativo no teste ECM, sugerindo uma capacidade de inibir a disseminação de convulsões, o que não ocorre no teste de PTZ, que é usado para identificar compostos que elevam o limiar de convulsão.

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, revelando que uma microinfusão do agonista seletivo CB₂ AM1241 exerceu um efeito pró-convulsivo contra convulsões tônico-clônicas. Esse efeito é resultante do bloqueio pelo antagonista seletivo do receptor CB em ratos *Wistar* (DE CARVALHO *et al.*, 2016). No entanto, De Oliveira *et al.*, 2016 relataram que a BCF exerceu um efeito anticonvulsivante no teste de convulsão mioclônica induzida por PTZ. Entretanto, os autores demonstraram que, embora a dose elevada de 100 mg/kg de agonista do receptor CB₂ aumentasse a latência para o início de reflexos mioclônicos, não foi possível prevenir as crises generalizadas induzidas por uma dose de 60 mg/kg de PTZ em camundongos. Huizenga e colaboradores (2017) descobriram que, enquanto o antagonismo CB₁ e CB₂

exacerbam as convulsões induzidas pelo metil-6,7-dimetoxi-4-etil-beta-carbolina-3-carboxilato (DMCM), apenas o agonista misto CB_{1/2} e o agonista seletivo CB₁ possuía atividade anticonvulsiva mas não com efeito agonista CB₂ em ratos. Além disso, o agonista misto de CB_{1/2} mostrou potência contra ataques de PTZ, sugerindo que a ativação do receptor CB₁ está subjacente ao efeito neuroprotetor do sistema canabinoide em camundongos.

Há na literatura dados que apoiam a suposição de que a ativação do receptor CB₁ é uma ferramenta eficaz na prevenção de EME e suas consequências neurotóxicas. Estudos revelaram pela primeira vez que os receptores CB₂ também merecem exploração como um alvo putativo contra EME. Recentemente, Suleymanova (2016) relatou que a administração aguda do agonista CB₁, WIN55,212-2, após ser induzido pela pilocarpina, foi capaz de prevenir EME e exerceu neuroproteção no hilo sem prevenir o desenvolvimento de estado epiléptico crônico e atividade convulsiva espontânea em ratos. É bem conhecido que a neurotoxicidade do AC é devida ao seu mecanismo específico de ação direcionado aos receptores ionotrópicos de glutamato no hipocampo, que contribuem para o dano neural mediado pelo estresse oxidativo. Além disso, antioxidantes e sequestradores de radicais livres são considerados uma estratégia promissora para neutralizar a neurotoxicidade induzida por AC e danos neuronais.

No presente estudo, descobrimos que o pré-tratamento subcrônico com o agonista do receptor CB₂, BCF, atenuou com sucesso a intensidade das convulsões no teste AC, cujo efeito foi acompanhado por uma diminuição concomitante da peroxidação lipídica do EME no hipocampo. Recentemente, Stempel *et al.*, 2016 demonstraram, pela primeira vez, uma expressão e funcionalidade detalhadas do receptor CB₂ no hipocampo. Ao contrário dos receptores CB₁, que são encontrados, preferencialmente na fenda pré-sináptica, os receptores CB₂ foram distribuídos nos compartimentos pós-sinápticos do hipocampo, o que diferencia suas funções do subtipo do receptor CB. Os autores concluíram que os receptores CB₂ podem exercer uma ação inibitória tônica. Ao contrário de nossos achados; De Oliveira *et al.*, 2016 relataram que o BCF foi ineficaz contra o estresse oxidativo (ou seja, aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) produzido por convulsões PTZ (60 mg/kg, i.p) em camundongos, sugerindo que o BCF poderia exercer uma proteção específica do

modelo. No entanto, confirmamos o relato dos autores acima mencionados mostrando que o agonista CB₂, na dose de 100 mg/kg, melhorou o índice de reconhecimento no teste de reconhecimento de objeto sem afetar a locomoção em teste de *Rota Rod* ou nado forçado em camundongos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Demonstrando que o BCF melhorou de forma dependente da dose as capacidades de aprendizagem no teste de memória espacial. Nossos dados preliminares demonstraram que nessas doses de BCF (30, 100 e 300 mg/kg) não afetaram a atividade motora no teste de *Rota Rod*, sugerindo que o efeito da BCF na memória espacial não foi devido ao efeito falso positivo.

CONCLUSÃO

O agonista seletivo CB₂, BCF, diminui as convulsões tônico-clônicas no teste de eletrochoque e aliviou a neurotoxicidade induzida por AC e o estresse oxidativo em camundongos. Isso sugere que a ativação dos receptores CB₂ é protetora contra a disseminação de crises e ativação de ERO's decorrentes de EME. Nossos resultados, bem como registros anteriores confirmam o efeito anticonvulsivante do BCF em modelos de tônico-clônico generalizado e EME juntamente com capacidade de melhora da memória. Sugerindo que os agonistas do receptor CB₂ podem ser clinicamente úteis como tratamento adjuvante no EME reduzir o estresse oxidativo, neurotoxicidade e deficiências cognitivas.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Fundo Nacional de Ciência da Bulgária (bolsa de pesquisa # № DN 03/10) e da Universidade de Medicina de Sofia (concessão № D-74/2017). Keylla Machado foi aluna de doutorado, financiada pelo Programa de Bolsas de Estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - MCTI / MEC / CNPq [CPF: 028.823.723-45]. Os autores gostariam de agradecer a Tania Markovska por sua assistência técnica.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- LUSZCZKI, J.J.; WLAZ, A.; KARWAN, S.; FLOREK-LUSZCZKI, M.; CZUCZWAR, S.J. Effects of WIN 55,212-2 mesylate on the anticonvulsant action of lamotrigine, oxcarbazepine, pregabalin and topiramate against maximal electroshock-induced seizures in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, p. 247–254, 2013.
- LEITE, J.P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E.A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 93-103, 2002.
- MULLER, A.P.; GNOATTO, J.; MOREIRA, J.D.; ZIMMER, E.R.; HAAS, C.B.; LULHIER, F.; PERRY, M.L.; SOUZA, D.O.; TORRES-ALEMAN, I.; PORTELA, L.V. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. **Hippocampus**, v. 10, p. 1082-1092, 2010.
- AGRAWAL, N.; GOVENDER, S. Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. **Advances in psychiatric treatment**, v. 17, p. 44-53, 2011.
- AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M.; NURULAIN, S. M.; BAHJ 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, p. 260-268, 2014.
- ANGELOVA, V.; VOYNIKOV, Y.; ANDREEVA-GATEVA, P.; SURCHEVA, S. L.; VASSILEV, N.; PENCHEVA, T.; TCHEKALAROVA, J. In vitro and in silico evaluation of chromene based aroyl hydrazones as anticonvulsant agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 9, p. 1884-1896, 2017.
- BAHI, A. A.; 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, p. 119-124, 2014.
- BAMBICO, R.F.; GOBBI, G. The cannabinoid CB1 receptor and the endocannabinoid anandamide: possible antidepressant targets. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 12, n. 11, p. 1347-1366, 2008.
- 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, I. Y.; JU, C.; ANTHONY-JALIN, A. M.; LEE DA, I.; PRATHER, P. L.; KIM, W.K. activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 3, p. 928-939, 2013.

DE CARVALHO, C. R.; HOELLER, A. A.; FRANCO, P. L.; MARTINI, A. P.; SOARES, F. M.; LIN, K.; PREDIGER, R. D.; WHALLEY, B. J. The cannabinoid CB2 receptor-specific agonist AM1241 increases pentylentetrazole-induced seizure severity in Wistar rats. **Epilepsy research**, v. 127, p. 160-167, 2016.

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

DHOPESHWARKAR, A.; MACKIE, K. CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target—what does the future hold?. **Molecular pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 430-437, 2014.

GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.M.; FLORENTINO, F.I.; LINO C.R.; FAJEMIROYE, O.J.; CHAIBUB, A.B.; DE PAULA, R.J.; DE LIMA C.T.; COSTA A.E. 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-GUTIÉRREZ, M.S.; GARCÍA-BUENO, B.; ZOPPI, S.; LEZA, C.J.; MANZANARES J. Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABAA receptors. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 951-964, 2012.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M.S.; PÉREZ-ORTIZ, J.M.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MANZANARES, J. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1773-1784, 2010.

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.

GUPTA, Y. K.; BRIYAL, S. Protective effect of vineatrol against kainic acid induced seizures, oxidative stress and on the expression of heat shock proteins in rats. **European neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 85-91, 2006.

GUPTA, Y. K.; BRIYAL, S.; CHAUDHARY, G. Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 245-249, 2002.

HUIZENGA, M.N.; WICKER, E.; BECK, V. C.; FORCELLI, P.A. Anticonvulsant effect of cannabinoid receptor agonists in models of seizures in developing rats. **Epilepsia**, v. 58, n. 9, p. 1593-1602, 2017.

KATSUYAMA, S.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KOMATSU, T.; NAGAOKA, K.; NAKAMURA, H. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European journal of pain**, v. 17, n. 5, p. 664-675, 2013.

LEE, T. H.; LEE, J. G.; YON, J.M.; OH, K. W.; BAEK, I. J.; NAHM, S.; LEE, B.J.; YUN, Y. W.; NAM, S. Y. Capsaicin prevents kainic acid-induced epileptogenesis in mice. **Neurochemistry international**, v. 58, n. 6, p. 634-640, 2011.

RACINE, R.; ROSE, P. A.; BURNHAM, W. M. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 273-278, 1977.

ROSENBERG, E. C.; PATRA, P. H.; WHALLEY, B. J. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 319-327, 2017.

SAUDI M.A. Protective effects of curcumin against lithium–pilocarpine induced status epilepticus, cognitive dysfunction and oxidative stress in young rats. **Saudi journal of biological sciences**, v. 20, n. 2, p. 155-162, 2013.

SHARMA, C.; SADEK, B.; GOYAL, N.S.; SINHA, S.; KAMAL A.M.; OJHA S. Small molecules from nature targeting G-protein coupled cannabinoid receptors: potential leads for drug discovery and development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

STEMPEL, A. V.; STUMPF, A.; ZHANG, H. Y.; XI, Z. X.; ZIMMER, A.; SCHMITZ, D. Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific plasticity in the hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795-809, 2016.

SULEYMANOVA, E. M.; SHANGARAEVA, V. A.; VAN-RIJN, C. M. VINOGRADOVA, L.V. The cannabinoid receptor agonist WIN55. 212 reduces consequences of status epilepticus in rats. **Neuroscience**, v. 334, p. 191-200, 2016.

SWINYARD, E. A. Experimental detection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. **Antiepileptic drugs**, p. 111-126, 1982.

VALENZANO, K. J.; TAFESSE, L.; LEE, G.; HARRISON, J. E.; BOULET, J. M.; GOTTSALL, S. L. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 5, p. 658-672, 2005.

4.3 3º CAPÍTULO

Betacariofileno em modelos animais: perspectivas para terapias da ansiedade

Beta-caryophyllene in animal models: perspectives for anxiety therapies

(Artigo submetido na Neuroscience)

Beta-cariofileno em modelos animais: perspectivas para terapias da ansiedade

Beta-caryophyllene in animal models: perspectives for anxiety therapies

Keylla da Conceição Machado^{1,2} Márcia Fernanda Correia Jardim Paz^{1,2} José Victor de Oliveira Santos^{1,2}, Jana Tchekalarova³ João Marcelo de Castro e Sousa^{1,2}, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64049-550, Teresina - Brasil.

²Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina – Brasil.

³Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica, BAS, Sofia, Bulgária.

RESUMO

O beta-cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico com efeitos analgésico, anti-inflamatório e antioxidante. O estudo avaliou os efeitos ansiolíticos do beta-cariofileno em modelo animal, bem como sua toxicidade em *Artemia salina* e efeitos antioxidantes em estudos *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae*. Os efeitos ansiolíticos foram analisados utilizando os testes de labirinto em cruz elevado, *rota rod*, claro-escuro e de esconder esferas, em camundongos *Swiss*, com as doses de 10, 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal. Os estudos antioxidantes e toxicológicos foram realizados nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM. Os efeitos antioxidantes *in vitro* foram avaliados para inibição dos radicais DPPH, ABTS e hidroxila, bem como em *Saccharomyces cerevisiae*. O beta-cariofileno teve efeito ansiolítico pelo aumento do número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência no compartimento claro, diminuição do número de esferas escondidas e não prejudicou o desempenho de camundongos no *Rota Rod*. Não apresentou toxicidade aguda em *A. salina* em 24 horas. No experimento *in vitro*, o beta-cariofileno apresentou efeitos antioxidantes por captura de radicais livres, na maior concentração, similarmente ao Trolox. Em *Saccharomyces cerevisiae* também foram observados efeitos protetivos e de reparo frente aos danos do peróxido de hidrogênio. Análises estatísticas indicaram significantes correlações positivas e negativas entre a atividade ansiolítica com antioxidantes *in vitro* e em *S. cerevisiae*. Os efeitos ansiolíticos, sem toxicidade e com ações antioxidantes, nas doses e concentrações usadas, apontam que o beta-cariofileno é um composto promissor para formulações farmacêuticas, por possíveis mecanismos associados ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Beta-cariofileno, ansiedade, antioxidante

ABSTRACT

Beta-caryophyllene is a bicyclic sesquiterpene with antihyperglycemic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant effects. The study evaluated the antianxiety effects of beta-caryophyllene in animal model, as well as its toxicity using the Brine shrimp lethality test and antioxidant effects using in vitro studies and *Saccharomyces cerevisiae*. The anxiolytic effects were tested in Swiss mice with the elevated plus maze, rota-rod, light and dark and hiding sphere tests at doses of 25, 50 and 75 mg / kg administered intraperitoneally; the toxic and antioxidant effects were evaluated at concentrations of 0,3; 0,7; 1,5 and 3 mM. The antioxidant effects included *Saccharomyces cerevisiae*, DHPP (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals), ABTS (2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and hydroxyl radical test. Beta-caryophyllene had anxiolytic effects due to increased number of entries in the open arms and length of staying in the clear compartment, a decrease in the number of hidden beads and did not affect the performance of mice in the rota-rod. It did not present acute toxicity in *A. salina* in 24 hours. In the in vitro test, betacaryophyllene showed antioxidant effects by capturing free radicals, in the highest concentration, similar to Trolox. *Saccharomyces cerevisiae* also showed protective and repair effects against hydrogen peroxide damage. Positive and negative correlations were verified between anxiolytic activity and antioxidants in vitro and in *S. cerevisiae*. Anxiolytic effects, low toxicity and antioxidant activity at the concentrations used indicate that beta-caryophyllene is a promising compound for pharmaceutical formulations, due to possible mechanisms associated with oxidative stress.

Keywords: Beta - caryophyllene, anxiety, antioxidant

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE's) são derivados do metabolismo secundário de diversas plantas e possuem composição química complexa, na qual se destaca a presença de terpenos como os diterpenos e sesquiterpenos, que são elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2018). Biologicamente e farmacologicamente ativos (MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012; ZHAI *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, tem havido um interesse crescente em estudar a composição química e as atividades biológicas dos fitoquímicos presentes nos óleos essenciais isolados de diferentes espécies, dentre eles o beta-cariofileno (BCF).

O BCF é um sesquiterpeno bicíclico que inclui os isômeros alfa (α), beta (β) e gama (γ). Dentre estes isômeros, o BCF desempenha um importante papel na química dos sesquiterpenoides, o qual está entre os sesquiterpenos mais encontrados em muitos óleos essenciais de alimentos vegetais como orégano

(*Origanum vulgare* L.) (LOZANO *et al.*, 2004), pimenta (*Piper nigrum* L.) (ORAV *et al.*, 2004) e cravo (*Eugenia caryophyllata*) (SILVESTRI *et al.*, 2010). Este sesquiterpeno está entre os principais princípios ativos da *Cannabis sativa*, *Ocimum gratissimum*, *Cordia verbenaceae*, *Spiranthera odoratissima* e de várias espécies da *Copaifera* L. (GERTSCH *et al.*, 2008; CHAIBUB *et al.*, 2009; CHARLES; SIMON, 2011). O BCF foi aprovado como um aditivo alimentar presente nos alimentos industriais visando manter sabor, textura e aparência pela *Food and Drug Administration* (FDA, nº. 21CFR172.515).

Vários modelos experimentais demonstraram promissoras atividades do BCF como anti-hiperglicêmico (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2014), antitumoral (LEGAULT; PICHETTE, 2007) analgésico, anti-inflamatório (BAKIR *et al.*, 2008), antimicrobiano (DAHAM *et al.*, 2010) antidepressivo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018) e ansiolítico (BAHI *et al.*, 2014). Entretanto, os mecanismos de ação ainda não estão bem estabelecidos, mas existem relatos de que o BCF tem capacidade antioxidante *in vitro* frente às espécies reativas de oxigênio (ERO's), influenciando ou evitando o dano oxidativo (DAHAM *et al.*, 2015), a exemplo da indução da expressão da glutatona, vitaminas C, E e enzimas: catalase e superóxido dismutase (LUCENA, 2010). O estresse oxidativo está envolvido nos mecanismos de diversas doenças, principalmente as que se referem ao Sistema Nervoso Central (SNC) como epilepsia (RUMIÀ *et al.*, 2013), depressão (SHATILLO *et al.*, 2013), ansiedade (RECKZIEGEL *et al.*, 2011; CACERES *et al.*, 2013) e doença de *Parkinson* (TAI *et al.*, 2013).

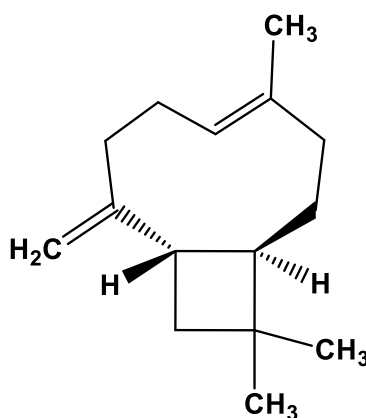
As ERO's podem ser produzidas internamente como subprodutos da cadeia respiratória mitocondrial, mas os organismos podem receber ERO's de fontes exógenas, como fumaça, radiação e contaminação (SODERGREN, 2000). Entretanto, sua exposição excessiva pode ser altamente tóxica e causar danos nas macromoléculas celulares, incluindo o DNA, proteínas e lipídios, podendo resultar em dano e em morte celular (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011). O estudo teve por objetivo avaliar os efeitos ansiolíticos em modelo animal para ansiedade, tóxicos em *Artemia salina*, e antioxidantes *in vitro* e moduladores de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae*

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

O composto isolado beta-cariofileno ($C_{15}H_{24}$), (**Figura 1**), com peso molecular de 204g/mol e grau de pureza $\geq 80\%$, foi adquirido por meio da empresa *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). Para a atividade antioxidante *in vitro*, o Trolox, o ácido tiobarbitúrico (TBA), o ácido tricloroacético (TCA), nitroprussiato de sódio (SNP), 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2-desoxirribose foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA). No ensaio *Saccharomyces cerevisiae*, utilizou-se o meio YEL (extrato de levedura 1%, bacto peptona 2%, dextrose 2%) e YED (extrato de levedura 1%, bacto peptona 2%, dextrose 2%, ágar 2%) adquiridos da Microbac[®] (São Paulo, Brasil) para cultivo e semeio das linhagens, respectivamente. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil).

Figura 1. Estrutura química do beta-cariofileno.



Fonte: dos autores

Modelo com animais para estudos de atividade ansiolítica

Animais

Foram utilizados, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, albinos, machos, pesando entre 25 a 30g, com dois meses de idade,

provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e ração tipo *pellets* (Purina®) com livre acesso e foram mantidos sob iluminação controlada (12 h de ciclo claro/escuro) e temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Os experimentos comportamentais foram realizados entre 8h-12 h. Os animais foram monitorados por mais de uma hora depois dos testes comportamentais. Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (Nº 008/2015).

Tratamento dos animais

O BCF, obtido da *Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA* (grau de pureza $\geq 80\%$), foi emulsificado com *Tween 80 0,05%* (*Sigma-EUA*) e dissolvido em solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com a substância experimental nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, escolhidas com base em estudos anteriores e administrados via intraperitoneal, 30 minutos antes dos experimentos, com oito animais por grupo. O grupo controle negativo recebeu veículo (*Tween 80 0,05%* com salina 0,9%) em um volume constante de 10 mL/kg, administrado pela mesma via dos grupos tratados. Como controle positivo, foram administradas 2 mg/kg Diazepam (DZP) (*Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA*), via intraperitoneal, após serem dissolvidas em solução salina a 0,9%.

Teste Rota Rod

O teste *Rota Rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou não coordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos (8 animais/grupo) foram tratados conforme os protocolos experimentais. E, 30 minutos após o tratamento, foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de até 180 segundos, para verificação do tempo de permanência no aparato e o número de quedas.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato é formado por dois braços abertos (50 × 10cm), dois braços fechados (50x10x50 cm), e uma plataforma central (10 x 10cm). No início do teste, o camundongo foi colocado na plataforma central, de frente para um braço aberto. O aparelho foi elevado 50 cm acima do nível do chão. O experimento foi realizado durante 5 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: distância total percorrida (cm), distância percorrida nos braços abertos vs distância total (cm), número de entradas nos braços abertos. Estes dados fornecem informações sobre o índice de ansiedade do animal. Índice de ansiedade foi calculado utilizando a seguinte equação: Índice de ansiedade = $1 - [(\text{Tempo central} / \text{Tempo total} + (\text{Centro Distância} / \text{distância total})) / 2]$. O índice de ansiedade varia de 0 a 1, com um valor mais alto indicando aumento da ansiedade. Após cada ensaio, o LCE foi limpo com solução de ácido acético a 0,1% (TCHEKALAROVA *et al.*, 2013).

Teste Claro-escuro

O aparato utilizado é feito de acrílico, dividido em dois compartimentos (caixa de luz e caixa escura), comunicados através de uma pequena porta. A caixa escura (preto acrílico; 27x18x29 cm³) não é iluminada. A caixa transparente (transparente acrílico; 27x18x29 cm³) é iluminada pela luz ambiente. Trinta minutos depois dos tratamentos, iniciou-se o teste. Todos os animais foram colocados, inicialmente, no compartimento claro e foram avaliados por um período de 5 minutos. O parâmetro utilizado foi o tempo (segundos) gasto e o número de entradas no compartimento claro. A entrada no compartimento claro era considerada válida quando o animal atravessava com as quatro patas. Após cada teste, o equipamento foi limpo com solução de ácido acético a 0,1% (COSTA *et al.*, 2014).

Teste de esconder esferas

O procedimento de esconder esferas foi proposto tendo em vista que os roedores exibem o comportamento de esconder (enterrar) objetos aversivos como uma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados como as

esferas de vidro (POLING; CLEARY; MONAGHAN, 1981; PIRES *et al.*, 2013). A administração de uma substância com possível efeito ansiolítico, em roedores, tende a reduzir o número de esferas escondidas (NEE) neste teste. O primeiro grupo foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%, i.p.), o segundo grupo com o DZP (2 mg/kg, i.p.) e o terceiro, quarto e quinto grupos foram tratadas com BCF (10, 25 e 50 mg/kg, i.p.), respectivamente. Após 30 minutos do tratamento, os animais foram colocados, individualmente, em caixas de policarbonato de 27 x 16 x 13 cm, forradas com uma camada de 5cm de maravalha sobre a qual foram distribuídas, uniformemente 25 esferas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. O Número de Esferas Escondidas (NEE) foi registrado. Foram consideradas escondidas as esferas completamente cobertas pela maravalha. Após cada sessão de teste individual, as esferas foram limpas com solução de ácido acético a 0,1% e trocado a maravalha para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

Teste em *Artemia salina*

Na avaliação da toxicidade aguda, utilizou-se o ensaio de letalidade em náuplios de *A. salina* (MEYER *et al.*, 1982). Os cistos foram incubados em água salina artificial (39,35 mM NaCl; 18,66 mM MgCl₂ · 6 H₂O; 28.16 mM Na₂SO₄; 8.84 mM CaCl₂·2 H₂O e 9.38 mM of 9,38 mM de KCl em 1000 mL de água) a 25 – 30 °C. O bicarbonato de sódio (Na₂CO₃) foi utilizado como tampão até atingir o pH 9,0 da solução de salmoura. Após 48h de incubação, 10 náuplios vivos e ativos foram transferidos para tubos de ensaio, contendo o BCF nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM.

O volume final de cada amostra foi ajustado para 5mL com solução salina artificial e água ausente de cloro (1:1, v.v⁻¹). As amostras foram mantidas sob a mesma condição de incubação por 24 – 48h adicionais. Náuplios vivos foram contados macroscopicamente para determinar o número de mortes por concentração. Água salina e K₂Cr₂O₇ (5 µg.mL⁻¹) foram utilizados como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. Os tratamentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como porcentagem da mortalidade.

Ensaio antioxidantes *in vitro*

Frente ao radical DPPH[•]

A avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH[•] foi realizada pela metodologia descrita por Silva; Menezes; Eleutherio (2005). Uma mistura reacional do BCF em diferentes concentrações (0,3; 0,7; 1,5 e 3,0 mM) com o radical DPPH[•] foi agitada, vigorosamente, e incubada à temperatura ambiente na ausência da luz por 30 minutos. A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os valores inibição das absorbâncias (517 nm) foram expressos como porcentagem (%) de do radical DPPH[•] em relação ao Sistema (100% de radical DPPH[•]). Foi determinada a concentração efetiva (CE₅₀) do BCF necessária para inibir 50% do radical DPPH[•]. E, para comparação, o mesmo procedimento experimental foi utilizado com o Trolox (0,1-3 mM).

Frente ao cátion radical ABTS^{•+}

Para avaliar a capacidade antioxidante contra o radical ABTS^{•+}, foi formado, inicialmente, o cátion radical ABTS^{•+} de acordo com o procedimento descrito por Re e colaboradores (1999). Após esta etapa, a solução foi diluída em etanol até obter uma solução com absorbância de 1,00 (± 0,05) em 734 nm. Em ambiente escuro e à temperatura ambiente, foi feita uma mistura reacional do BCF (0,1-3 mM) com a solução de ABTS^{•+}. O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorbâncias foram realizadas transcorrido o tempo de 6 minutos em espectrofotômetro (734 nm). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} em relação ao Sistema (100% de radical ABTS^{•+}). Foi determinada a concentração efetiva (CE₅₀) do BCF necessária para inibir 50% do radical ABTS^{•+} em 734 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo Trolox (0,1-3 mM).

Frente ao radical hidroxila

Para avaliar a capacidade antioxidante contra o radical hidroxila, gerado pelo sistema de Fenton (LOPES *et al.*, 1999), várias alíquotas do BCF (0,1-3 mM) foram adicionadas ao meio reacional contendo 2-desoxirribose, 3,2 mM de FeCl₃ (50 mM), H₂O₂ (100 mM) e tampão fosfato (20 mM, pH 7,4). A mistura reacional

foi incubada a 50 °C por 40 minutos. Após este procedimento, foi adicionado ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 1% (ATB, NaOH 50 mM). Depois, a mistura foi aquecida durante 15 minutos a 95 °C, arrefecida e as absorbâncias medidas em 532 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da degradação da 2-desoxirribose em relação ao Sistema (100% de radical hidroxila). A concentração efetiva (CE₅₀) do BCF necessária para inibir em 50% a degradação da 2-desoxirribose em 532 nm foi determinada. Para comparação, o mesmo procedimento experimental foi utilizada para o Trolox (0,1-3 mM).

Teste em linhagens de *S. Cerevisiae*

A *S. cerevisiae* é um dos principais organismos modelo eucarióticos utilizado em estudos emergentes para entender a resposta celular ao estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante em produtos dietéticos naturais (MENG *et al.*, 2017). Foram utilizadas seis linhagens de leveduras da espécie *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em suas defesas antioxidantes. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene *Sod1Δ*), enquanto a EG110 apresenta mutação na *Sod* mitocondrial (MnSOD - produto do gene *Sod2Δ*); EG133 é o duplo mutante defectivo para *Sod1Δ* e *Sod2Δ*; a linhagem EG223 é defectiva na enzima catalase (*Ctt1Δ*); a EG é o duplo mutante defectivo para *Sod1Δ* e *Ctt1Δ*; e EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas (**Tabela 1**).

Tabela 1. Descrição das linhagens e genótipos de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (<i>Sod wt</i>)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	
EG118 (<i>Sod1Δ</i>)	sod1::URA3 all other markers as EG103	
EG110 (<i>Sod2Δ</i>)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (<i>Sod1ΔSod2Δ</i>)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	
EG223 (<i>Ctt1Δ</i>)	EG103, except cat1:: TRP1	
EG (<i>Sod1ΔCtt1Δ</i>)	EG103, except sod1:: URA3 and ctt1:: TRP1	

Adaptado de Oliveira *et al.*, 2014.

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de bacto peptona, 2% de glucose) a 28 °C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foram acrescentadas, nas distintas placas, 10 µL das concentrações (0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM) do BCF. Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados: H₂O₂ (10 mM) como controle positivo (10 µL); e, solução salina (0,9%) como controle negativo. Após 48h de incubação em estufa a 30 °C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel filtro até o início do crescimento celular (**Tabela 2**).

Tabela 2. Protocolo experimental em linhagens de *S. cerevisiae*.

Tratamentos	Procedimentos
<i>Pré-tratamento</i>	Adição de 10 µL do BCF, em diferentes concentrações, sobre o disco central em placas de Petri. Após 2h, foram adicionados 10µL de H ₂ O ₂ e, posterior incubação em estufa a 30 °C por 48h.
<i>Co-tratamento</i>	Adição de 10 µL de H ₂ O ₂ + 10µL do BCF, em diferentes concentrações, sobre o disco central em placas de Petri e, posterior incubação em estufa a 30°C por 48h.
<i>Pós-tratamento</i>	Adição de 10 µL de H ₂ O ₂ sobre o disco central em placas de Petri. Após 2h, foram adicionados 10 µL do extrato do BCF, em diferentes concentrações e, posterior incubação em estufa a 30 °C por 48h.
Controle positivo	Adição de 10 µL de H ₂ O ₂ , como controle positivo, sobre o disco central em placas de Petri e, posterior incubação em estufa a 30 °C por 48h.
<i>Controle negativo</i>	Adição de 10 µL de solução fisiológica (0,9%), como controle negativo, a fim de avaliar os danos oxidativos espontâneos às linhagens de leveduras e, posterior incubação em estufa a 30 °C por 48h.

Os valores do percentual de modulação do BCF nos danos oxidativos ocasionados pelo H₂O₂ foram calculados levando em consideração o comprimento do semeio do disco central até a lateral da placa (40mm) empregando regra de três simples. Após obtenção dos valores referentes à oxidação foi calculado o percentual de modulação empregando a seguinte fórmula: $\%M = [CP - (\text{beta-cariofileno} + CP)] / CP \times 100$ onde, o “%M” representa o percentual de modulação do beta-cariofileno, CP: percentual do dano oxidativo

induzido pelo H₂O₂.beta-cariofileno + CP: percentual do dano oxidativo induzido pelo BCF associado com H₂O₂.

Análise estatística

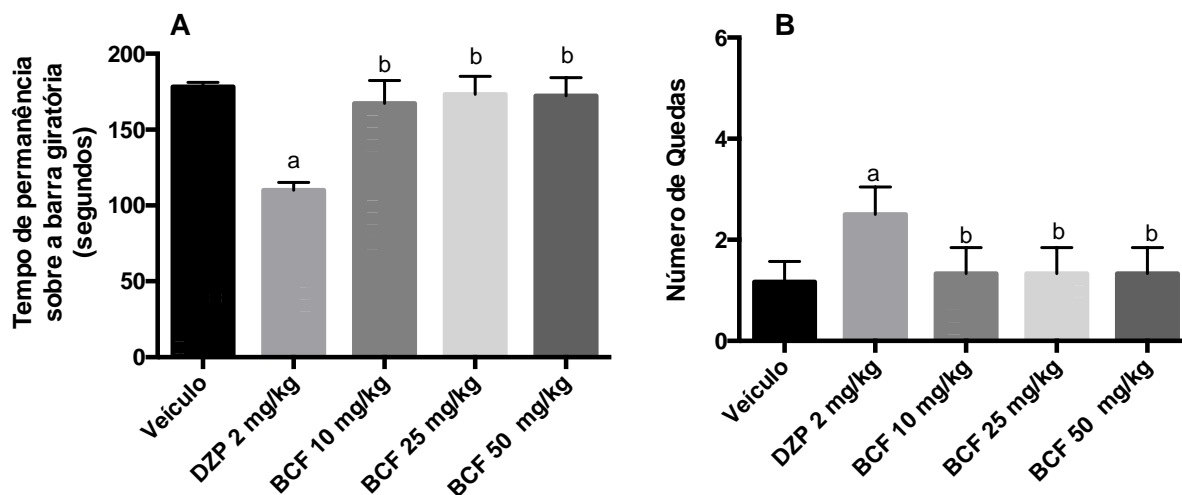
Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA seguido do teste *Neuman–Keuls* como *post-hoc* teste), seguidos pelos testes de *Tukey*, *Dunnets* e *Bonferroni* usando GraphPad Prism (versão 6.0), considerando $p < 0,05$ com um nível de confiança de 95%. Correlações estatísticas de *Pearson* foram feitas para avaliar associações dos efeitos ansiolíticos do beta-cariofileno com as atividades antioxidantes.

RESULTADOS

Avaliação comportamental/toxicológica do beta-cariofileno em camundongos no teste Rota rod

Nos grupos tratados com o beta-cariofileno não foi verificada alteração na coordenação motora sob os parâmetros avaliados: tempo de permanência dos camundongos na barra giratória quando comparados com o grupo veículo nas doses testadas, 10 (167,2s \pm 6,25s), 25 (173,3s \pm 4,77s) e 50 (172,3s \pm 4,85s) mg/kg (**Figura 2A**). Entretanto, os animais tratados com DZP (110s \pm 2,14s) permaneceram 38,3 % menos tempo na barra giratória quando comparado ao veículo (178,3s \pm 1,16s) ($p < 0,05$), demonstrando, assim, o efeito relaxante muscular. Não foi observado aumento no número de quedas dos animais tratados com BCF nas doses de 10 (1,33 \pm 0,21), 25 (1,33 \pm 0,21) e 50 (1,33 \pm 0,21) mg/kg quando comparados ao veículo. Mas, nos animais tratados com DZP (2,50 \pm 0,22) ($p < 0,05$), foi observado um aumento no número de quedas quando comparado ao veículo (1,16 \pm 0,16) (**Figura 2B**).

Figura 2. Avaliação da atividade locomotora de camundongos tratados com beta-cariofileno (BCF) nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg e diazepam (DZP) na dose de 2 mg/kg, através do teste *Rota Rod*. Em **A**, os dados para tempo de permanência; e, em **B**, para o número de quedas.



Os valores representam a média \pm E.P.M. Os animais utilizados nos testes foram de 8 por grupo. ^a $p < 0.05$ diferença significativa em relação ao veículo, ^b $p < 0.05$ diferença significativa em relação ao DZP. (ANOVA seguido do teste *Neuman-Keuls* como *post-hoc* teste).

Efeito ansiolítico do beta-cariofileno (BCF) no teste de Labirinto em Cruz Elevado, Claro-Escuro e Esconder esferas

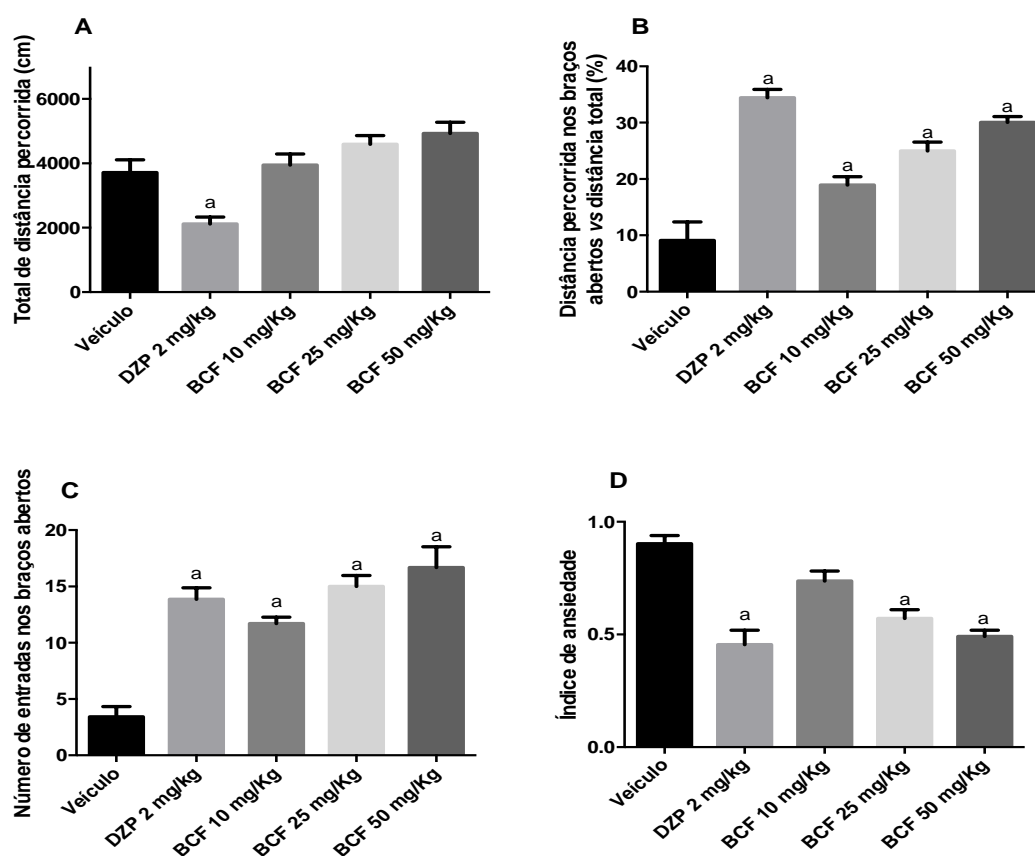
No Teste de Labirinto em Cruz Elevado, os parâmetros de distância total percorrida, distância percorrida nos braços abertos vs distância total, número de entradas nos braços abertos e índice de ansiedade foram utilizados para avaliar os níveis de ansiedade do animal. O BCF demonstrou um possível efeito ansiolítico no teste de Labirinto em Cruz Elevado, por apresentar alteração na distância total percorrida dos camundongos nas doses de 10 mg/kg (3944 ± 348 cm), 25 mg/kg (4546 ± 266 cm) e 50 mg/kg (4920 ± 353 cm) quando comparados ao veículo.

A atividade locomotora também foi avaliada no Teste de Labirinto em Cruz Elevado onde foi verificado que o grupo DZP (2113 ± 219 cm) ($p < 0,05$) percorreu uma menor distância no aparato quando comparado com ao veículo (3714 ± 398 cm).

O DZP desencadeou aumento ($p < 0,05$) na distância percorrida nos braços abertos vs distância total ($34,43 \pm 1,47$) e no número de entradas nos braços abertos ($13,86 \pm 1$) em comparação ao grupo veículo ($9 \pm 3,32$; $3,42 \pm 0,89$, respectivamente), demonstrando, assim, o seu efeito ansiolítico (**Figura 3A**).

A avaliação ansiolítica foram observadas para o BCF também nas análises do distância percorrida nos braços abertos vs distância total (**Figura 3B**) e número de entradas nos braços abertos (**Figura 3C**), quando comparado ao controle nas doses de 10 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. O BCF em 10 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg, de forma similar ao DZP 2 mg/kg, apresentou índice de ansiedade menor ($p < 0,05$) que o grupo veículo. (**Figura 3D**).

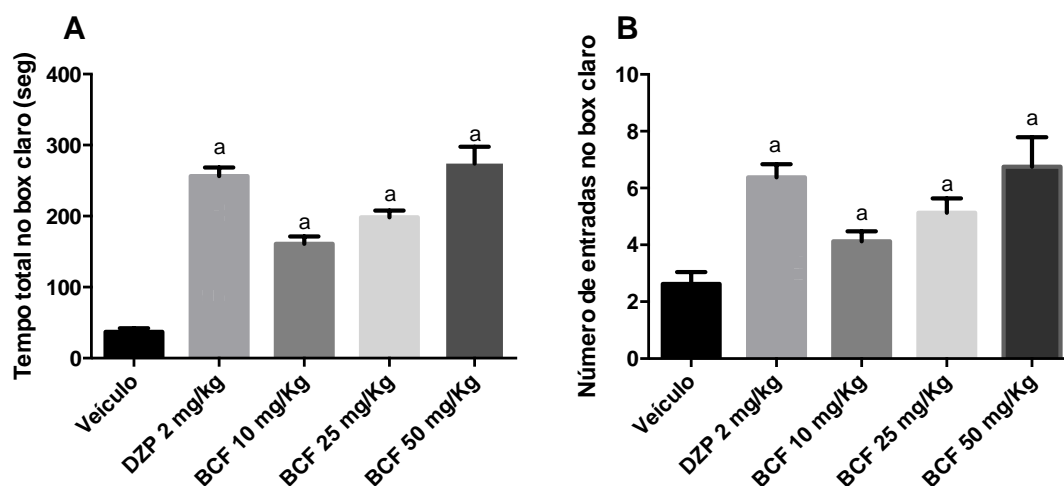
Figura 3. Efeito do BCF na avaliação da ansiedade pelo Labirinto em Cruz Elevado. Os valores representam a média \pm E.P.M. O número de animais utilizados nos testes foi de 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo (veículo). BCF – beta-cariofileno; DZP – diazepam.



Efeito ansiolítico do beta-cariofileno no teste Claro-Escuro foram avaliados os parâmetros de número de cruzamentos na caixa de luz e o tempo de permanência na caixa de luz. Estes parâmetros demonstraram um possível efeito

ansiolítico para o BCF. Os animais tratados com DZP ($256,4 \pm 12$ s) permaneceram mais tempo ($p < 0,05$) no box claro, assim como os animais dos grupos BCF 10mg/Kg ($161 \pm 10,64$ s), BCF 25mg/Kg ($198,4 \pm 9,48$ s) e BCF 50mg/Kg ($274,1 \pm 8,04$ s) quando comparados ao grupo veículo ($37 \pm 5,31$ s). O grupo BCF 50mg/Kg apresentou resultado maior ($p < 0,05$) ao observado no grupo DZP (**Figura 4A**). Ao analisar o parâmetro número de cruzamentos para na caixa de luz, verificou-se o aumento ($p < 0,05$) do número de cruzamento para os animais do grupo DZP ($6,37 \pm 0,46$), BCF 10mg/Kg ($4,16 \pm 0,35$), BCF 25mg/Kg ($5,12 \pm 0,51$) e BCF 50mg/Kg ($6,75 \pm 0,36$), quando comparados ao veículo ($2,62 \pm 0,41$) (**Figura 4B**).

Figura 4. Efeitos do BCF na avaliação da ansiedade pelo Teste de Claro-Escuro. Os valores representam a média \pm E.P.M. Em **A**, dados para o número de cruzamentos; e, em **B**, tempo total no box claro.

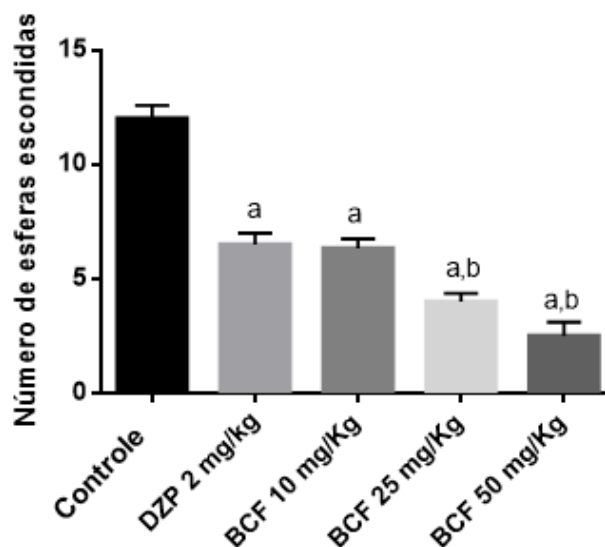


Os animais utilizados nos testes foram de 8 por grupo. ^a $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle (veículo). (ANOVA seguido do teste *Neuman-Keuls* como *post-hoc* teste). BCF – beta-cariofileno; DZP – diazepam.

Efeito ansiolítico do beta-cariofileno no teste de esconder esferas, inicialmente, os animais foram pré-tratados com veículo, DZP (2 mg/kg) e BCF nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, após 30 min realizado o teste. Foi verificada redução ($p < 0,05$) de 45,4% no número esferas escondidas em relação ao veículo ($12 \pm 0,57$) para os animais tratados com DZP ($6,55 \pm 0,5$) e de 47,25%; 66% e 79%, para os animais tratados com BCF nas doses de 10 ($6,33 \pm 0,42$), 25 ($4 \pm 0,42$) e 50 ($2,50 \pm 0,61$) mg/kg em relação ao veículo. Também foi observado que

o BCF, nas doses de 25 e 50 mg/kg, apresentou uma redução de 38,9%, 61% comparado ao grupo DZP, respectivamente (**Figura 5**).

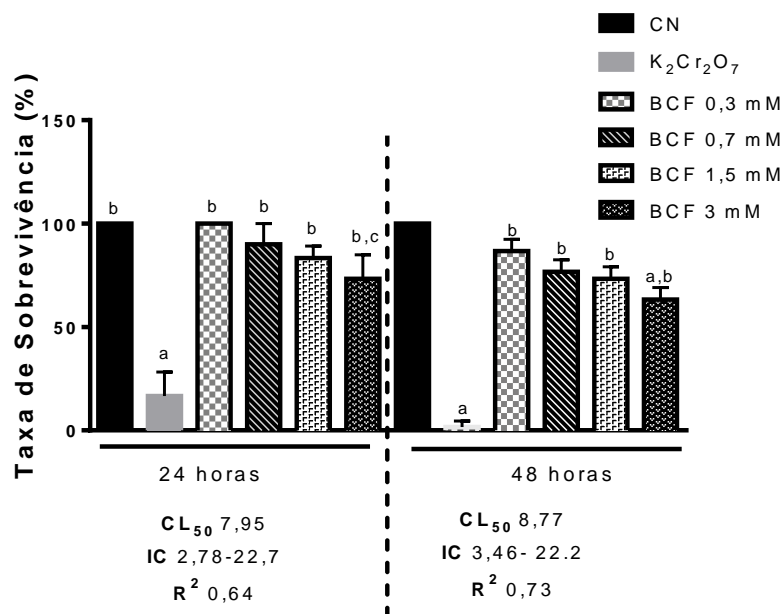
Figura 5. Número de esferas de vidro enterradas por camundongos tratados, intraperitonealmente com BCF. Os valores representam a média \pm E.P.M. O número de animais utilizados nos testes foi de 8 animais por grupo. ^ap <0.05 diferença significativa em relação ao grupo (veículo). BCF – beta-cariofileno; DZP – diazepam.



Avaliação de toxicidade do beta-cariofileno (BCF) em *A. salina*

A toxicidade aguda do BCF avaliada em *A. salina* indicou ausência significativa ($p > 0,05$) de efeitos tóxicos na maior concentração testada (3 mM) quando relacionada ao controle negativo (CN) ($100 \pm 0,0$). E, em 48 horas, entretanto, foi evidente o decaimento do percentual de sobrevivência à medida que os náuplios eram expostos nas concentrações de BCF 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM. Os percentuais de sobrevivência foram de $100 \pm 0,0$; $90,00 \pm 5,77$; $83,33 \pm 3,33$; $73,30 \pm 6,66\%$ nas primeiras 24 horas, seguidos de $86,67 \pm 3,33$; $76,67 \pm 3,33$; $73,33 \pm 2,8$; $63,00 \pm 3,00 \%$ em 48 horas de exposição (**Figura 6**).

Figura 6. Efeitos tóxicos do BCF em *A. salina*. Os valores são médias \pm erro padrão (SEM) ($n = 3$, triplicata, 10 náuplios vivos/tubo). $p < 0,05$ quando comparadas ao ^aCN, ^bK₂Cr₂O₇ e concentrações ^c0,3 mM do BCF no mesmo período de tempo. ANOVA seguido de *Tukey* (múltiplas comparações) pós-teste de sentido único.



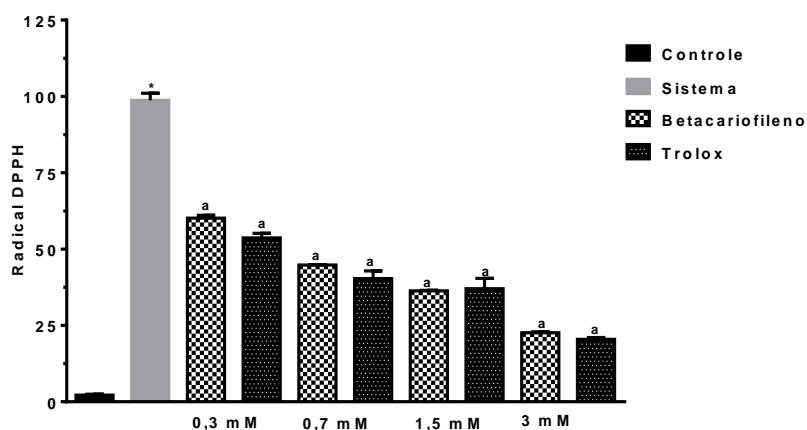
CN: controle negativo; K₂Cr₂O₇: dicromato de potássio (0,3 mM); CL₅₀: concentração que indica 50% de letalidade; IC: intervalo de confiança; R²: coeficiente de determinação.

Avaliação antioxidante do beta-cariofileno (BCF) em testes *in vitro*

Capacidade antioxidante do BCF por inibição de DPPH

Os valores da capacidade antioxidante do BCF frente ao radical DPPH•, nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM foram, respectivamente, de 60,13 \pm 0,43; 44,77 \pm 0,08; 38,30 \pm 0,11 e 22,63 \pm 0,14%, em que reduziu significativamente ($p < 0,05$) o radical DPPH em relação ao sistema. Nas mesmas condições experimentais, o Trolox apresentou capacidade antioxidante de 53,67 \pm 0,88; 40,33 \pm 1,45; 37,03 \pm 1,96 e 20,45 \pm 0,33% respectivamente. De acordo com resultados da capacidade antioxidante na remoção do radical DPPH, o valor de CE₅₀ foi de 0,55 nM com intervalo de confiança de 95% de 0,50 a 0,60 HM (Figura 7).

Figura 7. Capacidade antioxidante do BCF na inibição do radical DPPH•, em diferentes concentrações.

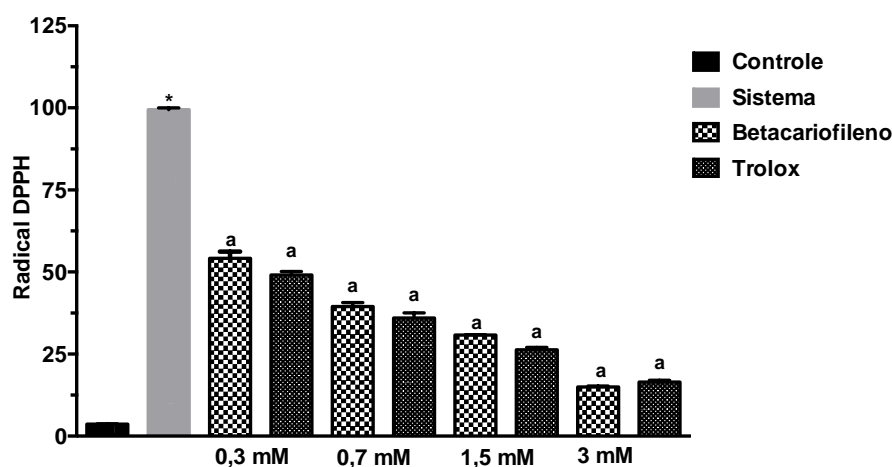


Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ versus controle (*Tween* 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (solução de radical DPPH•).

Capacidade antioxidante do BCF por sequestro do radical ABTS^{•+}

O resultado antioxidante que corresponde à remoção do radical ABTS^{•+} pelo BCF, em diferentes concentrações, está representado na **Figura 8**. Os valores da capacidade antioxidante do composto, nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 e 3 Mm, foram respectivamente de $54,17 \pm 1,18$; $39,50 \pm 0,68$; $30,80 \pm 0,05$ e $14,98 \pm 0,16\%$. Como observado, reduziu, significativamente, ($p < 0,05$), o radical ABTS^{•+} em relação ao sistema. O Trolox, nas mesmas concentrações, apresentou capacidade antioxidante de $49,12 \pm 0,58$, $35,96 \pm 0,91$, $28,28 \pm 0,44$ e $16,47 \pm 0,31\%$, respectivamente. De acordo com os resultados da capacidade antioxidante de remoção do radical ABTS^{•+}, o valor de CE₅₀ foi de 0,39 HM com intervalo de confiança de 95%, variando de 0,33 a 0,45 HM.

Figura 8. Capacidade antioxidante do BCF em diferentes concentrações na inibição do radical ABTS^{•+}.

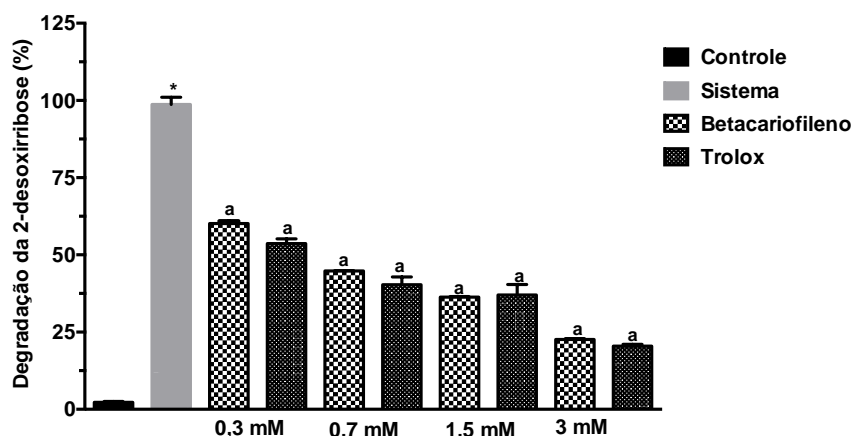


Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (solução de radical ABTS^{•+}).

Capacidade antioxidante do beta-cariofileno (BCF) por inibição de radicais hidroxila

No presente estudo, os radicais hidroxila foram gerados a partir da reação de Fenton e, como mostrado na **Figura 9**, o BCF conseguiu atuar na inibição da degradação da 2-desoxirribose por inibição de radical hidroxila em relação ao sistema ($p < 0,05$). Nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM, o composto apresentou capacidade de 60,13 \pm 0,43; 44,77 \pm 0,08; 38,10 \pm 0,11 e 22,63 \pm 0,14%, respectivamente. O Trolox demonstrou capacidade antioxidante também inibindo a degradação de 2-deoxirribose em 53,67 \pm 0,88, 40,33 \pm 1,45, 37,01 \pm 1,96 e 20,45 \pm 0,33%, respectivamente. De acordo com os resultados da inibição da degradação da 2-deoxirribose, o valor de CE₅₀ foi de 0,17 HM com a confiança de 95% intervalo variando de 0,30 a 0,52 HM.

Figura 9. Capacidade antioxidante do BCF em diferentes concentrações na remoção de radicais hidroxilas.



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ versus controle (*Tween* 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (Radical Hidroxila).

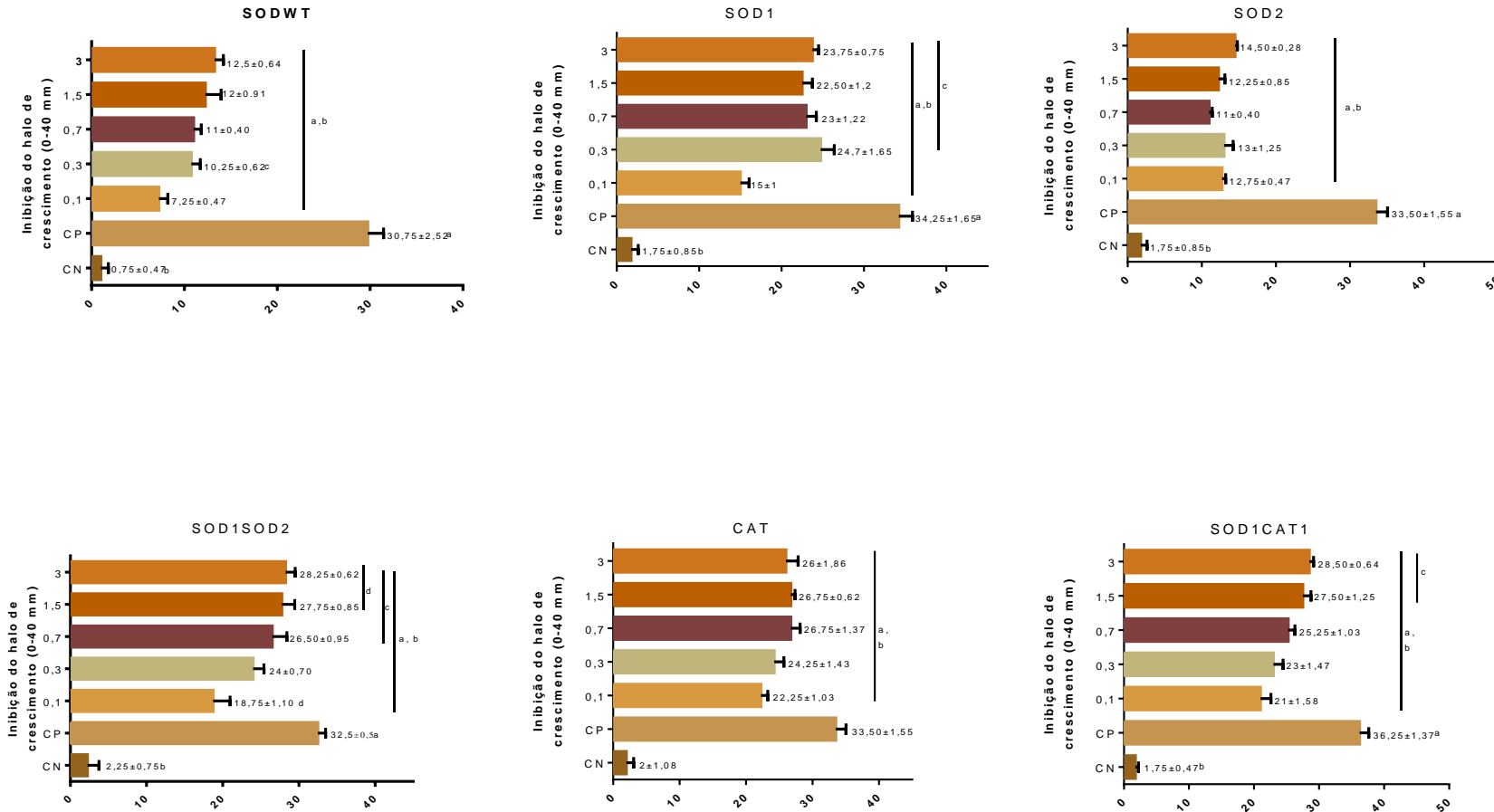
Efeito do potencial oxidante/antioxidante do BCF frente aos danos oxidativos induzidos por H_2O_2 em linhagens de *S. cerevisiae*.

O BCF tem efeitos preventivos de danos oxidativos do H_2O_2 em linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e mutadas. Durante o pré-tratamento (**Figura 10**), foi verificado que a menor concentração do BCF apresentou halos de inibição entre $7,25 \pm 0,47$ e $22,25 \pm 1,03$ mm em todas linhagens avaliadas; enquanto que, no CP, foram mensurados valores de $30,75 \pm 2,52$ a $36,25 \pm 1,37$ mm, demonstrando efeitos modulatórios das linhagens expostas ao BCF. Observou-se, ainda, a mesma resposta na concentração mais alta (3 mM), onde mesmo sendo observados halos de inibição maiores, entre $12,5 \pm 0,64$ e $28,50 \pm 0,64$, ocorreu redução da oxidação promovida pelo H_2O_2 , indicando que, no pré-tratamento, as concentrações testadas apresentaram possível ação preventiva ao agente estressor.

No pós-tratamento, o BCF demonstrou efeitos no reparo de DNA frente aos danos oxidativos do H_2O_2 , indicado pela diminuição do halo inibição. Observou-se que a menor concentração do BCF apresentou halos de inibição entre $10,75 \pm 0,85$ e $29,35 \pm 0,47$ mm nas linhagens avaliadas; enquanto que, no

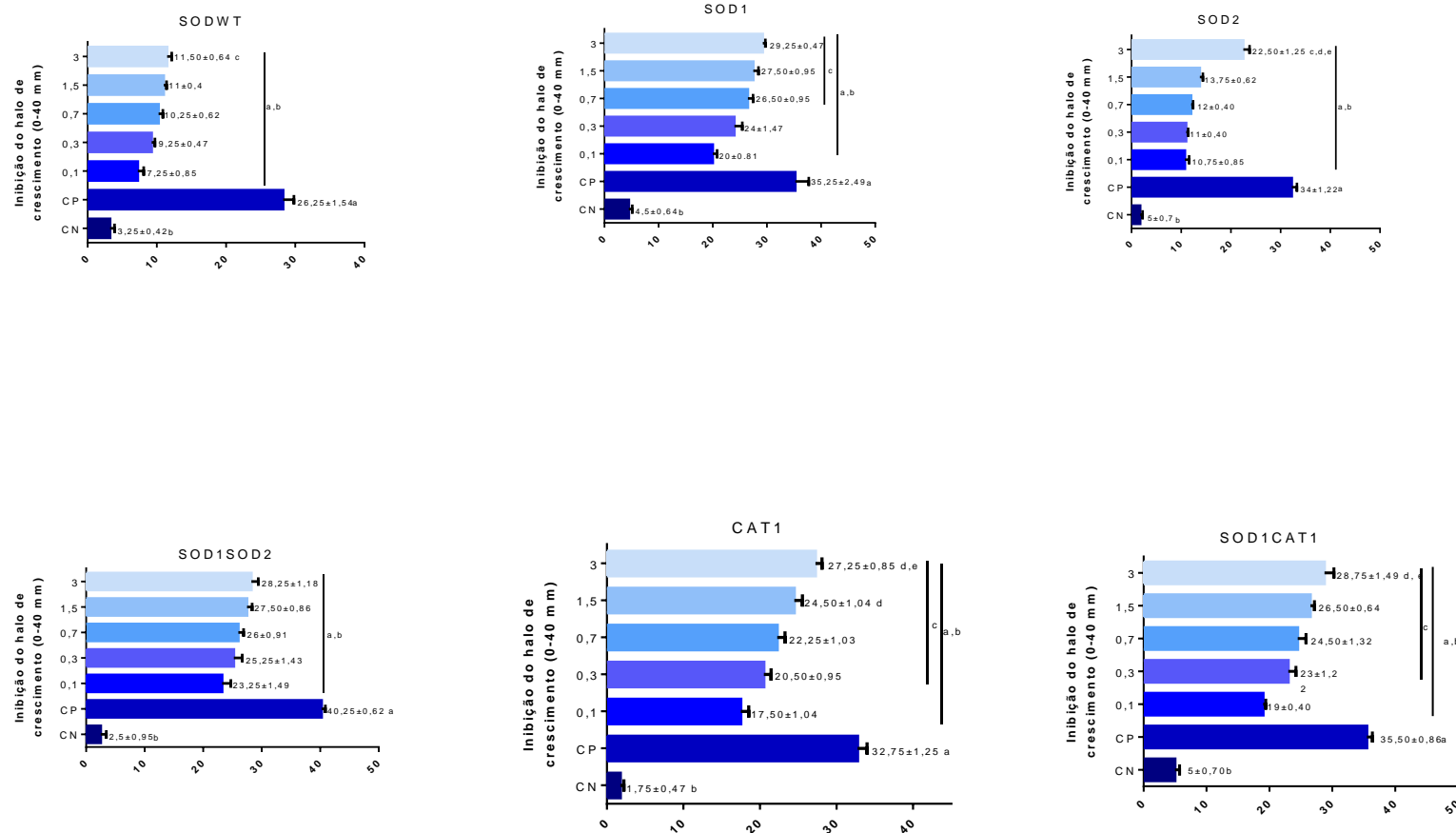
CP, foram mensurados valores de $26,44 \pm 1,54$ a $40,25 \pm 0,62$ mm, sugerindo efeitos reparador das linhagens expostas ao BCF. A mesma resposta também foi observada na concentração mais alta (3 mM), mesmo sendo visualizados halos de inibição maiores, entre $11,50 \pm 0,62$ e $29,25 \pm 0,47$ (**Figura 11**). O BCF, em co-tratamento com o H_2O_2 , modulou a ação oxidativa do agente estressor de forma significativa ($p < 0,05$) (**Figura 12**). A menor concentração do BCF (0,1 mM) indicou, em todas as linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas, o melhor efeito antioxidante quando relacionada com as maiores concentrações (0,7mM, 1,5mM e 3mM) em linhagens mutadas (*Sod1* Δ ; *Sod1* Δ /*SOD2* Δ ; *Sod1* Δ /*Cat1* Δ) e proficiente (*SOD* WT), demonstrando, assim, capacidade em reverter os danos promovidos pelo H_2O_2 .

Figura 10. Efeito do BCF aos danos induzidos pelo H_2O_2 em linhagens de *S. cerevisiae*, ($n = 4$, leituras/concentração) durante o pré-tratamento.



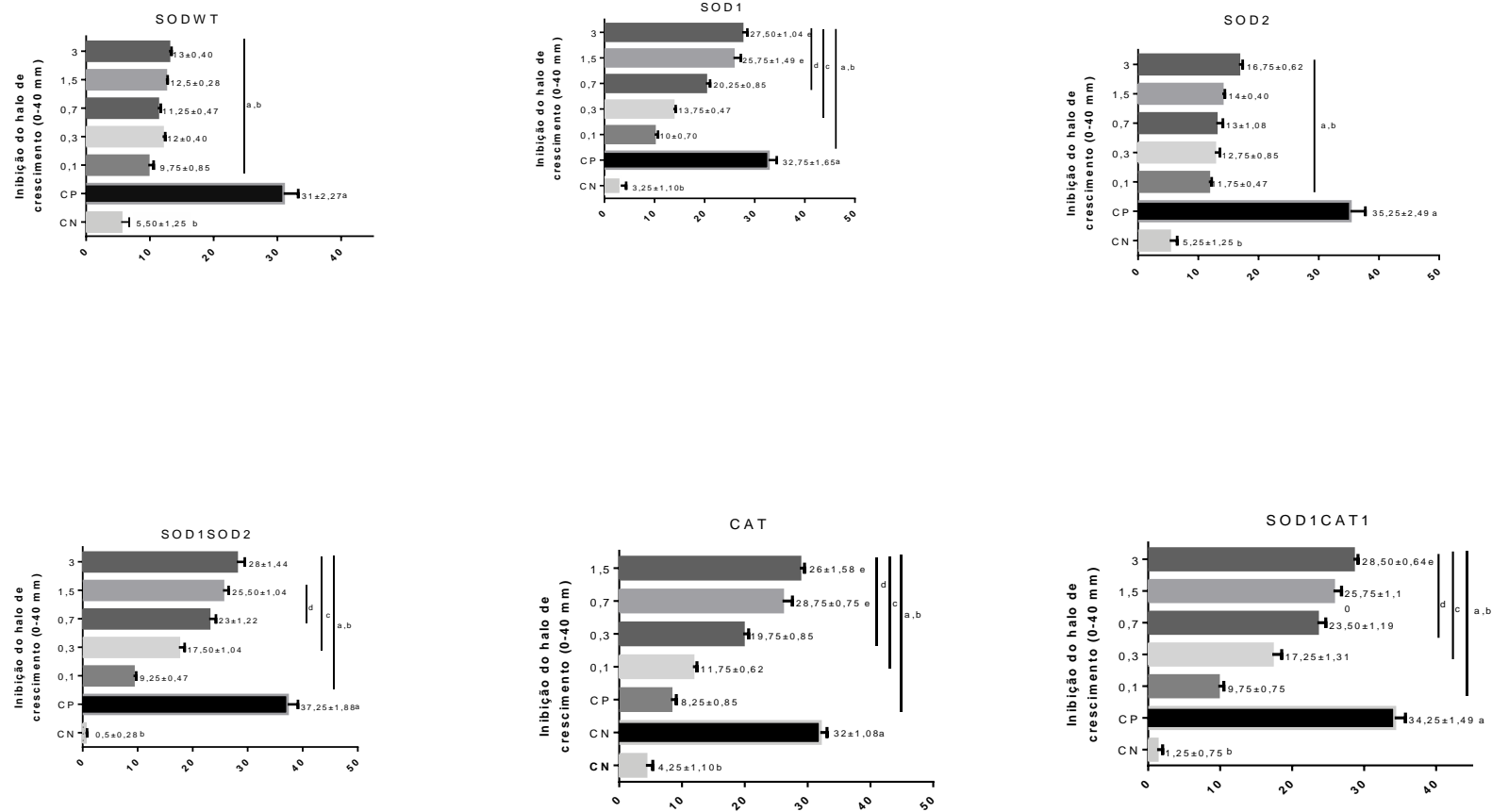
$p < 0,05$ significativamente diferente entre médias \pm erro padrão (SEM) de concentrações e controles no mesmo período de tempo, quando comparado à ^asalina; ^b H_2O_2 ; ^c0,1mM; ^d0,3mM; ^e0,7mM; ^f1,5mM; ^g3mM. ANOVA seguido de *one way, post test Tukey* (múltiplas comparações).

Figura 11. Efeito do BCF aos danos induzidos pelo H₂O₂ em linhagens de *S. cerevisiae*, (n = 4, leituras/concentração) durante o pós-tratamento.



p < 0,05 significativamente diferente entre médias ± erro padrão (SEM) de concentrações e controles no mesmo período de tempo, quando comparado à ^asalina; ^bH₂O₂; ^c0,1mM; ^d0,3mM; ^e0,7mM; ^f1,5mM; ^g3mM. ANOVA seguido de *one way, post test Tukey* (múltiplas comparações).

Figura 12. Efeito do BCF aos danos induzidos pelo H₂O₂ em linhagens de *S. cerevisiae*, (n = 4, leituras/concentração) durante o co-tratamento.



p < 0,05 significativamente diferente entre médias ± erro padrão (SEM) de concentrações e controles no mesmo período de tempo, quando comparado à ^asalina; ^bH₂O₂; ^cmM; ^d0,3mM; ^e0,7mM; ^f1,5mM; ^g3mM. ANOVA seguido de *one way, post test Tukey* (múltiplas comparações).

Correlações estatísticas de *Pearson* entre os parâmetros avaliados na atividade ansiolítica com os testes antioxidantes *in vitro* e em *S. cerevisiae*

Os efeitos ansiolíticos do BCF foram, estatisticamente, associados com as atividades antioxidantes observadas *in vitro* e em *S. cerevisiae*. Correlações estatísticas foram encontradas entre o índice de ansiedade e captura dos radicais •ABTS, •DPPH e •OH. Esses dados foram compatíveis com os observados em leveduras mutadas para superóxido dismutase citoplasmática (Sod1Δ) e mitocondrial (Sod 2Δ), bem como para a linhagem duplo mutante Sod1Sod2 frente aos danos oxidativos do H₂O₂. A atividade de esconder esfera foi correlacionada, positivamente, com a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (*S. cerevisiae*) de prevenção de danos oxidativos do H₂O₂. Resultados semelhantes também foram observados na distância percorrida com atividade antioxidante do beta-cariofileno em SOWT e Sod1. Entretanto, *in vitro*, as correlações de captura de radicais e efeitos antioxidantes para a captura de radicais •ABTS, •DPPH e •OH foram negativas (**Tabela 3**).

Tabela 3. Correlações de *Pearson* entre os dados obtidos nos testes comportamentais com os dados dos testes antioxidantes do beta-cariofileno

Parâmetros comportamentais	Teste <i>in vitro</i>			Teste em <i>S. cerevisiae</i>	
	•DPPH	•ABTS	•OH		
Índice de ansiedade	0,721** (p<0,008)	0,730** (p<0,007)	0,731** (p<0,009)	Sod1Δ pré-tratamento Sod1Δ co-tratamento Sod2Δ co-tratamento Sod1ΔSod2Δ co-tratamento	0,676* (p<0,016) 0,669* (p<0,017) 0,778** (p<0,001) 0,516* (p<0,086)
Esconder esferas	0,876** (p<0,000)	0,900** (p<0,000)	0,991** (p<0,000)	Sod2Δ pré-tratamento Sod1Δ pré-tratamento	0,682* (p<0,014) 0,847** (p<0,001)
Número de entradas	-0,803** (p<0,002)	- 0,794** (p<0,002)	- 0,803** (p<0,002)	NS	
Tempo de permanência	-0,736** (p<0,007)	- 0,780** (p<0,006)	- 0,736** (p<0,000)	NS	
Distância percorrida	- 0,696* (p<0,012)	- 0,697* (p<0,012)	- 0,696* (p<0,012)	Sod1Δ co-tratamento SODWT co-tratamento	0,760** (P<0,004) 0,830** (P<0,045)

**P<0,01; *P<0,05. NS – Correlações estatísticas não significantes

DISCUSSÃO

As pesquisas com compostos de origem vegetal vêm mostrando diversas propriedades terapêuticas, baixa toxicidade (MACIEL *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2019). Na avaliação comportamental/toxicológica, como apresentado nos resultados, o BCF, em camundongos, não induziu alterações comportamentais (locomotora), mas apresentou efeitos ansiolíticos nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg, como observado com a aplicação dos testes *Rota Rod*, Labirinto em Cruz Elevado, Claro-Escuro e teste de Esconder Esferas, que são usados em triagem de substâncias que atuam no SNC (CHIOCA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2019). Atividades ansiolíticas vêm sendo relatadas para o BCF em modelos animais (SOUSA *et al.*, 2015; SOOSA *et al.*, 2017).

Cabe enfatizar, a importância da atividade ansiolítica nas doses testadas, pois existem relatos de que o BCF tem atividade ansiolítica em doses maiores (100, 150 e 200 mg/kg (i.p.) em modelo de ansiedade similar ao usado neste estudo (GALDINO *et al.*, 2012; BAHÍ, 2014; RABBANI *et al.*, 2015). Efeitos ansiolíticos para o BCF também foram observados nas duas maiores doses testadas (25 e 50 mg/kg), pelo aumento número de entradas nos braços abertos em relação ao controle positivo. De forma similar, o DZP também aumentou o número de entradas nos braços abertos, o que demonstra que o BCF tem efeito ansiolítico, a exemplo dos compostos benzodiazepínicos.

Cabe relatar que a frequência de camundongos nos braços abertos é o maior índice de ansiedade no modelo de labirinto em cruz elevado, uma vez que a área aberta é extremamente aversiva para roedores (ALMEIDA *et al.*, 2012; DOUKKALI *et al.*, 2016). A ansiedade é gerada pelo conflito entre o desejo de explorar e se retirar do ambiente novo e iluminado (LIMA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014), como observado no estudo. Os efeitos ansiolíticos do BCF, relatados anteriormente, também foram observados nas duas maiores doses testadas pelo aumento do tempo de permanência do animais no compartimento claro. No entanto, apenas na dose de 75 mg/kg estes efeitos são melhores que o DZP.

Efeitos ansiolíticos do BCF também foram evidenciados no estudo, em todas as doses testadas, pela redução do número de esferas enterradas de forma dose-dependente, corroborando os comportamentos ansiolíticos observados nos outros testes. O teste de esconder esferas também foi utilizado para confirmar o efeito ansiolítico observado no Labirinto em Cruz Elevado e teste de Claro Escuro (CRYAN;

SWEENEY, 2011), pois esse modelo é utilizado para inferir um comportamento compulsivo e ansioso, sendo largamente utilizado como um modelo de desordem obsessiva-compulsiva (KINSEY *et al.*, 2011; TAYLOR; LERCH; CHOURBAJI. 2017).

As análises de citotoxicidade se constituem como de suma importância para a seletividade de atividades farmacêuticas (COS *et al.*, 2006). Como discutido, o BCF apresenta efeitos ansiolíticos em diversos testes comportamentais, como também não apresentou efeitos toxicológicos por alterações comportamentais. Em outros ensaios, com *A. salina*, o BCF teve efeito tóxico frente aos náuplios apenas em altas concentrações, a partir de 3 mM. No mesmo teste, existem relatos de não toxicidade do BCF oriundo do óleo essencial do *Croton argyrophylloides*, que contém 10% de BCF em sua composição (FARIAS, 2006).

O BCF apresenta diversas atividades farmacológicas, incluindo as anti-inflamatórias e antiansiedade, mas os seus mecanismos de ação neuroprotetora ainda não são conclusivos (GALDINO *et al.*, 2012; BAHÍ *et al.*, 2014). Entretanto, alguns mecanismos de ação vêm sendo propostos para a ação ansiolítica do BCF. Estudos apontam que, na dose de 50 mg/kg (v.o), o BCF tem ação sobre os receptores endocanabinoides CB2Rs (BAHÍ, 2014). A morte celular necrótica é um marcador de isquemia e de inflamações. E o BCF em 0,2, 1, 5 e 2,5 mM, por mecanismos ainda desconhecidos, atua em funções neuroprotetoras por suas atividades anti-inflamatórias. Efeitos também observados em camundongos nas doses de 8, 24 e 72 mg/ Kg por mecanismos associados à expressão de proteínas MLKL, interação com proteínas quinases 1 e quinases 3 e por decrescer os níveis de receptores 4 (TLR4), interleucinas (IL-1b) e fatores de necrose TNF- α (YANG *et al.*, 2017).

Entretanto, existem relatos de que a ansiedade está associada ao estresse oxidativo (ALMEIDA *et al.*, 2014; MONICZEWSKI *et al.*, 2015), devido à elevada demanda metabólica no cérebro relacionada à quantidade de oxigênio exigida é maior e com grande quantidade de radicais livres (DIXON; STOCKWELL, 2014; KIM *et al.*, 2015).

Assim, compostos antioxidantes podem contribuir para diminuição do estresse oxidativo que está envolvido na patogênese de diversas patologias como a epilepsia (COSTA *et al.*, 2012), doença de *Alzheimer* (ADLER *et al.*, 2014), depressão (LOPRESTI *et al.*, 2014) e ansiedade (ALMEIDA *et al.*, 2014). O estresse oxidativo afeta funções celulares essenciais para o bom funcionamento cerebral causando disfunção mitocondrial, dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico), modificação da

sinalização neuronal e a inibição da neurogênese (HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010; PAE *et al.*, 2013; FRANCO; NAVARRO; PINILLA, 2019).

No presente estudo, sobre os efeitos antioxidantes do BCF, inicialmente em testes *in vitro*, frente à captura de radicais livres DPPH, ABTS^{•+} e radical hidroxila indicam que o composto BCF apresenta efeitos antioxidantes similar ao Trolox. Teve capacidade de sequestrar e/ou inibir o radical DPPH, com capacidade de formar DPPH₂ (OLIVEIRA, 2015; RAHMAN *et al.*, 2015). Efeitos antioxidantes foram atribuídos ao BCF por mecanismos de captura de radicais livres, bem como por sua interferência na expressão de GSH (NEMMAR *et al.*, 2015). Esses efeitos também foram relatados para o BCF, como componente majoritário do *Marrubium parviflorum subsp. oligodon* nas concentrações de 0,4; 1,0 e 2,0 mg/ml (SARIKURKCU *et al.*, 2018). Como apresentado nos resultados, os efeitos ansiolíticos foram positivamente correlacionados (correlação estatística de *Pearson*) com os dados dos testes antioxidantes.

Os metabólitos secundários de produtos naturais, bem como carotenoides e ácido ascórbico, têm demonstrado exibir atividades antioxidantes (MADHURI; PANDEY, 2009). Estudos de efeitos protetivos, antioxidantes e de reparo de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio indicaram que o BCF, nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM, em linhagens de *S. cerevisiae* apresentou efeitos inibitórios dos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em linhagens proficientes e mutadas em defesas antioxidantes citoplasmáticas e mitocondrial. Existem relatos de que o BCF, nas doses de 25 e 50 mg /kg/dia, inibe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células de camundongos diminuindo os níveis de citocinas e, com isso, diminuindo o processo oxidativo em células do Sistema Nervoso Central (FONTES *et al.*, 2017). O BCF exibe atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, bem como efeitos protetivos frente a danos induzidos por químicos, protegendo danos ao cérebro (CALEJA *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; HAMMAD *et al.*, 2018).

O BCF tem efeitos antioxidantes e antiansiedade via ativação de Nrf2, que por sua vez é dependente da ativação dos receptores endocanabinoides (ASSIS *et al.*, 2014), por reduzir a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), restaurando enzimas antioxidantes e inibindo a peroxidação lipídica e a depleção de glutathiona em ratos *Wistar* (OIHA, 2016; JAVED *et al.*, 2016) e a produção de óxido nítrico em células microgliais BV2 (HU *et al.*, 2017). A produção excessiva de radicais livres é conhecida por induzir toxicidade neuronal em neurônios corticais e estriados (ISLAM *et al.*, 2016).

O NO aumenta o efeito da ciclooxigenase (COX) levando à formação de ácido araquidônico e prostaglandina, que por sua vez pode desencadear a inflamação (KOUSAI *et al.*, 2004) e também a ansiedade (MACKENZIE *et al.*, 2011).

Assim, a função dos antioxidantes é neutralizar o excesso de radicais livres, protegendo as células contra os efeitos tóxicos e, conseqüentemente, prevenir patologias, principalmente as relacionadas com o SNC. Com isso, os antioxidantes são cada vez mais utilizados na prevenção e também no tratamento clínico de doenças para reparar os danos causados por esses radicais livres (RAO *et al.*, 2011; PISOSCHI; POP, 2015). O estudo em foco aponta o BCF como um composto promissor para terapia de ansiedade, como observado em modelo animal, bem como por suas correlações com atividades antioxidantes na captura de radicais livres e proteção e inibição dos efeitos oxidativos de espécies reativas de oxigênio, a exemplo do peróxido de hidrogênio, como observado em *S. cerevisiae*.

CONCLUSÃO

O BCF, nas doses testadas, apresentou efeitos ansiolíticos em camundongos observados em diversos testes comportamentais. Não foram observados efeitos toxicológicos por alterações comportamentais. As concentrações testadas em náupilos de *A. salina* também não apresentaram toxicidade. Estudos de atividades antioxidantes *in vitro* indicaram que o BCF apresenta efeitos na captura de radicais livres. E, em *S. cerevisiae*, pode prevenir, modular danos oxidativos e atuar no reparo dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. Os efeitos de antiansiedade foram estatisticamente correlacionados com os efeitos antioxidantes, sugerindo que o BCF, provavelmente, pode atuar também por mecanismos que minimizem o estresse oxidativo implicado na ansiedade. Entretanto, estudos adicionais ainda devem ser feitos para o uso do BCF em formulações farmacêuticas, considerando que o BCF é um composto promissor para a terapia da ansiedade, como apontado no presente estudo.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.L.; YARCHOAN, M.; HWANG, H.M.; LOUNEVA, N.; BLAIR, J.A.; PALM,

R.; SMITH, M.A.; LEE, H.; ARNOLD, S.E.; CASADESUS, G. Neuroprotective effects of the amylin analogue pramlintide on Alzheimer's disease pathogenesis and cognition. **Neurobiology of Aging**, v. 35, p. 793-801, 2014.

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; SILVA, A.O.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 118, p. 69-78, 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, p. 56-62, 2012.

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.

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

BASHA, R.H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta Histochemica**, v. 116, p. 1469-1479, 2014.

CACERES, L.G.; CID, M.P.; URAN, S.L.; ZULBILETE, M.A.Z.; SALVATIERRA, N.A.; GUELMANA, L.R. Pharmacological alterations that could underlie radiation-induced changes in associative memory and anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 111, p. 37-43, 2013.

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

CARLINI, E.A., BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. A New Geraniol Chemotype of *Ocimum gratissimum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, p. 231-234, 2011.

CHEN, H.S.; GU, L.J.; YANG, Y, X.; GUO, J.Y. GABA and 5-HT Systems Are Involved in the Anxiolytic Effect of Gan-Mai-Da-Zao Decoction. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1-11, 2019.

CHIOCA, L.R.; ANTUNES, V.D.C.; FERRO, M.M.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. **Life Science**, v. 92, p. 971-975, 2013.

CHO S.M.; KIMA, J.H.; KIMB, S.H.; PARKA, S.Y.; KIMA, J.C.; CHOIA I.G. A comparative study on the fuel properties of biodiesel from woody essential oil depending on terpene composition. **Fuel**, v. 218, p. 375–384, 2018.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290–302, 2006.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neuroscience Letters*, v. 523, p. 115-118, 2012.

COSTA, J.P.; OLIVEIRA, G.A.L.; ALMEIDA, A.A.C.; ISLAM, M.T.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiety action drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1129-1161, 2011.

DAHAM, S.S.; TABANA, Y.M.; IQBAL, M.A.; AHAMED, M.B.; EZZAT, M.O.; MAJID, A.S.; MAJID, A.M. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, p. 11808-11829, 2015.

DE OLIVEIRA, D.R.; DA SILVA, D.M.; FLORENTINO, I.F.; DE BRITO, A.F.; FAJEMIROYE, J.O.; DA SILVA, D.P.B.; DA ROCHA, F.F.; COSTA, E.A.; GALDINO, P.M. Monoamine Involvement in the Antidepressant-Like Effect of β -Caryophyllene. **CNS & Neurological Disorders**, v. 17, p. 309-320, 2018.

DIXON, S.J.; STOCKWELL, B.R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 9-17, 2014.

DOUKKALI, Z.; KAMAL, R.; EL JEMELI, M.; NADJMOUDDINE, M.; ZELLOU, A.; CHERRAH, Y.; ALAOUI, K.; TAGHZOUTI, K. Anti-Anxiety Effects of *Mercurialis annua* Aqueous Extract in the Elevated Plus Maze Test. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v.2, P.1-11, 2016.

FARIAS, M.S.Q. **Efeitos do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* muell. Arg. e do β -cariofileno sobre a contratilidade deanéis de aorta de ratos.** Dissertação (mestrado em ciências fisiológica) - Universidade Estadual do Ceara, Fortaleza- CE, 2006.

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.

FRANCO, R.; NAVARRO, G.; PINILLA, E.M. Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System. **Antioxidants**, v.1, p. 1-10, 2019.

FU, Y.; LUO, J.; QIN, J.; YANG, M. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.1, p.1-10. 2019.

GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M. V.; FLORENTINO, I.F.; LINO, R.C.; FAJEMIROYE, J.O.; CHAIBUB, B.A.; DE PAULA, J.R.; DE LIMA, T.C.; 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 & Biological Psychiatry**, v. 38, p. 276–284, 2012.

GERTSCH, J.; LEONT, M.; RADUNER, S.; RACZ, L.; CHEN, J.Z.; XIE, Z.; ALTMANN, K.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. β -caryophyllene is a dietary cannabinoid, **PNAS**, v.105, p. 9099–9104, 2008.

HAMMAD, F.T.; OJHA, S.; AZIMULLAH, S.; LUBBAD, L. Does β -caryophyllene protect against renal dysfunction following ischemia-reperfusion injury in the rat? **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 10, n. 6, p. 163-171, 2018.

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.

ISLAM, M.T.; ALI, E.S.; SOUSA, J.M.C.; SANTOS, J.V.O.; PAZ, M.F.C.J.; LIMA, R.M.T.; SOUSA, L.R.; ALENCAR, M.V.O.B.; CAVALCANTE, A.A.C.M. Physiological contributions of reactive oxygen species. **Photon eBooks**. Ed. I, Pages 1–13. UBN: 015-A94510112030, 2016.

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, p. 1-14, 2016.

KIM, G.A.; KIM, J.E.; RHIE, S.J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, V. 24, P. 325-340, 2015.

KINSEY, S.G.; O'NEAL, S.T.; LONG, J.Z.; CRAVATT, B.F.; LICHTMAN, A.H. Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, p. 21-27, 2011.

KOUSAI, A.; MIZUNO, R.; IKOMI, F.; OHHASHI, T. ATP inhibits pump activity of lymph vessels *via* adenosine A1 receptor-mediated involvement of NO- and ATP-sensitive K⁺ channels. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. H2585–2597, 2004.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1643-1647, 2007.

LIMA, N.G.P.B.; SOUSA, D.P.; PIMENTA, F.C.F.; ALVES, M.F.; SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; CARDOSO, R.B.; MORAIS, L.C.S.L.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (*R*)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 450-454, 2013.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LOPRESTI, A.L.; MAKER, G.L.; HOOD, S.D.; DRUMMOND, P.D. A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 48, p. 102-111, 2014.

LOZANO, A.C.C.; PINA, L.G.; URIBE, S.L.; MEJIA, E.G. El orégano: propiedades y actividad biológica de sus componentes. **Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, v. 54, p. 100-111, 2004.

LUCENA, C.F. Antioxidantes em exercícios aeróbios em exercícios aeróbi em exercícios aeróbios: papel do os: papel do selênio e glutatona peroxidase. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 9, p. 54-61, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J.R.; GRYNBER, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MACKENZIE, C.S.; REYNOLDS, K.; CHOU, K.L.; PAGURA, J.; SAREEN, J. Prevalence and correlates of generalized anxiety disorder in a national sample of older adults. **Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 19, p. 305-315, 2011.

MADHURI, S. Antimicrobial activity of Citrus sinensis and Citrus aurantium peel extracts. **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation**, v. 3, p. 366-368, 2014.

MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v.6, p. 95-12, 2012.

MENG, D.; ZHANG, P.; LI, S.; HO, C. T.; ZHAO, H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 36-44, 2017.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 45, p.31-34,1982.

MONICZEWSKI, A.; GAWLIK, M.; SMAGA, I.; NIEDZIELSKA, E.; KRZEK, J.; PRZEGALINSKI, E.; PERA, J.; FILIP, M, Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 560-568, 2015.

NEMMAR, A.; AL HEMEIRI, A.; AL HAMMADI, N.; YUVARAJU, P.; BEEGAM, S.; YASIN, J.; ELWASILA, M.; ALI, B.H.; ADEGHATE, E. Early pulmonary events of nose-only water pipe (shisha) smoking exposure in mice. **Physiology of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 173-175, 2015.

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 Cell Biochemistry**, v. 418, p. 59–70, 2016.

OLIVEIRA, G.L.S; Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.17, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES JÚNIOR, A.L.; SOUZA, A.A.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 136-147, 2014.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; PICCOLI, R.H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de Cymbopogon. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.13, p.8-16, 2011.

ORAV, A.; STULOVA, I.; KAILAS, T.; MÜÜRISEPP M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 2582-2586, 2004.

PAE, C.U.; LEE, S.Y.; LEE, S.J.; HAN, C.; PATKAR, A.; MASAND, P. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. **Progress in NeuroPsychopharmacology and Bioliological Psychiatry**, v.46, p. 224-235, 2013.

PIRES, L.F.; COSTA, L.M.; SILVA, O.A.; ALMEIDA, A.A.C.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POLING, A.; CLEARY, J.; MONAGHAN, M. Burying by rats in response to aversive and non-aversive stimuli. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 35, p. 31-44, 1981.

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

RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.B.; BISWAS, M.; KHURSHID, A.H. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. **BMC Research Notes**, v.1, p. 1-9, 2015.

RAOL, Y.H.; LYNCH, D.R.; BROOKS-KAYAL, A.R. Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 2, p. 254-260, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVENÚ, D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1770-8

RUMIÀ, J.; MARMOL, F.; SANCHEZ, J.; GIMÉNEZ-CROUSEILLES, J.; CARRENO, M.; BARGALLÓ, N.; BOGET, T.; PINTOR, L.; SETOAIN, X.; DONAIRE, A.; SAEZ, G.T.; RIBALTA, T.; FERRER, E.; PUIG-PARELLADA, P. Oxidative stress markers in the neocortex of drug-resistant epilepsy patients submitted to epilepsy surgery. **Epilepsy Research**, v. 107, p. 75-81, 2013.

SARIKURKCU, C.; OZER, M.S.; CALLI, N.; DJORDJEVIĆ, J.P. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Marrubium parviflorum* subsp. *Oligodon*. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p.209-213, 2018.

SHATILLO, A.; KOROLEVA, K.; GINIATULLINA, R.; NAUMENKO, N.; SLASTNIKOVA, A.A.; ALIEV, R.R.; BART, G.; ATALAY, M.; GU, G.; KHAZIPOV, R.; DAVLETOV, B.; GROHN, O.; GINIATULLIN, R. Cortical spreading depression induces oxidative stress in the trigeminal nociceptive system. **Neuroscience**, v. 253, p. 341-349, 2013.

SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n.2, p. 300-305, 2011.
SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CYEWSKI, R.; LERIN, L.; ROTAV, I.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHE, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589-594, 2010.

SODERGREN, E. Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement. Acta Universitatis Upsaliensis. **Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine**, v.949,p.1-78, 2000.

SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233–2252, 2011.

TAI, W.; YEA, X.; BAO, X.; ZHAO, B.; WANG, X.; ZHANG, D. Inhibition of Src tyrosine kinase activity by squamosamide derivative FLZ attenuates neuroinflammation in both *in vivo* and *in vitro* Parkinson's disease models. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 201-212, 2013.

TAYLOR, G.T.; SANDRA LERCH, S.; CHOURBAJI, S. Marble burying as compulsive behaviors in male and female mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v.11, p. 254–260, 2017.

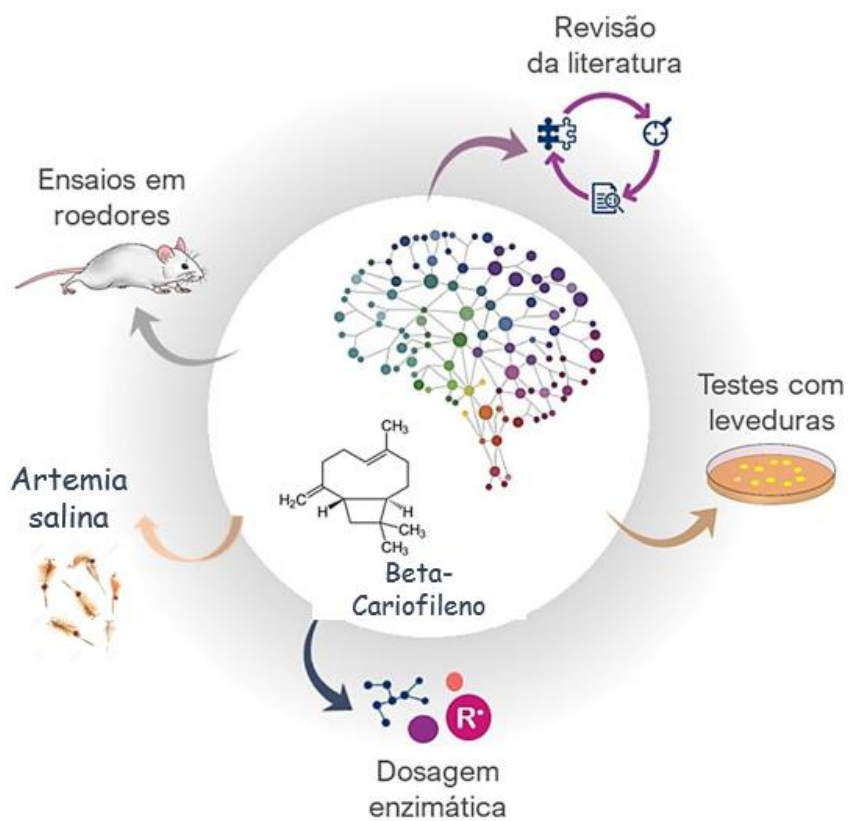
TCHEKALAROVA, J.; NENCHOVSKA, Z.; ATANASOVA, D.; LAZAROV, N.; KORTENSKA, L.; STEFANOVA, M.; ALOVA, L.; ATANASOV, A.M. Long-term consequences of prophylactic treatment with agomelatine on depressive-like behavior and neurobiological abnormalities in pinealectomized rats. **Behavior Brain**, v. 302, p. 11-28, 2016.

YANG, M.; LV, Y.; TIAN, X.; LOU, J.; AN, R.; ZHANG, Q.; LI, M.; XU, L.; DONG, Z. Neuroprotective Effect of b-Caryophyllene on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of Necroptotic Neuronal Death and Inflammation: In Vivo and in Vitro. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. 583, 2017.

ZHAI, H.; LIU, H.; WANG, S.; WU, J.; KLUENTER, A.M. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 179-186, 2018.

ZHENG, X.; SUN, T.; WANG, X. Activation of type 2 cannabinoid receptors (CB2R) promotes fatty acid oxidation through the SIRT1/PGC-1alpha pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 436, p. 377-381, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

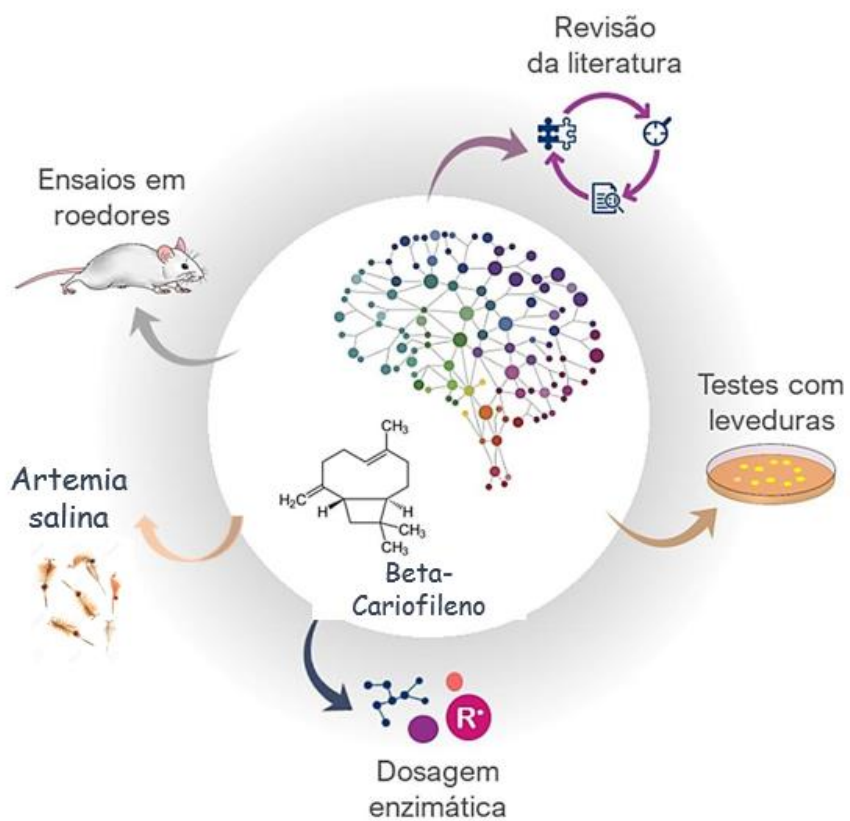


5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos psicofarmacológicos do beta-cariofileno sobre o sistema nervoso central, os resultados possibilitaram as seguintes inferências:

- ▶ Com a revisão bibliográfica sob aplicações farmacológicas sobre o SNC foi possível verificar que este sesquiterpeno exibe uma grande importância econômica e mercadológica que pode ser explorada por diversos ramos industriais.
- ▶ O sesquiterpeno beta-cariofileno exerce um efeito anticonvulsivante após a administração aguda em camundongos e este efeito foi produzido pela diminuição das convulsões tônico-clônicas no teste de eletrochoque, bem como diminuiu a neurotoxicidade induzida por ácido caínico.
- ▶ Na investigação da atividade *ex vivo* do BCF em hipocampo de camundongos, o composto foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, sugerindo um papel antioxidante *ex vivo*.
- ▶ O BCF melhorou a memória aversiva no teste de Morris, demonstrando que os efeitos anticonvulsivos não provocam prejuízo na memória.
- ▶ O BCF não induziu efeitos toxicológicos por alterações comportamentais, bem como, nas concentrações testadas em náupilos de *A. salina* também não apresentaram toxicidade.
- ▶ O BCF apresentou atividade ansiolítica não prejudicando seu comportamento exploratório no teste campo aberto, bem como não teve alteração na coordenação motora.
- ▶ O beta-cariofileno foi capaz de inibir significativamente os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} e hidroxila em todas as concentrações testadas assim como, em *S. cerevisiae*, pode prevenir, modular danos oxidativos e atuar no reparo dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio

ANEXOS



ANEXO A: Carta de aprovação do Comitê de ética em experimentação com animais da Universidade Federal do Piauí.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

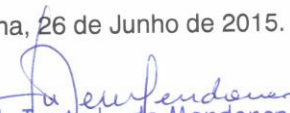


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Bioprospecção das vias opióide, GABAérgica e adrenérgica na modulação da atividade antiepiléptica de um complexo de inclusão obtido a partir de um sesquiterpeno**", protocolo nº **008/15**, sob a responsabilidade de **RIVELILSON MENDES DE FREITAS**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 26/06/2015.

Vigência do Projeto	Agosto/ 2015 à Abril/ 2019
Espécie/ linhagem	Camundongo isogênico/ swiss
Nº de Animais	145
Peso/ Idade	25 a 30 g/ 2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCA/ UFPI

Teresina, 26 de Junho de 2015.


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

ANEXO B: Apresentação de trabalho





ANEXO C: Artigo publicado na Phytotherapy Research

Received: 7 February 2018 | Revised: 25 July 2018 | Accepted: 25 August 2018
 DOI: 10.1002/ptr.6199

REVIEW

WILEY

A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene

Keylla da Conceição Machado¹ | Muhammad Torequl Islam^{2,3}  | Eunüs S. Ali^{4,5} |
 Razina Rouf⁶ | Shaikh Jamal Uddin⁷ | Shrabanti Dev⁷ | Jamil A. Shilpi⁷ |
 Manik Chandra Shilpi⁸ | Hasan Mahmud Reza⁸ | Asish Kumar Das⁷ | Subrata Shaw⁹ |
 Mohammad S. Mubarak¹⁰ | Siddhartha Kumar Mishra¹¹  |
 Ana Amelia de Carvalho Melo-Cavalcante¹

¹Northwest Biotechnology Network (BNNOBIO), Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

²Department for Management of Science and Technology Development, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Pharmacy, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Department of Product Development, Gaco Pharmaceuticals Limited, Dhaka, Bangladesh

⁵Flinders University College of Medicine and Public Health, Bedford Park, 5042, Adelaide, Australia

⁶Department of Pharmacy, Life Science Faculty, Bangladesh Sheikh Mujibur Rahman Science and Technology University, Gopalganj, Bangladesh

⁷Pharmacy Discipline, Life Science School, Khulna University, Khulna, Bangladesh

⁸Department of Pharmaceutical Sciences, North South University, Dhaka, Bangladesh

⁹Broad Institute of MIT and Harvard, 415 Main Street, Cambridge, MA 02142, USA

¹⁰Department of Chemistry, University of Jordan, Amman, Jordan

¹¹Cancer Biology Laboratory, School of Biological Sciences (Zoology), Dr. Harbalingh Gour Central University, Sagar, India

Correspondence

Muhammad Torequl Islam, Department for Management of Science and Technology Development & Faculty of Pharmacy, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam. Email: muhammad.torequl.islam@tdtu.edu.vn

Present Address

Eunüs S. Ali, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Northwestern University Feinberg School of Medicine, 320 E Superior St, Chicago, Illinois 60611

Beta (β)-caryophyllene (BCAR) is a major sesquiterpene of various plant essential oils reported for several important pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, cardioprotective, hepatoprotective, gastroprotective, nephroprotective, antimicrobial, and immune-modulatory activity. Recent studies suggest that it also possesses neuroprotective effect. This study reviews published reports pertaining to the neuropharmacological activities of BCAR. Databases such as PubMed, Scopus, MedLine Plus, and Google Scholar with keywords "beta (β)-caryophyllene" and other neurological keywords were searched. Data were extracted by referring to articles with information about the dose or concentration/route of administration, test system, results and discussion, and proposed mechanism of action. A total of 545 research articles were recorded, and 41 experimental studies were included in this review, after application of exclusion criterion. Search results suggest that BCAR exhibits a protective role in a number of nervous system-related disorders including pain, anxiety, spasm, convulsion, depression, alcoholism, and Alzheimer's disease. Additionally, BCAR has local anesthetic-like activity, which could protect the nervous system from oxidative stress and inflammation and can act as an immunomodulatory agent. Most neurological activities of this natural product have been linked with the cannabinoid receptors (CBRs), especially the CB2R. This review suggests a possible application of BCAR as a neuroprotective agent.

KEYWORDS

anti-inflammatory, antioxidant, neuro-protection, phytocannabinoid

ANEXO D: Artigo publicado na Seizure



Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice

Jana Tchekalarova^{a,*}, Keylla da Conceição Machado^{b,c}, Antonio Luiz Gomes Júnior^{b,c}, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^d, Albena Momchilova^e, Rumjana Tzoneva^e

^a Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str. Bl. 20, Sofia, 1113, Bulgaria

^b Laboratory of Research in Behavioral Neurochemistry of the Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^c Laboratory of Research in Toxicological Genetics of the Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^d Program of Post-Graduation in Biotechnology (PPG-BIO) of the Federal University of Piauí, ZIP: 64046-050, Teresina, Brazil

^e Institute of Biophysics and Biomedical Engineering, BAS, Sofia, Bulgaria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2017

Received in revised form 19 February 2018

Accepted 9 March 2018

Keywords:

CB2 receptor agonist

MES test

oDTZ test

Kainic acid

Oxidative stress

Mice

ABSTRACT

Purpose: Activation of CB1 receptors, produces anticonvulsant effect accompanied by memory disturbance both in animal seizure tests and in patients with epilepsy. Few reports considered the role of CB2 receptor on seizure susceptibility and cognitive functions. The aim of the present study was to explore the effect of a selective CB2 receptor agonist (β -caryophyllene (BCP)) in models of seizures and cognition in mice.

Methods: Dose-dependent effects of BCP was studied in maximal electroshock seizure (MES) test, subcutaneous pentylentetrazole (scPTZ) test and Morris water maze test. Phenytoin and diazepam were used as reference drugs in seizure tests. The effect of sub-chronic treatment with BCP for 7 days (50 and 100 mg kg⁻¹) was assessed on status epilepticus (SE) induced by kainic acid (KA) model and oxidative stress through measurement of malondialdehyde (MDA) level in the hippocampus. The acute neurotoxicity was determined by a rotarod test.

Results: The BCP asserted a protection in the MES test at the lowest dose of 30 mg kg⁻¹ at the 4-h interval tested comparable to that of the referent drug phenytoin. The CB2 agonist was ineffective in the scPTZ test. The BCP displayed no neurotoxicity in the rotarod test. The BCP decreased the seizure scores in the KA-induced SE, which effect correlated with a diminished lipid peroxidation. The CB2 agonist asserted a dose-dependent decrease of latency to cross the target area during the three days of testing in the Morris water maze test.

Conclusion: Our results suggest that the CB2 receptor agonists might be clinically useful as an adjunct treatment against seizure spread and status epilepticus and concomitant oxidative stress, neurotoxicity and cognitive impairments.

© 2018 British Epilepsy Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a neurological disorder that is characterized by spontaneous seizures as well as learning and memory impairment as a comorbid risk factor. Treatment by antiepileptic drugs (AEDs) prevent seizures but in most cases their effectiveness against cognitive disturbance in patients with epilepsy is neglected and uncertain [1]. Current research in this field is focused on design and development of alternative therapeutic approaches that prevent epileptogenesis after status epilepticus (SE) and its deleterious consequences, including oxidative stress, neuronal

damages and resulting aggravation in cognitive functions. During the last decade, drugs with potential memory-enhancing effects are explored as adjuvant to anticonvulsant therapy for treatment of deleterious comorbid behavioral changes.

Accumulated experimental and clinical data support the suggestion that endocannabinoid system (ECS) represent a potential therapeutic tool for treatment of pathological conditions in neurodegenerative diseases including epilepsy, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, and Parkinson's disease [2,3]. Until recently, numerous studies have been focused on the role of CB1 receptors in the CNS and in this line it has been suggested that ECS has a role in brain excitability mostly by activation of CB1 receptors [4,5]. On the other hand, the role of CB2 receptors, which are mainly distributed in peripheral tissues and in particular in B lymphocytes, macrophages, mast cells, microglia and natural killer

* Corresponding author.

E-mail address: jana@bio.bas.bg (J. Tchekalarova).

ANEXO E: Submissão de artigo

Submission Confirmation

BETA-CARYOPHYLLENE IN ANIMAL MODELS: PERSPECTIVES FOR ANXIETY THERAPIES
Research Paper
Corresponding Author: Mrs. keylla machado

Dear Dr. machado,

Your submission entitled "BETA-CARYOPHYLLENE IN ANIMAL MODELS: PERSPECTIVES FOR ANXIETY THERAPIES" has been received for consideration in Neuroscience.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to EES for Neuroscience (<https://ees.elsevier.com/nsc/>) as an author.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Please be aware that Neuroscience offers the 3D visualization viewer for the neuroimaging data embedded in published online articles. Hence, we would like to encourage you to upload the neuroimaging data (in NIFTI format) as supplementary material with your manuscript to our online submission system during the article revision stage. More information can be found at: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>