



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS (PPGNSB)

JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GABAÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS NA
ATIVIDADE ANSIOLÍTICA-SÍMILE DO HIDROXICITRONELAL

João Pessoa-PB

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS (PPGPNSB)

JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GABAÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS NA
ATIVIDADE ANSIOLÍTICA-SÍMILE DO HIDROXICITRONELAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPGPNSB), da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de doutor(a).

Orientador: Prof Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Coorientador: Prof Dr. Ricardo Dias de Castro

João Pessoa-PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A553e Andrade, Jessica Cabral de.
Envolvimento dos sistemas gabaérgicos e
glutamatérgicos na atividade ansiolítica-símile do
hidroxicitronelal / Jessica Cabral de Andrade. - João
Pessoa, 2022.
105 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.
Coorientação: Ricardo Dias de Castro.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Ansiedade. 2. Estudos in vivo. 3. Estudos in
silico. 4. Monoterpenos. I. Almeida, Reinaldo Nóbrega
de. II. Castro, Ricardo Dias de. III. Título.

UFPB/BC CDU 616.89-008.441(043)

JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GABAÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS NA
ATIVIDADE ANSIOLÍTICA-SÍMILE DO HIDROXICITRONELAL**

Tese aprovada em: 16 de agosto de 2022.

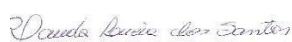
Banca examinadora



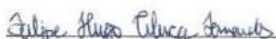
Reinaldo Nóbrega de Almeida (Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO DIAS DE CASTRO
Data: 17/08/2022 07:54:48-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ricardo Dias de Castro (Coorientador)



Vanda Lúcia dos Santos (Membro Externo)



Felipe Hugo Alencar Fernandes (Membro Externo)



Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori (Membro Interno)



Cícero Francisco Bezerra Felipe (Membro Interno)

AGRADECIMENTOS

Toda honra e glória sejam dadas a Ti, meu Deus.

Obrigada, meu Pai misericordioso, por ter me dado força de vontade, garra e determinação. Obrigada por ter me permitido começar e concluir esse trabalho. Tu és perfeito.

Agradeço a minha família, aos meus pais, FRANCISCO VALMIR FERREIRA DE ANDRADE E JAILMA PEREIRA CABRAL DE ANDRADE, por serem a minha rocha e fortaleza, por sempre me apoiarem e se dedicarem a minha formação. Vocês sempre foram o meu exemplo de força. A minha irmã, JOICY CABRAL DE ANDRADE, pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus tios, primos e avós, presentes, que sempre se preocuparam comigo e de alguma forma me ajudaram.

AOS MEUS GRANDES MESTRES, Prof. REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA E RICARDO DIAS CASTRO. Obrigada por todos os ensinamentos, por serem sempre tão cordiais e atenciosos, dispostos a formar não só pesquisadores/professores, mas também seres humanos melhores. Eu não poderia ter tido melhor orientação nesta fase.

A banca, pela disponibilidade para avaliar o trabalho e contribuir com a melhoria do mesmo.

Aos companheiros de pesquisa, ÁLEFE MONTEIRO, HUMBERTO HUGO, PABLO RAYFF, DANIELLE NÓBREGA, que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho e serviram de ombro amigo diante de todas as dificuldades.

Ao programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por todo suporte e corpo docente qualificado, prontos para enriquecer o conhecimento dos seus discentes.

A todos os meus colegas da turma do doutorado de 2019 da PgPNSB.

A CAPES, pelo incentivo financeiro a essa pesquisa.

**Mas alegrem-se todos os que confiam em ti;
exultem eternamente, porquanto tu os
defendes; e em ti se gloriem os que amam o
teu nome.**

**Pois tu, Senhor, abençoarás ao justo;
circunda-lo-ás da tua benevolência, como
de um escudo. (Salmos 05:11-12)**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre as proteínas receptor GABA _A e receptor NMDA selecionadas, com a finalidade de observar a interação do HC com esses alvos.	47
Tabela 2 - Alterações comportamentais observadas nos animais após a administração do hidroxicitronelal (HC) na dose de 300 mg/kg.	51
Tabela 3 - Resultados dos valores de energia de ligação (kcal/mol) em cinco funções de pontuação diferentes.	65
Tabela 4 - Valores de energia de ligação do composto HC analisados na proteína NMDAR.	68
Tabela 6 - Dados farmacocinéticos <i>in silico</i> estimados em serviços da web SwissADME ou pkCSM.	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemática do funcionamento do eixo HPA (hipófise-pituitária-adrenal). Neurônios do núcleo paraventricular (PVN), fator liberador de corticotrofina (CRF), adrenocorticotropina (ACTH).	21
Figura 2 - Exemplificação da neurotransmissão GABAérgica (mediada pelo neurotransmissor inibitório GABA) e da neurotransmissão glutamatérgica (mediada pelo neurotransmissor excitatório glutamato) regulando o Sistema Nervoso Central, resultando na manutenção da homeostase.	29
Figura 3 - Isômeros D-citronelal e S-citronelal. A mistura racêmica desses isômeros da origem ao citronelal. Esse por sua vez, origina o hidroxycitronelal.	34
Figura 4 - Desenho esquemático dos testes realizados para a avaliação da atividade ansiolítica-símile do hidroxycitronelal.	39
Figura 5 - Protocolo seguido para a estimativa da DL50 (dose letal 50%) da substância hidroxycitronelal (HC).	40
Figura 6 - Avaliação de parâmetros comportamentais desenvolvidos pelos animais após a administração do hidroxycitronelal nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg.	41
Figura 7 - Protocolo experimental do teste rota rod.	42
Figura 8 - Protocolo utilizado no teste do labirinto em cruz elevado.	43
Figura 9 - Teste do campo aberto.	44
Figura 10 - Teste da placa perfurada.	45
Figura 11 - Efeito do HC (i.p.) no tempo de permanência dos animais no rota-rod.	53
Figura 12 - Efeito do HC (i.p.) e do diazepam no número de entradas (A) e no tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.	56
Figura 13 - Efeito do HC (i.p.) no número de cruzamentos (A), número de <i>rearing</i> (B) e número de <i>grooming</i> (C) no teste do campo aberto.	58
Figura 14 - Efeito do HC (i.p.) e do diazepam no número de mergulhos com a cabeça (A) e no número de cruzamento pelos quadrantes (B) dos animais na placa perfurada.	59
Figura 15 - Influência do HC após o uso do flumazenil no número de entradas (A) e no tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do LCE.	61
Figura 16 - Influência da associação entre a dose subativa do HC e da CET no número de entradas (A) e no tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do LCE.	63

Figura 17 - Visualização das interações 2D e 3D entre os ligantes HC e ABU e o alvo GABA _A . Complexo GABA _A -HC (A). Interações 3D e 2D entre os aminoácidos do ligante HC e GABA _A (B e C). Interações 3D e 2D entre o ligante ABU e os aminoácidos do GABA _A (D e E).....	66
Figura 18 - Interações entre a molécula do HC com o receptor NMDA (A) e entre a cetamina e o receptor NMDA (B).....	69
Figura 19 - RMSD de átomos C α do GABA _A R isolados e complexados com ligantes HC e ABU. (B) RMSD dos átomos C α dos ligantes HC e ABU. (C) RMSF de átomos C α de GABA _A R complexados com os ligantes HC e ABU.	72
Figura 20 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps. Estrutura do complexo GABA _A R-HC e seu sítio ativo (A), estrutura inicial (B), 200ps (C), 400ps (D), 600ps (E) 800ps (F) e 1000ps (G).	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPA	Receptor Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AVP	Arginina-Vasopressina
BZD	Benzodiazepínicos
CRF	Fator de Liberação de Corticotrofina
CA	Campo Aberto
CET	Cetamina
CID	Classificação Internacional de Doenças
DZP	Diazepam
DFI	Isopentenil
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DFDMA	Difosfato de Dimetilalilo
DL50	Dose Letal 50%
E.P.M	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GABA_AR	Receptor do Ácido Gama-aminobutírico do tipo A
GABA_BR	Receptor do Ácido Gama-aminobutírico do tipo B
iGluR	Receptor Ionotrópico do Glutamato
mGluR	Receptores Metabotrópicos do Glutamato
GDF	Geranil Difosfato
GR	Glicocorticoide
HC	Hidroxicitronelal
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
ISRNS	Inibidores da Recaptação de Noradrenalina e Serotonina
IPeFarm	Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos
i.p.	Intraperitoneal
KAR	Receptor Cainato
kg	Quilograma
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MIR	Mirtenol
MR	Receptor Mineralocorticoide
mg	Miligrama
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
NT	Neurotransmissores
OE	Óleos Essenciais
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da saúde
PP	Placa Perfurada
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
POMC	Pro-opiomelanocortina
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TP	Transtorno do Pânico
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TOC	Transtorno Obsessivo-Compulsivo
RMSD	Desvio Quadrático Médio
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
r.p.m	Rotações por minuto

SNC	Sistema Nervoso Central
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
UPA	Unidade de Produção Animal

RESUMO

O hidroxicitronelal (HC) é um monoterpeno obtido a partir da semissíntese do citronelal e é amplamente utilizado como fragrância em cosméticos. Alguns monoterpenos já foram estudados em relação às suas atividades sobre o sistema nervoso central, inclusive atividade ansiolítica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível atividade do tipo ansiolítica-símile do HC, e seu possível mecanismo de ação usando metodologias *in vivo* e *in silico*. Camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) foram tratados com HC (12,5; 25 e 50 mg/kg, i.p.) e submetidos aos testes do *rota rod*, labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (CA) e placa perfurada (PP). O possível envolvimento dos receptores GABA_A e NMDA foi verificado utilizando os bloqueadores flumazenil e cetamina, respectivamente, no LCE. Nenhuma diferença significativa foi observada no teste do *rota rod*, em relação ao grupo controle negativo, para a atividade motora dos animais tratados com o HC, indicando ausência de efeito miorrelaxante ou sedativo. No labirinto em cruz elevado, HC (nas três doses) induziu aumento, significativo, na porcentagem de entradas (34,8%, 33,8% e 38,6%, respectivamente) e no tempo de permanência (49,9%, 56,1% e 57,0%, respectivamente) nos braços abertos do LCE, bem como aumentou o número de cruzamentos no modelo do campo aberto e o número de cruzamentos e mergulhos na placa perfurada, indicando uma atividade ansiolítica-símile. A atividade ansiolítica-símile foi revertida após a utilização do antagonista dos receptores GABA_A. A administração do antagonista cetamina em associação com o HC resultou em aumento no número de entradas e tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, mesmo estando em doses sub-ativas. Os estudos *in silico* mostraram uma interação estável entre o HC e aminoácidos presentes nos receptores GABA_A (29,52; -5,38; 37,94 kcal/mol), sugerindo que o HC possui uma modulação alostérica positiva sobre o receptor GABA_A, e nos receptores NMDA (-52,30 kcal/mol) do glutamato. Os dados farmacocinéticos mostram que o HC possui parâmetros satisfatórios, como uma boa biodisponibilidade. Estes resultados sugerem que o possível mecanismo de ação da atividade do tipo ansiolítico-símile do composto pode ser atribuído, possivelmente, ao envolvimento da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica, os quais são essenciais no funcionamento do SNC. Dessa forma, conclui-se que o HC possui atividade ansiolítica-símile, podendo ser um possível candidato a futuro fármaco.

Palavras-chave: Ansiedade. Estudos *in vivo*. Estudos *in silico*. Monoterpenos.

ABSTRACT

Hydroxycitronellal (HC) is a monoterpene obtained from the semisynthesis of citronellal and is widely used as a fragrance in cosmetics. Some monoterpenes have already been studied in relation to their activities on the central nervous system, including anxiolytic activity. The objective of this work was to evaluate the possible anxiolytic-like activity of HC, and its possible mechanism of action using *in vivo* and *in silico* methodologies. Male Swiss mice (*Mus musculus*) were treated with HC (12.5; 25 and 50 mg/kg, *i.p.*) and submitted to rota rod, elevated plus maze (LCE), open field (AC) and perforated plate (PP). The possible involvement of GABA_A and NMDA receptors was verified using the blockers flumazenil and ketamine, respectively, in the ECL. No significant difference was observed in the rota rod test, in relation to the negative control group, for the motor activity of the animals treated with HC, indicating the absence of myorelaxant or sedative effect. In the elevated plus maze, HC (at the three doses) induced a significant increase in the percentage of entries (34.8%, 33.8%, and 38.6%, respectively) and length of stay (49.9%, 56.1% and 57.0%, respectively) in the open arms of the LCE, as well as increased the number of crossings in the open field model and the number of crossings and dips in the perforated plate, indicating an anxiolytic-like activity. The anxiolytic-like activity was reversed after the use of the GABA_A receptor antagonist. The administration of the antagonist ketamine in association with HC resulted in an increase in the number of entries and time spent in the open arms of the LCE, even at sub-active doses. *In silico* studies showed a stable interaction between HC and amino acids present at GABA_A receptors, suggesting that HC has a positive allosteric modulation on the GABA_A (29.52; -5.38; 37.94 kcal/mol) receptor, and on NMDA (-52.30 kcal/mol) glutamate receptors. Pharmacokinetic data show that HC has satisfactory parameters, such as good bioavailability. These results suggest that the possible mechanism of action of the anxiolytic-like activity of the compound can be attributed, possibly, to the involvement of GABAergic and glutamatergic neurotransmission, which are essential in the functioning of the CNS. Thus, it is concluded that HC has anxiolytic-like activity, and may be a possible candidate for a future drug.

Keywords: Anxiety. *In vivo* studies. *In silico* studies. Monoterpenes.

SUMÁRIO

2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Ansiedade.....	20
2.1.1	<i>Neurobiologia da ansiedade</i>	20
2.1.1	<i>Transtornos de ansiedade</i>	22
2.1.3	<i>Substâncias que possuem ação sobre o SNC</i>	23
2.1.4	<i>Tratamento da ansiedade</i>	24
2.2	Neurotransmissão GABAérgica e ansiedade.....	26
2.3	Neurotransmissão glutamatérgica e ansiedade	27
2.4	Monoterpenos com atividade ansiolítica.....	30
2.5	Hidroxicitronelal.....	34
2.6	Modelos animais utilizados para avaliar a atividade ansiolítica de novas substâncias.....	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Locais da Pesquisa	38
4.2	Animais e aspectos éticos.....	38
4.3	Substâncias	39
4.4	Delineamento da pesquisa e Protocolos experimentais	39
4.5	Testes <i>in vivo</i>.....	40
4.5.1	<i>Estimativa da DL₅₀ do hidroxicitronelal e triagem farmacológica</i>	40
4.5.2	<i>Rota Rod.....</i>	41
4.5.3	<i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	42
4.5.4	<i>Campo Aberto (CA).....</i>	43
4.5.5	<i>Placa perfurada (PP)</i>	44
4.5.6	<i>Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica</i>	45
4.5.7	<i>Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica.....</i>	46
4.6	Testes <i>in silico</i>.....	46
4.6.1	<i>Docking molecular</i>	46

4.6.2	<i>Dinâmica molecular</i>	48
4.6.3	<i>Predições farmacocinéticas</i>	48
4.7	Análise estatística	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Testes <i>in vivo</i>	50
5.1.1	<i>Estimativa da DL₅₀ do hidroxycitronelal e triagem farmacológica</i>	50
5.1.2	<i>Rota rod</i>	52
5.1.3	<i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	54
5.1.4	<i>Campo Aberto (CA)</i>	57
5.1.5	<i>Placa perfurada (PP)</i>	59
5.1.6	<i>Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica</i>	60
5.1.7	<i>Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica</i>	62
5.2	Testes <i>in silico</i>	64
5.2.1	<i>Docking molecular</i>	64
5.2.2	<i>Dinâmica molecular</i>	69
5.2.3	<i>Predições farmacocinéticas</i>	73
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXO 1	97
	ANEXO 2	99
	ANEXO 3	102
	ANEXO 4	104
	ANEXO 5	106

1 INTRODUÇÃO

O comportamento ansioso faz parte do espectro normal das vivências humanas. Todas as pessoas em determinadas situações da vida sentem ansiedade, principalmente frente a um sinal de alerta sobre um perigo iminente. Essa reação permite escapar de situações perigosas, assim como melhoram as respostas diante de condições adversas impostas pelo meio (SILVA et al., 2018). Caso a resposta a esse risco seja emocionalmente desproporcional à situação que a desencadeia, caracterizaria como um transtorno de ansiedade (GUIMARÃES et al., 2015).

Segundo o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V) da Associação Americana de Psiquiatria (2014) e o CID-11 (Classificação Internacional de Doenças) da OMS (2022), os principais transtornos de ansiedade são: agorafobia, fobia social, fobia específica, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico e transtorno do estresse pós-traumático. Esses transtornos de ansiedade surgem, principalmente, quando ocorre um mal funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), regulado pelos neurotransmissores (NT) (RUSCIO et al., 2017).

Os NT são biomoléculas sintetizadas e armazenadas por todo o sistema nervoso. Estes são moduladores endógenos, visto que atuam em várias funções cerebrais cruciais à manutenção da homeostase e cooperam em múltiplos mecanismos de sinalização, tais como nos receptores do GABA, (ácido gama-aminobutírico) e do Glutamato, conhecidos respectivamente como os maiores neurotransmissores inibitórios e excitatórios do Sistema Nervoso Central (SNC), respectivamente (RAHMANI et al., 2016).

É esperado que drogas que aumentem a atividade GABAérgica (agonistas e moduladores positivos) promovam um efeito ansiolítico em baixas doses, e sedativo em altas doses, e drogas que reduzam a atividade deste sistema promovam um efeito ansiogênico em pequenas doses, ou até mesmo um efeito convulsivante em altas doses (CHENG; DING, 2021).

Apesar dos avanços no estudo deste transtorno, as alternativas farmacoterapêuticas ainda são restritas, porém eficazes, pois atuam na estabilização e prevenção do quadro. Existem medicamentos que trazem efeitos a médio e longo prazo e também os medicamentos de efeito imediato, que podem ser utilizados quando a crise se instala, com o objetivo de eliminá-la. As drogas são utilizadas para alterar e melhorar a transmissão sináptica (MOURA et al. 2016). Os benzodiazepínicos, antidepressivos (tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e inibidores da monoamino-oxidase), anti-histamínicos, buspirona e a pregabalina constituem

ainda os principais fármacos disponíveis para o tratamento dos transtornos da ansiedade (BALDWIN et al., 2013).

Atualmente, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), os inibidores da recaptação de noradrenalina e serotonina (IRNS), e a pregabalina são utilizados como opções de primeira linha para o tratamento de distúrbios de ansiedade, principalmente devido a eficácia e bons perfis de segurança, quando comparados aos benzodiazepínicos, como o diazepam. No entanto, a ação retardada, a piora dos sintomas de ansiedade nos primeiros dias de tratamento, e os efeitos colaterais incômodos, como náusea, tontura e sedação, muitas vezes são as razões que levam a descontinuação do tratamento (MARON; NUTT, 2017).

Dessa forma, evidencia-se a necessidade de encontrar meios alternativos para o desenvolvimento de ansiolíticos, tendo a possibilidade da utilização de produtos naturais com esse intuito, uma vez que são fontes de substâncias bioativas que podem ter grande influência sobre a saúde mental (SONG et al., 2021).

Os óleos essenciais (OE) são fitocomplexos odoríferos formados durante as reações do metabolismo secundário das plantas, os quais protegem a planta contra ataques predatórios e atração de agentes polinizadores, por exemplo. De forma geral, os OE são constituídos majoritariamente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (SALEHI et al., 2019).

Atribui-se à grande variedade estrutural das substâncias presente nos OE a responsabilidade pelas diversas atividades farmacológicas, dentre essas, atividade ansiolítica (NETO et al., 2017), antidepressiva (DINIZ et al., 2019) anticonvulsivante (SALGADO et al., 2018; FONSÊCA et al., 2019) e antinociceptiva (SOUZA, 2011; SOUZA et al., 2010; LA ROCCA et al., 2017; MENEZES et al., 2018). Algumas dessas atividades estão relacionadas, por exemplo, a modulação positiva da transmissão GABAérgica pela ação dos monoterpenos sob os receptores GABA_A (BRITO et al., 2012).

Na literatura encontram-se diversos relatos das atividades farmacológicas do citronelal, as quais envolvem diminuição da transmissão neuronal, tais como atividade ansiolítica (STOJANOVIĆ et al., 2022) anticonvulsivante (MELO et al., 2011), anti-inflamatória (SANTANA et al., 2013) e antinociceptiva (MELO et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011), com evidências de suas ações sobre o sistema glutamatérgico (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), sistema esse extremamente importante na manutenção da dor crônica (MELO et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011).

Assim, por possuir semelhança estrutural com o citronelal, o hidroxicitronelal (HC), um monoterpeno de grande aplicabilidade farmacológica (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010)

possui atividade farmacológica ansiolítico-símile promissora, possivelmente modulando mecanismos neuronais inibitórios e excitatórios, o que passou a ser objetivo deste estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ansiedade

2.1.1 *Neurobiologia da ansiedade*

Os transtornos de ansiedade pertencem a um vasto grupo de doenças genéticas, caracterizadas por uma complexa interação de fatores ambientais com múltiplas variantes genéticas em diferentes loci cromossômicos. A hereditariedade dos transtornos de ansiedade, ou seja, o grau de participação de fatores genéticos em seu desenvolvimento, encontra-se em torno de 30-67%, sendo o restante atribuído a fatores ambientais negativos, desencadeados ao longo da vida, tais como: abuso e negligência (emocional e/ou física), lesões traumáticas, morte de pessoas importantes, separação e divórcio e dificuldades financeiras. Além disso, é provável que os fenótipos ansiosos sejam influenciados por fatores mais sutis como a interação entre um pai ansioso e uma criança cujo início da vida é definido em parte pela adaptação ao comportamento desse pai (BARTLETT; SINGH; HUNTER, 2017).

O surgimento dos subtipos dos transtornos de ansiedade está bastante “relacionado ao estresse”. Um grande foco da pesquisa tem sido nas consequências comportamentais epigenéticas e ansiogênicas do estresse. Modelos animais de transtornos relacionados à ansiedade forneceram fortes evidências do papel do estresse no controle epigenético do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e das regiões cerebrais responsivas ao estresse. A neuroepigenética pode continuar a explicar a variação individual na suscetibilidade a perturbações ambientais e, consequentemente, o desenvolvimento de comportamentos ansiosos. Intervenções comportamentais e farmacológicas destinadas a atingir marcas epigenéticas associadas à ansiedade podem ser frutíferas no desenvolvimento de novos tratamentos (BARTLETT; SINGH; HUNTER, 2017).

O modelo biológico mais citado e que se propõe a explicar o principal mecanismo fisiopatológico da ansiedade, leva em consideração a ativação do eixo HPA. A ativação desse eixo, desencadeia emoções negativas, responsáveis pelo surgimento das crises. Dessa forma, a ansiedade causa ativação excessiva do eixo HPA e do sistema nervoso simpático, aumentando a liberação de catecolaminas plasmáticas (Figura 1) (COHEN; EDMONDSON; KRONISH, 2015).

O eixo HPA é um componente importante na resposta ao estresse agudo, uma vez que em resposta a um agente estressor, o corpo desenvolve mecanismos para lidar com esse agente

de forma adequada. Em parte, esse mecanismo é alcançado por meio da ativação do eixo HPA, que funciona como um feedback negativo, começando com a liberação de arginina-vasopressina (AVP) e fator de liberação de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo. Este lançamento promove a produção de pro-opiomelanocortina (POMC) na pituitária. POMC é posteriormente convertido em hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e liberado na corrente sanguínea. A glândula adrenal produz corticosteroides no córtex da adrenal como consequência ao aumento da concentração de ACTH. Posteriormente, os corticosteroides são liberados no sangue e se ligam ao receptor mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR) (LÜTHI; LÜSCHER, 2014).

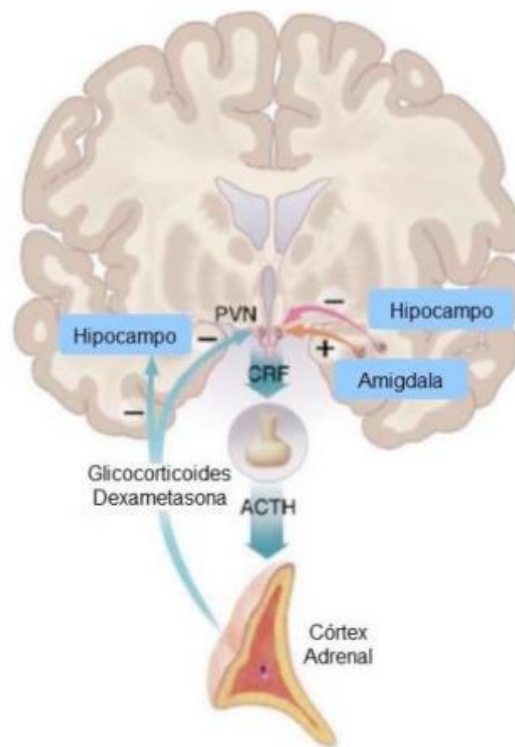


Figura 1 - Esquemática da influência do eixo HPA (hipófise-pituitária-adrenal) na dinâmica do estresse. As entradas neurais incluem aferências excitatórias da amígdala e aferentes inibitórias do hipocampo. O CRF é liberado por esses neurônios na hipófise e atua nos corticotróficos da hipófise anterior para liberação do ACTH. O ACTH atinge o córtex adrenal através da corrente sanguínea, onde estimula a liberação de glicocorticóides. Neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, fator liberador de corticotrofina (CRF), adrenocorticotropina (ACTH).

Fonte: Adaptado de Nestler et al, 2002.

Devido a importância do eixo HPA na regulação da homeostase do organismo humano, ficou comprovado que em casos de exposição a estresse crônico ou a traumas, essa regulação pelo eixo HPA é interrompida, levando a níveis anormais de glicocorticoides que podem persistir mesmo na ausência de agentes estressores adicionais. Por exemplo, estudos clínicos de indivíduos que sofrem traumas na infância apresentaram níveis basais anormais de cortisol, o que comprova que essa desregulação pode persistir até a vida adulta, o que irá influenciar no surgimento de outros transtornos da ansiedade (KEESHIN et al., 2013).

Além disso, a glândula adrenal também produz dois outros hormônios, adrenalina e noradrenalina, na medula adrenal em resposta ao ACTH. O papel desses hormônios é controlar a resposta do sistema nervoso periférico, por exemplo, reduzindo a digestão e a função imunológica enquanto aumenta a frequência cardíaca e a pressão arterial de forma aguda. Dessa forma, intervenções farmacológicas direcionadas aos receptores de noradrenalina provaram redução efetiva de fobias durante a reconsolidação da memória do medo (SOETER; KINDT, 2015).

2.1.1 Transtornos de ansiedade

O Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) é um dos mais antigos transtornos psiquiátricos conhecidos pelo homem, remontando à antiguidade e registrado pelo pai da medicina, Hipócrates. O TAG foi introduzido na terceira edição do DSM em 1980 como uma categoria residual que poderia ser diagnosticada se nenhum outro transtorno de ansiedade estivesse presente. Mas nas edições seguintes do manual DSM esse transtorno começou a ter seus próprios critérios diagnósticos como uma entidade separada de transtorno de humor (BANDELOW et al., 2015).

O TAG é uma grave condição psiquiátrica, afetando cerca de 6% da população durante a vida. Essa síndrome quando não tratada, adequadamente, pode desencadear um perfil crônico. Sua manifestação é intensificada devido à comorbidade de outros transtornos psiquiátricos, como transtorno depressivo maior (TDM), transtorno do pânico e o abuso de álcool e outras substâncias psicoativas, as quais agravam adicionalmente e contribuem para uma má resposta ao tratamento. Pacientes com TAG são frequentemente usuários da atenção primária, o que traz um grande impacto para o Sistema Único de Saúde (GRUPE; NITSCHKE, 2013).

Além do transtorno de ansiedade generalizado, de acordo com o DSM-V, tem-se também outros tipos de transtornos, como o transtorno do pânico (TP), fobia social, transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), fobias específicas e transtorno obsessivo-compulsivo

(TOC) onde o sintoma central sempre será a ansiedade. Apesar de existirem controvérsias sobre a classificação da ansiedade patológica, a experiência de ansiedade, conforme definida aqui, é central para o sofrimento de todos que possuem algum desses transtornos (GRUPE; NITSCHKE, 2013).

Os indivíduos que possuem transtornos de ansiedade são excessivamente medrosos e evitam algumas situações cotidianas. A evitação é desproporcional ao risco real ou perigo, uma vez que essa antecipação de um perigo iminente imaginário, faz com que essas pessoas se sintam despreparados para reagirem a tais situações. Embora os critérios para um diagnóstico categórico possam ser clinicamente úteis, a ansiedade deve ser vista como algo mais completo, e a distinção entre o que é normal e anormal baseia-se em julgamentos clínicos de gravidade, frequência de ocorrência, persistência ao longo do tempo e grau de sofrimento e prejuízo na realização de tarefas do dia a dia (CRASKE et al., 2016).

2.1.3 Substâncias que possuem ação sobre o SNC

Para melhor compreensão didática as drogas psicoativas foram agrupadas por Almeida e Barbosa-Filho (2006), em 4 grandes grupos brevemente descritos a seguir:

Drogas psicoanalépticas - são substâncias que aumentam/estimulam a atividade no SNC de modo geral ativando as transmissões neuronais. Este grupo engloba desde estimulantes menores (ex.: cafeína) a estimulantes maiores (ex.: cocaína), drogas de potencial abusivo como os inibidores de apetite e estimulantes da vigília. São incluídos ainda os agentes convulsivantes, úteis na pesquisa de outros fármacos, e por fim os antidepressivos.

Drogas psicolépticas – são drogas que diminuem/deprimem a atividade do SNC de modo geral dificultando as transmissões neuronais. Nesta classe estão incluídos os neurolépticos ou antipsicóticos, os hipnóticos (medicamentos com potencial indutor de sono), os ansiolíticos, os analgésicos opioides ou analgésicos de ação central, o etanol, os anestésicos e os antiepilépticos ou anticonvulsivantes.

Drogas psicodislépticas – são substâncias destituídas de utilidade terapêutica e que perturbam o SNC causando alucinações.

Drogas parapsicotrópicos – são substâncias de uso neurológico ou psiquiátrico que não se enquadram em nenhuma das classes anteriores. Neste grupo estão os estabilizantes de humor (ex.: lítio), drogas que tratam alcoolismo e antiparkinsoninos.

2.1.4 Tratamento da ansiedade

Atualmente, para o tratamento de transtornos de ansiedade devem ser oferecidas psicoterapia associada a farmacoterapia, sendo essa associação considerada eficaz. A farmacoterapia emprega algumas classes de fármacos, classificados como substâncias psicolépticas, uma vez que a intenção dessas substâncias é diminuir a excitação do SNC.

As decisões sobre o tratamento devem ser tomadas à luz da gravidade do transtorno, a preferência do paciente, a latência esperada, a durabilidade do efeito do tratamento, os efeitos colaterais esperados e a disponibilidade do tratamento em questão. Se um protocolo de tratamento se revelar ineficaz, outro (ou a combinação de ambos) deve ser tentado. Somente para as fobias específicas existem evidências, muito boas e, portanto, uma recomendação muito forte, para o emprego da psicoterapia de forma isolada, sendo o tratamento farmacológico não indicado, de forma isolada, nessas circunstâncias (PERNA et al.; 2016).

As terapias medicamentosas estão disponíveis para todos os transtornos de ansiedade. Com a utilização de uma terapia farmacológica eficiente pode-se obter uma redução dos sintomas, o que causa uma melhoria significativa na qualidade de vida do paciente. Os ansiolíticos são os fármacos empregados para o tratamento dos distúrbios de ansiedade em humanos. Os benzodiazepínicos (BZD), como o clonazepam, diazepam, lorazepam, e o bromazepam são os fármacos mais empregados no tratamento da ansiedade, pois possuem um início de ação mais rápido, quando comparados a outras substâncias, e uma janela terapêutica mais larga.

Os benzodiazepínicos ligam-se ao receptor GABA_A entre as subunidades α e γ do receptor, e modulam a condutância do íon cloreto (Cl⁻) (FEDOTOVA et al., 2017), aumentando, assim, a frequência de abertura dos receptores sem alterar a média do tempo que esse ficará aberto ou a sua condutância. Essas moléculas também potencializam a ação do ligante endógeno, o GABA, ao invés de ativar diretamente o receptor. Devido a esse mecanismo de

ação, os benzodiazepínicos exibem um grande índice terapêutico e baixa toxicidade (LEVI et al., 2015; GRAVIELLE et al., 2018).

Contudo, o uso indiscriminado de BZD nos tratamentos dos distúrbios de ansiedade assim como para outras doenças, resulta em tolerância no indivíduo. Estudos sugerem que a tolerância resulta da expressão diminuída dos receptores GABA_A nas sinapses. Além disso, a interrupção abrupta do tratamento com os BZD após a sua administração crônica pode ocasionar abstinência, caracterizada por confusão, ansiedade, agitação e insônia, efeitos contrários aos efeitos do fármaco (HOOD et al., 2012).

Os antidepressivos são substâncias também empregadas no tratamento de transtornos de ansiedade (com exceção de fobias específicas), com base em evidências de eficácia de estudos controlados e randomizados, segurança geral e ausência de potencial de uso indevido. Além disso, muitos pacientes com transtornos de ansiedade também têm depressão associada, e o uso de antidepressivos permite a realização do tratamento em conjunto. Entre os antidepressivos, os mais comumente utilizados são as classes dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) (WILSON et al., 2015).

Os pacientes que estiverem sendo tratados com esses antidepressivos devem ser informados do tempo inicial que esses fármacos possuem para se obter o efeito ansiolítico, uma vez que a sua latência é de 2 a 4 semanas (em alguns casos até 6 semanas). Durante as primeiras 2 semanas, alguns efeitos adversos podem ser mais fortes, tais como nervosismo ou um aumento nos sintomas iniciais da ansiedade, o que pode causar uma diminuição na adesão ao tratamento por parte dos pacientes (BALDWIN et al., 2013).

A principal diferença entre o tratamento da ansiedade e o tratamento de transtornos depressivos é a dose inicial. Pacientes com ansiedade tendem a ser sensíveis à maioria dos efeitos colaterais das drogas, então a dose inicial recomendada é a metade da recomendada para depressão, caso sejam empregados agentes com ambas as propriedades. Essa dose deve ser mantida por cerca de duas semanas e, se tolerada bem pelo paciente, dobrado posteriormente (WILSON et al., 2015).

Alguns ISRS e ISRSN são inibidores das enzimas citocromo P450 e, portanto, podem interagir com medicamentos psicoativos, sendo importante a avaliação da farmacoterapia do paciente pelo médico. Após a interrupção do tratamento com um ISRS, pode ocorrer reações de abstinência. No entanto, estes são muito menos frequentes e graves do que as reações de abstinência observadas após o término do tratamento com benzodiazepínicos. Observa-se essas

reações adversas mais frequentemente com a utilização da paroxetina e menos com sertralina ou a fluoxetina (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017).

Na maioria dos casos, as drogas empregadas para os tratamentos dos transtornos de ansiedade podem ocasionar efeitos adversos, o que justifica a busca por fontes naturais de substâncias que sejam eficientes para estes tratamentos, e que apresentem baixo efeito colateral. Por exemplo, os benzodiazepínicos como o diazepam e o clonazepam podem causar amnésia, sedação, dependência, e interação com agentes depressores do SNC. A longo prazo, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) podem levar ao choque cardiovascular que pode ser fatal, além de causar insônia, amnésia e agitação (REHMAN et al., 2018).

2.2 Neurotransmissão GABAérgica e ansiedade

Dessa forma, a homeostase do sistema nervoso central (SNC) é mantida por um equilíbrio de forças excitatórias e inibitórias. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório SNC e atua através dos receptores GABA_ARs e GABA_BRs. Os GABA_AR estão presentes em cerca de 20% a 50% das sinapses no cérebro, ao quais reagem em uma escala de tempo de milissegundos à ligação do GABA, resultando na abertura de um canal, transmembranar, permeável ao íon cloreto, que suprime a atividade neuronal no cérebro. A disfunção desses canais resulta em transtornos de ansiedade, epilepsia e transtornos no neurodesenvolvimento, incluindo autismo (BRAAT; KOOY, 2015).

Embora a maioria dos estudos sobre neuroplasticidade tenha sido focado na transmissão excitatória, nos últimos, alguns estudos exemplificaram tipos de alterações dependentes da atividade em sinapses inibitórias (FLORES; MENDEZ, 2014). A neurotransmissão GABAérgica medeia a maior parte da inibição rápida no SNC, influenciando a excitabilidade neural sob condições fisiológicas, farmacológicas e patológicas. Sendo assim, qualquer mudança ou interferência sobre essa neurotransmissão inibitória, pode resultar no surgimento de doenças, principalmente as que implicam aumento da excitação neuronal (GRAVIELLE et al., 2018).

Devido a suas características e importância para a manutenção do funcionamento do SNC, os GABA_AR são os alvos de uma variedade de drogas que agem através de sítios de ligação distintos nesses receptores. O GABA foi descoberto em 1950, e logo depois veio a descoberta dos benzodiazepínicos (moduladores alostéricos dos GABA_AR), amplamente utilizados no tratamento de doenças como a epilepsia, a insônia, a ansiedade e o transtorno do pânico (SIEGHART, 2015). O flumazenil é um antagonista do sítio de ligação dos

benzodiazepínicos e é utilizado clinicamente para reverter a anestesia induzida por esses fármacos, sendo também o principal antídoto para reverter quadros de overdose por BZD (OLSEN, 2015).

O papel dos GABA_ARs na regulação das respostas de ansiedade e medo tem sido bastante estudado e correlacionado. Alguns trabalhos demonstraram a influência dos subtipos dos receptores GABA_ARs na resposta ansiolítica dos compostos benzodiazepínicos mostrando que as ações ansiolíticas e redutoras do medo desses fármacos são mediadas principalmente pelos α 2GABA_ARs (SMITH et al., 2012), γ 2GABA_ARs (CRESTANI et al., 1999), α 1GABA_ARs (CRESTANI et al., 1999, WILTGEN et al., 2009), α 3GABA_ARs (DIAS et al., 2005) e, mais recentemente, α 5GABA_ARs (Behlke et al., 2016). Ou seja, além da importância do GABA_ARs como alvo farmacológico no tratamento da ansiedade, os seus subtipos merecem certo destaque como alvos.

Muitas regiões cerebrais parecem estar envolvidas no reconhecimento e regulação de estímulos emocionais negativos, as quais geram uma resposta cognitiva, comportamental e/ou somática a esses estímulos, sendo um conjunto de estruturas límbicas críticas na regulação desse sentimento negativo, em particular, a amígdala (NUSS, 2015).

A neurotransmissão GABAérgica na amígdala possui grande influência na modulação de respostas relacionadas à ansiedade. Várias linhas de pesquisa em animais experimentais têm fornecido evidências desse papel da neurotransmissão GABAérgica na amígdala na modulação relacionada comportamentos ansiosos. Por exemplo, infusões de GABA ou agonistas do receptor GABA_A na amígdala diminuem as medidas de medo e ansiedade em várias espécies animais, enquanto infusões de antagonistas de GABA_A tendem a ter efeitos ansiogênicos. (HELDT; MOU; RESSLER, 2012).

2.3 Neurotransmissão glutamatérgica e ansiedade

O neurotransmissor glutamato medeia a maioria das vias sinápticas excitatórias nos cérebros dos mamíferos. Tanto os receptores ionotrópicos, cujos membros recebem o nome do agonista primário, sendo estes NMDARs, AMPARs e receptores do cainato (KARs), quanto os receptores acoplados a uma proteína G do glutamato (mGluRs) possuem um papel importante na transmissão, plasticidade e modulação neuronal (ZHUO, 2017). Após a sua liberação, dos neurônios pré-sinápticos, o glutamato alcança a fenda sináptica e posteriormente se liga a diferentes classes de receptores, os quais estão localizados no compartimento pós-sináptico (MORETTO et al., 2018).

Os iGluRs medeiam a transmissão excitatória rápida do SNC, atuando como canais catiônicos que se abrem após a ligação do glutamato. Os AMPARs são heterotetrâmeros formados por dois dímeros, que existem em diferentes combinações das quatro subunidades de AMPARs (GluA1-4). No cérebro dos mamíferos, os dímeros mais abundantes são GluA1/GluA2 e GluA2/GluA3 (GREGER et al., 2017).

Já os NMDARs são receptores ionotrópicos que medeiam a transmissão após uma despolarização inicial mediada por AMPAR, a qual remove o magnésio do canal, que funciona como uma barreira física. O NMDAR é permeável ao sódio, cálcio e outros cátions e são heterotetrâmeros formados por duas subunidades GluN1 e duas subunidades GluN2A ou GluN2B. A subunidade alterna entre GluN2A e GluN2B e são cruciais para modular a função do receptor. Esse subtipo de receptor do glutamato está envolvido na plasticidade sináptica e, portanto, na aprendizagem, memória e desenvolvimento de funções cognitivas (PAOLETTI et al., 2013).

O receptor kainato também é um heterotetrâmero composto pelas subunidades KA1, KA2, GluR5, GluR6 e GluR7. Esses receptores também medeiam a entrada de sódio (e cálcio em menor quantidade) e a saída de potássio, permitindo a despolarização dos neurônios. No entanto, a contribuição dos receptores kainato às correntes glutamatérgicas é menor que a dos AMPARs (MORETTO et al., 2018).

Os mGluRs são receptores acoplados a uma proteína G do glutamato que também participam de fenômenos de plasticidade e, assim, auxiliam nos processos cognitivos superiores. Eles são divididos em três subgrupos (grupos I, II ou III) e estão acoplados a uma proteína G. Esses receptores são ainda divididos em três subfamílias: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8). Os mGluRs do Grupo I geralmente funcionam aumentando a excitação pós-sináptica mediada pelo glutamato, pois estão acoplados a uma proteína G do tipo associados com G_q/G_{11} . Os mGluRs dos grupos II e III são predominantemente expressos pré-sinápticamente, inibindo a liberação do glutamato (XIA et al., 2021).

Os mGluRs são atualmente o foco de várias investigações devido ao seu potencial como alvos de drogas para o tratamento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos do cérebro, incluindo esquizofrenia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, dependência, ansiedade, depressão, epilepsia e dor (VAIDYA et al., 2013).

Os antagonistas dos receptores mGlu do grupo I têm sido invariavelmente relatados por possuírem atividade ansiolítica em uma variedade de modelos animais, principalmente nos

modelos de conflito. Foi sugerido que esse efeito ansiolítico seja devido à modulação da atividade dos neurônios GABAérgicos no sistema límbico. Contudo, o desenvolvimento de novos ligantes para o receptor mGlu1, como possíveis ansiolíticos, encontram algumas limitações, pois essas substâncias apresentaram efeitos amnésicos e atividade ansiolítica mais fraca em comparação com os benzodiazepínicos (CHAKI, 2017).

Pesquisas não clínicas e clínicas forneceram uma fundamentação científica significativa para a potencial utilidade terapêutica de moduladores do glutamato no tratamento dos transtornos de ansiedade. O estresse, um importante fator de risco na gênese dos transtornos de ansiedade, é conhecido por induzir a liberação do glutamato em regiões límbicas o qual, por sua vez, estimula o eixo HPA e contribui para a neurotoxicidade induzida por glicocorticoides. Inibir a neurotransmissão glutamatérgica, em regiões específicas do cérebro, mudaria o equilíbrio excitatório para a neurotransmissão GABAérgica inibitória, levando a ansiólise (Figura 2) (BRIAN; SHAHID, 2012).

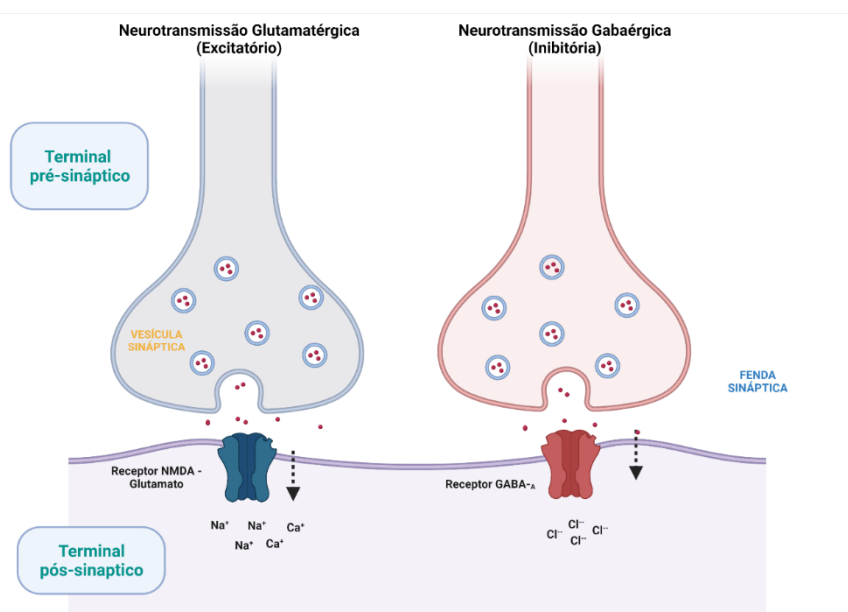


Figura 2 - Exemplificação da neurotransmissão GABAérgica (mediada pelo neurotransmissor inibitório GABA) e da neurotransmissão glutamatérgica (mediada pelo neurotransmissor excitatório glutamato) regulando o Sistema Nervoso Central, resultando na manutenção da homeostase. A estimulação exacerbada dos neurônios glutamatérgicos, através do receptor de NMDA, desencadeia a exocitose de mais neurotransmissores, que por sua vez, amplificam o fenômeno de excitotoxicidade. Assim, a neurotransmissão GABAérgica funcionará como um freio, inibindo a liberação de mais neurotransmissores excitatórios, tornando as fibras nervosas menos excitadas.

Fonte: autor (2022).

Algumas linhas de pesquisas sugerem que o glutamato liberado no sistema límbico desempenha um papel fundamental na patogênese da ansiedade. Primeiramente, receptores metabotrópicos do glutamato estão presentes na amígdala e no hipocampo e estão envolvidos em mecanismos relacionados ao condicionamento do medo e na formação da memória de evitação. Em segundo lugar, o estresse agudo aumenta a liberação de glutamato na amígdala. Em terceiro lugar, os NMDARs controlam os neurônios que secretam o fator liberador de corticotrofina (CRF) no núcleo central da amígdala exercendo uma influência significativa sobre a atividade da via das monoaminas (BERMUDO-SORIANO et al., 2012).

Modelos animais (como a imobilização e o teste de natação forçada), demonstram que ocorre um aumento significativo na liberação de cortisol pelas glândulas suprarrenais e aumento na concentração de glutamato no hipocampo e no córtex pré-frontal. Além disso, o estresse crônico demonstrou aumentar a expressão do gene AMPA no hipocampo, tornando esta região particularmente vulnerável à neurotoxicidade causada pelo glutamato (BERMUDO-SORIANO et al., 2012).

O estresse também pode causar alterações na neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que o estresse causado pela imobilização em ratos leva a um aumento na codificação de mRNA da subunidade NR1 do NMDAR no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Alterações semelhantes podem ser observada após administração de corticosterona exógena. No entanto, o pré-tratamento com o antagonista de NMDAR, como a dizocilpina, reduziu a secreção de ACTH causada pelo estresse de imobilização, sugerindo que o NMDAR está envolvido na resposta neurobiológica ao estresse (BERMUDO-SORIANO et al., 2012).

2.4 Monoterpenos com atividade ansiolítica

As plantas medicinais possuem diferentes classes de compostos bioativos que são responsáveis por suas atividades farmacológicas e, desta forma, são consideradas de grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos clínicos e pré-clínicos comprovaram que os metabólitos secundários, como alcaloides, terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, cinamatos e as saponinas possuem dentre outros efeitos, um efeito ansiolítico (XU et al., 2014).

Os metabólitos secundários são um subconjunto dos metabólitos das plantas, e são geralmente considerados aquele grupo composto por pequenas moléculas que podem ser

separadas dos muitos metabólitos comuns e necessários para a sobrevivência dos organismos (como por exemplo, as moléculas produzidas e utilizadas para suprir as atividades energéticas das plantas) (LI et al., 2020).

Os óleos essenciais (OE) são líquidos hidrofóbicos concentrados contendo compostos de aroma voláteis que são extraídos de ervas, flores e outras partes de plantas, provenientes do metabolismo secundário das plantas. Esse fitocomplexo é comumente aplicado como terapia complementar para pessoas com distúrbios de ansiedade, dor, transtorno bipolar, déficit de atenção, transtorno de hiperatividade e depressão (TANKAM; ITO, 2013). Os OEs podem ser absorvidos pela via dérmica, oral, inalatória, podendo ser administrados a partir de difusores, banhos e massagens. Muitos estudos mostram que os OE foram eficazes na redução da dor, ansiedade e estresse em modelos animais e humanos (TANKAM; ITO, 2013). Os constituintes do OE pertencem principalmente a dois grupos químicos: terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos) e alguns derivados dos fenilpropanoides. Os compostos do grupo terpenoide são geralmente bastante hidrofóbicos com peso molecular abaixo de 300 Daltons (WANG; HEINBOCKEL, 2018).

Como todos os outros terpenoides, os monoterpenos são construídos a partir de unidades repetidas de 5 carbonos, os quais são chamados de isoprenos. Sua biossíntese começa com o metabólito acetil-CoA que passa por uma série de vias biossintéticas, incluindo a via do ácido mevalônico. Dessa forma, os terpenoides são frequentemente chamados de produtos da via do ácido mevalônico. A conversão dos metabólitos primários em secundários envolve a síntese dos principais intermediários reativos de 5 carbonos, o difosfato de isopentenil (DFI) e difosfato de dimetilalilo (DFDMA). A condensação destas duas unidades de isopreno forma um esqueleto de 10 carbonos, gerando o geranyl difosfato (GDF), que é o precursor imediato de todos os monoterpenos (THOLL, 2015; REHMAN et al., 2016).

Apesar de possuir uma pequena massa atômica (10 carbonos), os monoterpenos possuem notável diversidade estrutural devido, principalmente, ao grupo composto intermediário, o geranyl difosfato. Dessa forma, esse intermediário, através de uma série de reações catalisadas por enzimas, incluindo ciclização, hidroxilação, desidrogenação, oxidação e/ou redução, isomerização e conjugação, tem sido o responsável pelas pesquisas que tentam avaliar a atividade farmacológica dos monoterpenos (HABTEMARIAM, 2018).

Muitos dos monoterpenos conhecidos e seus derivados foram estudados quanto às suas atividades farmacológicas. Essas moléculas demonstraram atividade antioxidante, antiagregante, propriedades anti-inflamatórias, anticoagulantes, sedativas e analgésicas. Além

das atividades farmacológicas, também são rotineiramente empregados na indústria de alimentos, bebidas e perfumaria (WOJTUNIK-KULESZA, 2022).

O óleo essencial de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) e seus compostos têm sido utilizados popularmente no tratamento de distúrbios de saúde que acometem o SNC, incluindo insônia. Os efeitos ansiolíticos do OE dessa planta foi atribuído ao (-)-mirtenol (MIR), um álcool monoterpênico. Os animais submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE) entraram mais vezes nos braços abertos do labirinto, bem como permaneceram mais tempo nesse espaço. Os resultados desse estudo também sugeriram que o MIR apresenta atividade ansiolítica devido a mediação da transmissão GABAérgica, pois o antagonista dos GABA_ARs, o flumazenil, foi capaz de reverter o efeito ansiolítico-símile.

Pulegona é um composto monoterpênico encontrado em muitas plantas, como no óleo essencial de *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta). O óleo de hortelã-pimenta tem sido usado em práticas de medicina alternativa, como aromaterapia, e tem sido alegado ter efeitos benéficos no tratamento de doenças mentais, dentre elas benefícios na ansiogênese de camundongos, contudo o efeito ansiolítico pode não estar envolvido com a modulação GABAérgica (SILVEIRA et al., 2014).

O linalol (2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol) é um álcool monoterpêno aromático amplamente encontrado em óleos essenciais e amplamente utilizado em perfumes, cosméticos, produtos de limpeza domésticos e aditivos alimentares. Uma revisão abordou as propriedades farmacológicas do linalol e concluiu que esse monoterpêno possui diversos efeitos no sistema nervoso central, via interação com alguns neurotransmissores (APROTOSOAIE et al., 2014), a exemplo do GABA, resultando em um efeito inibitório sobre o SNC. O linalol também pode inibir a transmissão glutamatérgica através de antagonismo competitivo do NMDAR (SHAW et al., 2020). Um estudo clínico avaliou o efeito da inalação dos enantiômeros (R)-(-)- e (S)-(+)-linalol, em humanos sob estresse experimental, e confirmou que ambos os enantiômeros de linalol exercem um efeito relaxante (HÖFERL et al., 2006).

As propriedades ansiolíticas dos óleos essenciais cítricos, encontrados em *Citrus aurantium* L., por exemplo, já foram demonstrados em estudos não clínicos com camundongos, sendo o principal componente químico desse OE o monoterpêno limoneno. Lima et al. (2013) ao investigarem os efeitos ansiolítico-símile do (+)-limoneno, administrado a camundongos por inalação, observou que houve modificação significativa de todos os parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado.

A Carvona (p-menta-6,8-dien-2-one) é uma cetona monoterpenoide quirál que pode ser obtida a partir de processos de destilação. Existe naturalmente em duas formas enantioméricas: S(+)-carvona (o principal componente do óleo essencial de *Carum carvi* e R(-)-carvona (que está presente no óleo essencial de *Mentha spicata*). (R)-(-)-carvona apresenta atividade exerceu efeitos ansiolíticos em animais submetidos ao labirinto em T elevado (HATANO et al., 2012), bem como diminuíram a hiper-estimulação causada pela administração do metilfenidato, indicando um efeito sedativo (NOGOCEKE et al., 2016).

O 1,8-cineol é um éter monoterpeno presente em óleos essenciais de muitas plantas, como eucalipto e alecrim. Várias atividades farmacológicas já foram atreladas a esse monoterpeno, dentre elas a atividade sedativa. Essa atividade foi investigada por Dougnon e Ito (2020) a partir de modelos *in vivo* (teste claro escuro e o teste de esconder esferas), os quais obtiveram resultados sugestivos de efeito ansiolítico-símile dessa substância. A reversão do efeito pelo antagonista flumazenil sugere um possível envolvimento dos receptores GABA_A.

O α -pineno, principal monoterpeno encontrado em óleos essenciais do pinheiro, pertence a um grupo de hidrocarbonetos de terpenos com um forte odor de terebintina. A literatura aponta um efeito ansiolítico e hipnótico após a inalação dessa substância (SATO et al., 2014). Registro eletrofisiológico *ex vivo* de fatias de cérebro e estudos *in silico* demonstraram que o (-)- α -pineno melhorara o sono através de uma ligação direta aos receptores GABA_A, atuando como um modulador parcial no sítio de ligação BZD.

Um estudo controlado demonstrou que a administração transdérmica do OE de rosa (*Rosa damascena* Mill.) diminuiu frequência respiratória, pressão arterial e saturação de oxigênio no sangue, consistente com um efeito relaxante (MOHEBITABAR et al., 2017). O óleo de rosa é composto principalmente pelos monoterpenoides citronelol (13–53%), geraniol (7–27%), nerol (0–16%), 2-feniletanol (1–10%), nonadecano (2–25%) e heneicosano (1-9%) [52]. Vários relatórios sugerem que o citronelol e o geraniol são capazes de reduzir a ansiedade, estresse e depressão em pacientes. O citronelol é um monoterpeno álcool acíclico e o seu possível efeito ansiolítico pode ser devido a sua interação com o GABA_AR (UMEZU, 2000; AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2020).

Estudos com os monoterpenos presentes na planta *Melissa officinalis*, geranial, neral, citronelal e geraniol, demonstram, a partir de estudos *in vivo* utilizando camundongos, que essas substâncias podem ser as responsáveis pelo efeito sobre algumas doenças que atingem o SNC, como a ansiedade e a depressão (GHAZIZADEH et al., 2020; PETRISOR et al., 2022).

2.5 Hidroxicitronelal

O hidroxicitronelal (HC) (3,7-dimetil-7-hidroxiocetanal) é um monoterpreno usado como ingrediente de fragrâncias e é encontrado em uma ampla variedade de produtos de consumo. É utilizado na indústria de cosméticos, saneantes e inseticidas, empregado nas mais variadas concentrações. Na Europa, o HC é produzido principalmente dentro da União Europeia, cerca de 88 toneladas/ano. O HC pode ser obtido a partir da hidroxilação de outro monoterpreno, o citronelal (Figura 3) (OSÓRIO, 2011).

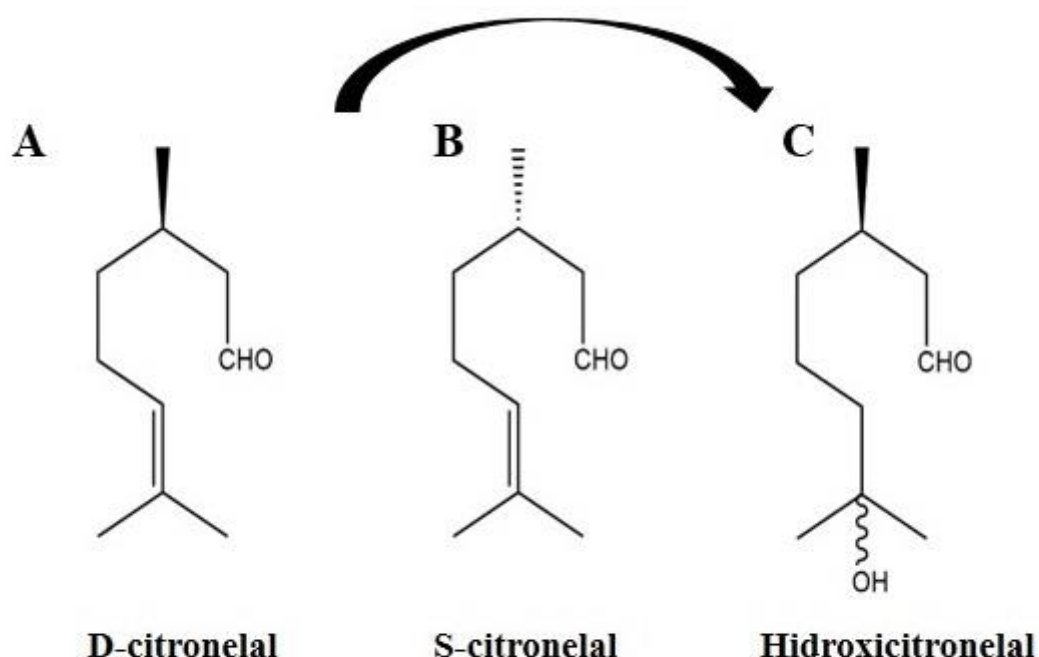


Figura 3 - Isômeros D-citronelal (A) e S-citronelal (B). A mistura racêmica desses isômeros da origem ao citronelal. Esse por sua vez, origina o hidroxicitronelal (C).

Fonte: Adaptado de Silva et al., 2022.

O monoterpreno citronelal (3,7-dimetil-6-octen-1-al) é o principal componente dos OE de várias espécies aromáticas, como *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Java citronela), *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill (eucalipto-limão) e *C. nardus* L (citronela). Este monoterpreno apresenta muitas aplicações na medicina popular e na aromaterapia, além de ser usado nas indústrias de cosméticos e sabão (MELO et al., 2010).

O HC ainda não possui muitos trabalhos que abordem as suas eventuais propriedades farmacológicas. Estudos atribuem atividade antifúngica (OLIVEIRA-FILHO et al., 2017), gastroprotetora (OSÓRIO, 2011), antimicrobiana (BEZERRA et al., 2019).

Contudo, devido a sua semelhança estrutural com outros monoterpenos com atividade sedativa sobre o SNC, e devido ao fato de que estruturas terpenoides demonstram um forte efeito modulatório sobre os receptores GABA_A do subtipo $\alpha 1\beta 2$, essa substância tem sido alvo de estudos inéditos (ANDRADE et al., 2021). Assim, terpenos com estruturas químicas (ou seja, a presença de grupos hidroxilas e um caráter cíclico (mono ou bicíclico), podem mediar mecanismos sedativos ou ansiolíticos envolvendo Receptores GABA_A (WANG; HEINBOCKEL, 2018).

2.6 Modelos animais utilizados para avaliar a atividade ansiolítica de novas substâncias

Um modelo dito experimental é descrito como um sistema ou protocolo que utiliza (ou não) uma espécie animal com a finalidade de replicar características humanas. Dessa forma, modelo é qualquer representação de um fenômeno complexo em uma forma mais simples, o que permite testar hipóteses dificilmente isoladas em humanos pela coexistência de outras variáveis biológicas (SILVA et al., 2012).

Assim, os modelos animais são empregados nos mais diferentes ramos da ciência já que possibilitam um melhor conhecimento da fisiologia, da fisiopatologia das doenças, da ação de medicamentos e dos efeitos das intervenções cirúrgicas. O respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em animais viabiliza o emprego do modelo animal que deve ser, funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Os modelos animais que avaliam a atividade ansiolítica-símile de novas substâncias procuram provocar reações adversas de medo e diminuição do comportamento exploratório no animal ao imitar uma situação ambiental que induz aversão ou desconforto. Os padrões comportamentais e as reações fisiológicas desencadeadas devido ao contato com essas situações de perigo em potencial são utilizados como medidas de ansiedade. Essa abordagem passou a ser chamada de análise etofarmacológica da ansiedade, uma vez que envolve a manipulação de fármacos (NUNES; HALLAK, 2014).

O teste do campo aberto (CA) permite a análise de parâmetros de locomoção e de variáveis associadas à ansiedade em roedores. O teste baseia-se na teoria de que os roedores

são conflitados pela motivação em explorar versus a aversão a ambientes novos e abertos e, dessa forma, investiga a atividade exploratória do animal na presença de um novo ambiente (PYTKA et al., 2016).

De maneira semelhante ao teste do campo aberto, o aparato do labirinto em cruz elevado (LCE) é fundamentado na aversão natural de roedores a espaços abertos. Assim, os perfis de comportamento mimetizados no labirinto em cruz são equivalentes aos de neofobia, sendo assim, o aparelho é frequentemente referido como um modelo de conflito comportamental espontâneo não-condicionado, sendo observados medidas espaço-temporais e comportamentais (BRITO et al., 2017).

O teste do claro-escuro é também modelo de conflito, o qual se baseia na tendência natural a explorar ambientes novos versus a esquiva de tais ambientes graças à possibilidade potencial da presença de estímulos aversivos. Nesse teste são avaliados componentes ansiogênicos expressados em comportamentos como a menor exposição ao compartimento claro da caixa e o menor número de alternâncias entre ambos compartimentos (DA SILVA et al., 2018). Tanto o teste do labirinto em cruz elevado, quanto o teste do claro-escuro são úteis para avaliar os mecanismos neurais de ação de compostos com atividade ansiolítica. (GAUTAM et al., 2013).

Tendo em vista a necessidade de se descobrir novas substâncias com potencial ansiolítico, devido a grande quantidade de efeitos adversos causados pelos fármacos disponíveis no mercado, os óleos essenciais, por serem compostos por diversas substâncias, podem ser explorados com essa finalidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade ansiolítica-símile do hidroxicitronelal e o possível envolvimento da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Estimar a toxicidade não clínica do composto;
- b) Verificar a ocorrência da atividade miorrelaxante do hidroxicitronelal usando o teste *rota rod*;
- c) Investigar a atividade ansiolítica-símile do hidroxicitronelal empregando os testes labirinto em cruz elevado, campo aberto e placa perfurada;
- d) Demonstrar o envolvimento de vias neuronais, inibitórias e excitatórias, na resposta do tipo ansiolítico-símile *in vivo* e *in silico*.
- e) Predizer as características farmacocinéticas do HC utilizando ferramentas computacionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Psicofarmacologia (PSIFARM) e no Laboratório de Quimioinformática, com a colaboração dos professores Dr. Marcus Tullius Scotti e Dra. Luciana Scotti. Os laboratórios situados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* adultos machos, para avaliação farmacológica e fêmeas para estimar a DL50, pesando entre 25 e 35g, obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram mantidos com livre acesso a ração do tipo *pellets* e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola, sendo mantidos os ciclos claros/escuros de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 as 18:00 horas e pesados antes da realização dos testes. Ao iniciar os testes, as bancadas e os aparatos utilizados eram limpos com álcool a 70% (v/v) e após a retirada dos animais, utilizava-se álcool a 10% (v/v) para eliminar possíveis odores deixados pelos mesmos. Os experimentos foram conduzidos a tarde, entre os horários de 12:00 e 17:00.

Antes de cada experimento, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições monitoradas de temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), no laboratório de psicofarmacologia, por um período de 24 horas. Tal medida foi tomada no intuito de proporcionar a adaptação do animal ao laboratório, diminuindo consequentemente possíveis influências nos testes comportamentais.

Para reduzir o sofrimento dos animais foram respeitados os tempos limites de exposição do animal aos estímulos dos testes. Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

O projeto foi aprovado pelo CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, sob licença nº 1854110719, com período de vigência de 09/2019 a 12/2023 (Anexo 1).

4.3 Substâncias

O HC foi adquirido na empresa Sigma-Aldrich® ChemicalCo. (St. Louis, MO, USA). Diazepam e flumazenil foram doados pelo laboratório farmacêutico brasileiro, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos, LTDA (Itapira, SP, BR). Todas as substâncias foram emulsificadas com Tween 80 (5%) e administradas por via intraperitoneal (i.p.) em um volume total de 0,1 mL/10 g. O grupo controle recebeu o veículo (Tween 80 – 0,5% em solução salina a 0,9%).

4.4 Delineamento da pesquisa e Protocolos experimentais

A seguir (Figura 4) encontram-se descritas as metodologias empregadas para a avaliação da atividade ansiolítica-símile do hidroxicitronelal (HC).

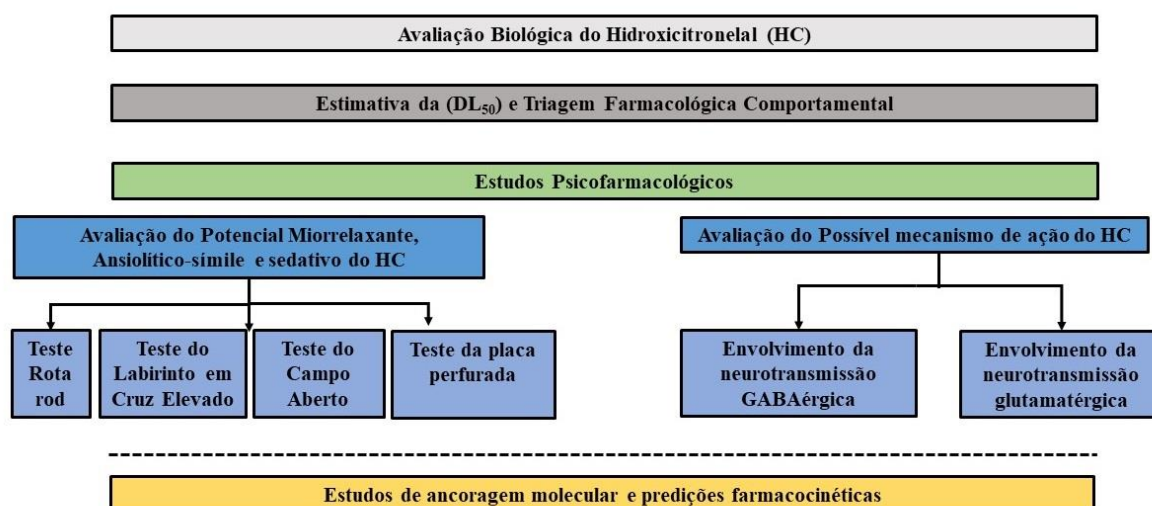


Figura 4 - Desenho esquemático dos testes realizados para a avaliação da atividade ansiolítica-símile do hidroxicitronelal.

Fonte: autor (2022).

4.5 Testes *in vivo*

4.5.1 Estimativa da DL_{50} do hidroxicitronelal e triagem farmacológica

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001 (Figura 5). Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram tratados com doses únicas de 300 ou 2000 mg/kg do HC. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina (0,9% + Tween 0,5%) por via intraperitoneal.

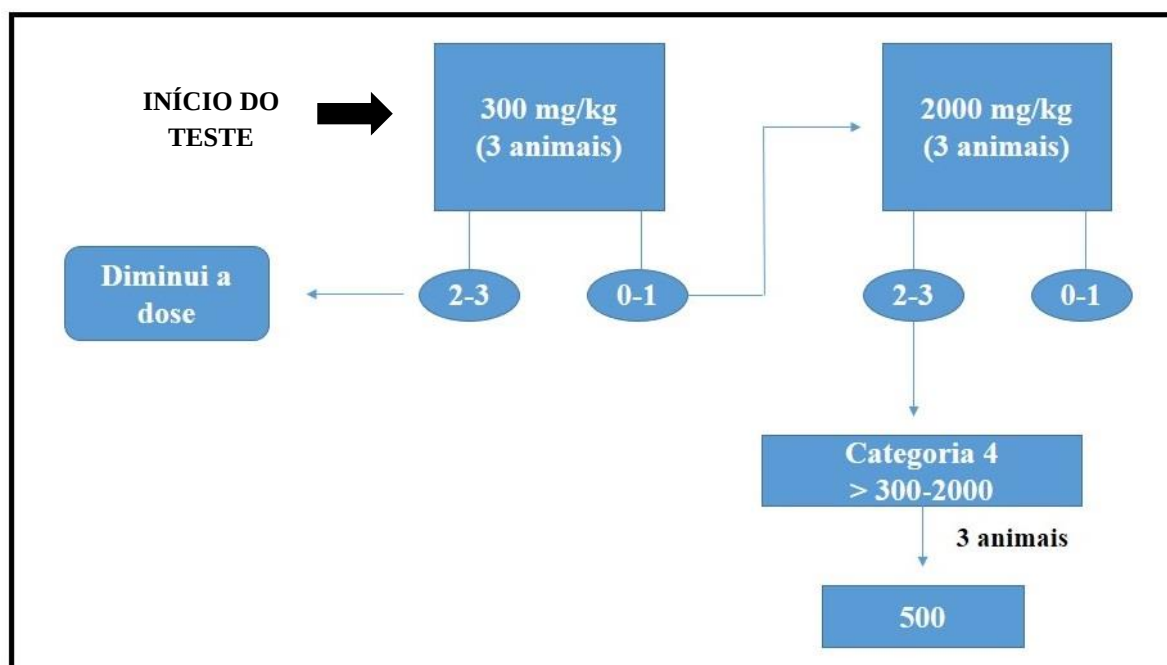


Figura 5 - Protocolo seguido para a estimativa da DL_{50} (dose letal 50%) da substância hidroxicitronelal (HC). Foi administrada a dose inicial de 300 mg/kg, em seguida, devido a não observação de morte dos animais, aumentou-se a dose, sendo administrado 2000 mg/kg da substância. Devido a ocorrência de morte dos animais, não houve mais aumento da dose.

Fonte: OECD (2001).

Após a administração, foram realizadas observações nos primeiros 30 min, 1h, 2h, 4h, com a finalidade de realizar uma triagem farmacológica, de acordo com o anexo 2 (ALMEIDA, 2006) e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia após a administração. Ao final do período de observação o número de animais mortos em cada grupo foi contabilizado para

estimativa da toxicidade não clínica. A escolha das doses utilizadas no estudo levou em consideração a estimativa da dose letal (Figura 6).

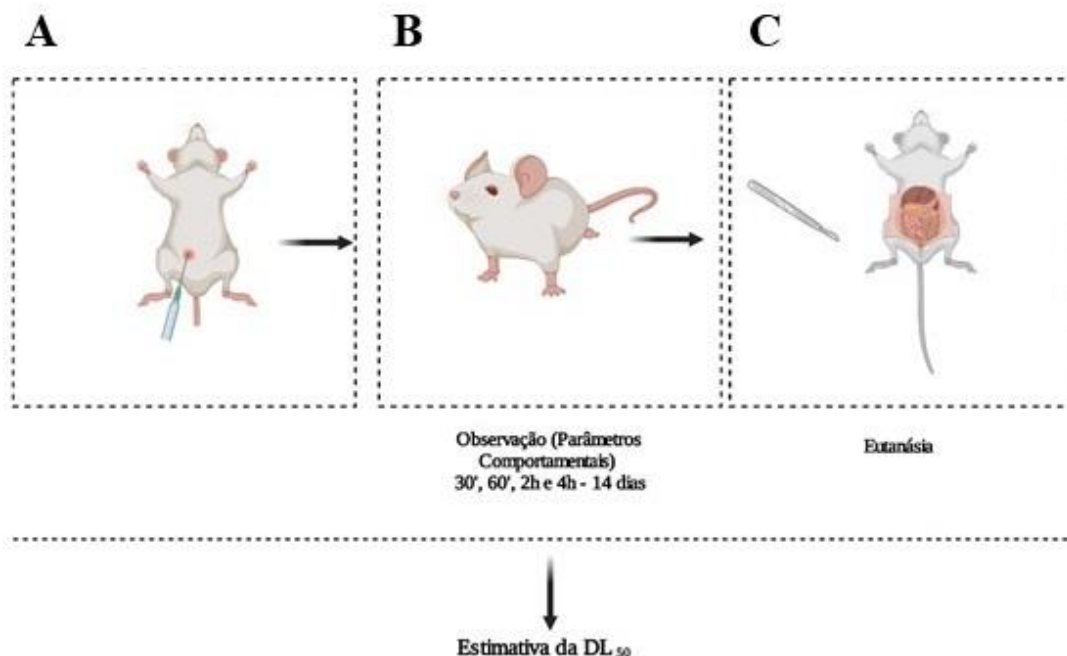


Figura 6 - Avaliação de parâmetros comportamentais desenvolvidos pelos animais após a administração do hidroxycitronelal nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg. Inicialmente houve a administração da dose (A), em seguida a observação de parâmetros comportamentais (B), e em seguida, a eutanásia e visualização macroscópica dos órgãos (C).

Fonte: autor (2022).

4.5.2 Rota Rod

Esta metodologia avalia o possível comprometimento motor dos animais, após a administração de substâncias com potencial ação no SNC. Os animais foram expostos ao aparato 24 h antes do teste. Os animais que conseguiram ficar na barra rotatória (10 rpm) por um período de 1 minuto foram selecionados para o teste (Figura 7). Os animais pré-selecionados (n=8/grupo) foram tratados (i.p.) e divididos nos grupos controle negativo (0,9% + Tween 0,5%), diazepam (4 mg/kg) ou HC (12,5, 25 e 50 mg/kg), e 30, 60, e 120 minutos depois, os animais foram colocados na barra rotatória para avaliar o tempo de permanência na mesma. Para cada animal, o tempo máximo de permanência na barra foi 3 minutos (PULTRINE; GALDINO; COSTA, 2006; DUNHAM, MIYA, 1957).

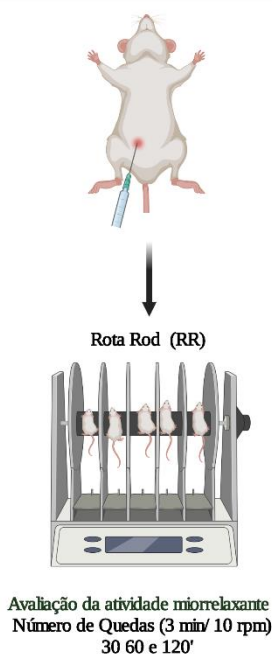


Figura 7 - Protocolo experimental do teste rota rod. Após a administração das substâncias aos respectivos grupos experimentais, os animais foram submetidos a barra giratória.

Fonte: autor (2022).

4.5.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Essa metodologia utiliza uma combinação de ambiente (abertos e elevados) (Figura 8), com a finalidade de gerar mudanças comportamentais no animal, normalmente relacionadas a sensação de ansiedade em humanos (PELLOW; FILE, 1986). Foram utilizados grupos de camundongos (n=8/grupo). As substâncias controle negativo (0,9% + Tween 0,5%), diazepam (1 mg/kg) ou HC (12,5, 25 e 50 mg/kg) foram administradas por via intraperitoneal. Após 30 minutos, cada animal foi colocado individualmente na plataforma central do aparato, de frente para o braço aberto. Os parâmetros comportamentais observados foram: número de entradas e tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos e fechados. Foi considerada como entrada quando o animal encontrava-se com as quatro patas fora da linha central do labirinto (PELLOW et al., 1985).

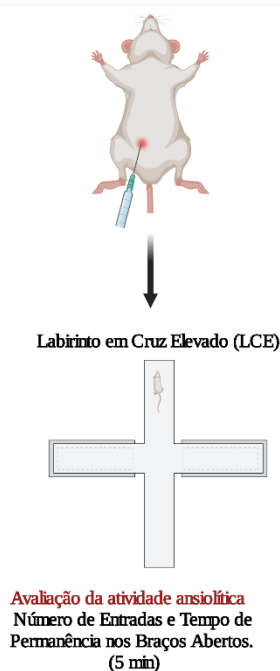


Figura 8 – Protocolo utilizado no teste do labirinto em cruz elevado. Após a administração das substâncias aos respectivos grupos experimentais, os animais foram submetidos ao LCE.

Fonte: autor (2022).

4.5.4 Campo Aberto (CA)

O modelo do campo aberto mensura alterações comportamentais dos grupos experimentais, colocados numa arena restrita por uma parede circular (Figura 9). Assim, o teste de CA é utilizado para avaliar ansiedade e comportamento exploratório de ratos frente ao ambiente não familiar (BELVIRANLI et al., 2017). Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e avaliados por um período de 5 minutos. Para o procedimento experimental, foram utilizados grupos de 8 camundongos. O HC (12,5, 25, 50 mg/kg), controle negativo (0,9% + Tween 0,5%) e diazepam (1 mg/kg) foram administrados pela via intraperitoneal. Após o tratamento (30 minutos), cada animal foi submetido individualmente ao aparelho. Foi registrado o número total de quadrantes percorridos (cruzamentos), levantamentos (*Rearing*) e o tempo despendido com a autolimpeza (*Grooming*) (ARCHER, 1973).

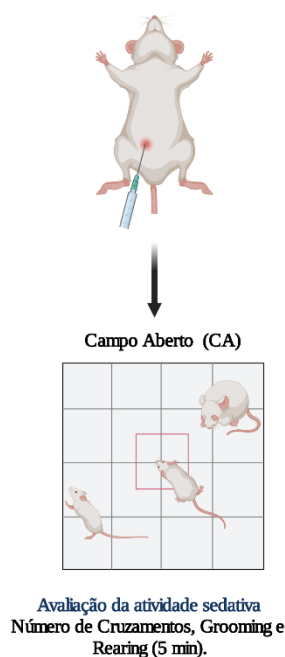


Figura 9 - Teste do campo aberto. Após a administração das substâncias aos respectivos grupos experimentais, os animais foram submetidos ao CA.

Fonte: autor (2022).

4.5.5 Placa perfurada (PP)

Este modelo baseia-se na atividade natural de exploração de camundongos quando expostos a um ambiente estranho (Figura 10). Quando o animal está sob efeito de uma substância ansiolítica, ocorre um aumento do comportamento de mergulhar a cabeça nos furos da placa (PELLOW, 1986). Para o procedimento experimental, foram utilizados grupos de 8 camundongos. O HC (12,5, 25, 50 mg/kg), controle negativo (0,9% + Tween 0,5%) e diazepam (1 mg/kg) foram administrados pela via intraperitoneal. Meia hora após a administração dos tratamentos, cada animal individualmente foi colocado no centro da placa perfurada e observado por 5 minutos. Foram contabilizados o número de vezes que o animal mergulhou a cabeça nos furos da placa, bem como o número de vezes que o animal cruzava os quadrantes da mesma. Os mergulhos foram considerados válidos quando a cabeça abaixou pelo menos o suficiente para os olhos estarem imersos no orifício.

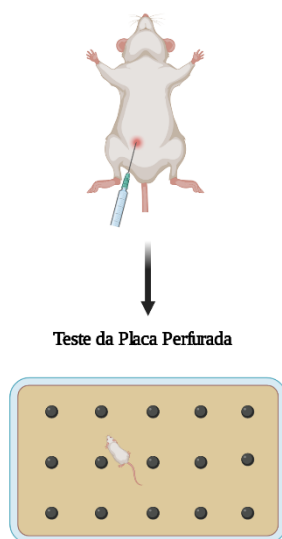


Figura 10 - Teste da placa perfurada. Após a administração das substâncias aos respectivos grupos experimentais, os animais foram submetidos PP.

Fonte: autor (2022).

4.5.6 *Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica*

Esse teste foi realizado com o objetivo de avaliar o possível envolvimento dos receptores GABA_A no efeito ansiolítico-símile da substância. Os animais foram divididos em cinco grupos (n=8/grupo), controle negativo (0,9% + Tween 0,5%), diazepam (1 mg/kg) e HC (12,5 mg/kg), os quais foram pré-tratados, 30 min antes, com flumazenil (10 mg/kg), um antagonista dos receptores GABA_A. Após 20 minutos, os animais foram submetidos ao modelo do labirinto em cruz elevado. Os parâmetros comportamentais observados foram: número de entradas e tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos. Foi considerada como entrada, quando o animal encontrava-se com as quatro patas em um dos dois braços abertos do labirinto (BIALA; KRUK, 2008).

4.5.7 *Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica*

Esse teste foi realizado com o objetivo de avaliar o possível envolvimento dos NMDAR no efeito ansiolítico-símile da substância. Os animais foram divididos em cinco grupos (n=8/grupo): controle negativo (0,9% + Tween 0,5%); diazepam (1 mg/kg); HC (6,25 mg/kg); cetamina (1 mg/kg i.p. sub-ativa; antagonista dos NMDAR); cetamina (1 mg/kg i.p. sub-ativa; administrada 1 hora antes) + HC (6,25 mg/kg) (WANG et al., 2019). 30 minutos após o tratamento, os animais foram submetidos ao modelo do LCE. Os parâmetros comportamentais observados foram: número de entradas e tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos.

4.6 **Testes *in silico***

4.6.1 *Docking molecular*

O docking molecular foi utilizado para investigar a interação com o receptor do composto Hidroxicitronelal que contribua para efeito ansiolítico através da afinidade de ligação dos compostos e os alvos selecionados no estudo. Para isso foi realizado um rastreamento com diversas proteínas envolvidas para esses efeitos. As estruturas 3D das enzimas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEIN et al., 1977). As proteínas selecionadas e informações detalhadas sobre elas podem ser visualizadas na tabela 1. Inicialmente, todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina e o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das posturas, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å.

4.6.1.1 Modelagem por homologia

As sequências alvo foram obtidas como sequências de aminoácidos no formato FASTA e importadas do site SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (WATERHOUSE et al., 2018). Para cada molde identificado, a qualidade foi prevista a partir de recursos de alinhamento, como ProMod3, QMEAN e GMQE. A qualidade estereoquímica dos modelos foi avaliada pelo servidor da Web PSVS (suíte de software de validação de estrutura de proteínas)

(http://psvs-1_5-dev.nesg.org/), usando PROCHECK. PROCHECK gera um gráfico Ramachandran (LOVELL et al., 2003), que determina as regiões permitidas e não permitidas da cadeia principal de aminoácidos.

4.6.1.2 Alinhamento de sequências proteicas

Foi realizado um alinhamento global com a sequência de uma proteína com estrutura tridimensional conhecida, usando a ferramenta web Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que alinha todas as sequências proteicas inseridas por um usuário. O alinhamento facilitou a investigação do sítio ativo e a determinação da similaridade e a identidade compartilhada entre as proteínas (BERNSTEIN et al., 1977).

4.6.1.3 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0

Foi utilizado o software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) com os parâmetros predefinidos no mesmo software. O ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da proteína, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 iterações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corre. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp².

Tabela 1 - Informações sobre as proteínas receptor GABA_A e receptor NMDA selecionadas, com a finalidade de observar a interação do HC com esses alvos.

Proteína	PDB ID/Homologia	Ligante	Resolução
Receptor GABA _A	6X3X	Diazepam	2.92 Å
Receptor NMDA	4PE5	Cetamina	3.96 Å

Fonte: autor (2022).

4.6.2 *Dinâmica molecular*

Para realizar as simulações de dinâmica molecular foi utilizado o software GROMACS 5.0 (BERENDSEN et al., 1995; ABRAHAM et al., 2015). A topologia dos ligantes foi preparada usando o gerador de topologia ATB (<https://atb.uq.edu.au/>) (MALDE et al., 2011) aplicando o campo de força GROMOS96 54a7. A topologia da proteína também foi preparada usando o campo de força GROMOS96 54a7 no GROMACS. A simulação da dinâmica molecular foi realizada usando o modelo de água SPC de carga pontual estendida em uma caixa cúbica (BONDI, 1964). O sistema foi neutralizado pela adição de íons (Cl^- e Na^+) sendo também balanceado em 300K usando o algoritmo V-rescale em 100ps representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por equilíbrio a 1 atm de pressão usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (partículas numéricas constantes pressão e temperatura) até 100ps. As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 etapas a 10ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável perto da estrutura experimental, o deslocamento médio da raiz quadrada (RMSD) de todos os átomos de Ca foi calculado em relação às estruturas de partida. Flutuações residuais (RMSF) também foram analisadas para entender o papel dos resíduos próximos ao local de ligação do receptor. Os gráficos de RMSD e RMSF foram gerados no software Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

4.6.3 *Predições farmacocinéticas*

As predições farmacocinéticas foram obtidas através das plataformas eletrônicas: SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça) e Xenosite (Universidade de Medicina de Washington, Estados Unidos), disponibilizadas gratuitamente. Para interface dos modelos preditivos foi necessário que as estruturas estivessem no formato smiles, sendo geradas pelo software Chemdraw Ultra 12.0 (DAINA et al., 2017).

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando o método de análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, devido a distribuição normal e homoscedático dos dados, para comparação entre as médias. Os dados foram expressos como média $\pm$ S.E.M. (erro padrão da média) e foi adotado nível de confiança de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes *in vivo*

5.1.1 Estimativa da DL_{50} do hidroxycitronelal e triagem farmacológica

Para estimar a DL_{50} do composto HC foi realizado o teste de toxicidade oral aguda segundo o protocolo 423 da OEDC (2001) com adaptações. Administrou-se o HC na dose de 300 mg/kg, i.p., a qual não causou a morte dos animais. Após isso, foi administrado o HC na dose de 2000 mg/kg, i.p., havendo a morte de todos os animais. Diante de tais resultados foi possível estimar que o valor aproximado da DL_{50} da substância testada (HC) é de 500 mg/kg, por via intraperitoneal.

A partir desse resultado, optou-se pela utilização do HC nas doses 12,5, 25 e 50 mg/kg na condução dos testes farmacológicos *in vivo*, uma vez que, doses abaixo da menor dose escolhida não apresentaram atividade farmacológica do tipo ansiolítica-símile. Doses maiores do que 50mg/kg, apresentaram um platô na curva dose-efeito. Assim, a escolha de doses abaixo dos valores da DL_{50} visa uma menor probabilidade de causarem toxicidade.

Com o auxílio do protocolo para a realização da triagem farmacológica observou-se que os animais ao longo das primeiras 4 horas, não desenvolveram reações adversas que inviabilizassem a utilização da substância (Tabela 2).

Tabela 2 - Alterações comportamentais observadas nos animais após a administração do hidroxicitronelal (HC) na dose de 300 mg/kg: ((-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito presente intenso)).

300 mg/kg	30 min	Sedação (+) Analgesia (+) Ambulação diminuída (+) Levantar (+) Escalar (+) Reflexo do endireitamento (++) Limpeza (+) Força de agarrar (++)
	1 h	Sedação (+) Analgesia (+) Ambulação diminuída (+) Levantar (++) Escalar (++) Reflexo do endireitamento (++) Limpeza (++) Força de agarrar (++)
	2 h	Sedação (-) Analgesia (-) Ambulação diminuída (-) Levantar (++) Escalar (++) Reflexo do endireitamento (++) Limpeza (++) Força de agarrar (++)
	3 h	Sedação (-) Analgesia (-) Ambulação diminuída (-) Levantar (++) Escalar (++) Reflexo do endireitamento (++) Limpeza (++) Força de agarrar (++)
	4 h	Sedação (-) Analgesia (-) Ambulação diminuída (-) Levantar (++) Escalar (++) Reflexo do endireitamento (++) Limpeza (++) Força de agarrar (++)

Fonte: dados da pesquisa (2019).

No teste inicial de toxicidade aguda, durante o período de observação de 14 dias, não foi constatada nenhuma alteração que caracterizasse indícios de toxicidade aparente, como alteração na pele, no pelo, nos olhos, bem como no sistema respiratório, dados estes que mostram que o HC apresenta baixa toxicidade nas condições avaliadas, mesmo quando administrado por via i. p., o que forneceu subsídios para a realização de ensaios farmacológicos *in vivo*, permitindo a escolha de doses seguras para a realização destes testes (ALMEIDA et al., 2012).

Ao avaliar-se a toxicidade aguda de alguns monoterpenos, observa-se que os mesmos necessitam ser administrados em altas doses para que se observe fenômenos de toxicidade. Avaliando o teste de toxicidade aguda, utilizando o monoterpeno esquizonepetina, observou-se que a DL_{50} foi de 478 mg/kg. Além disso, não houve alteração de órgãos, peso corporal e consumo alimentar (LIU et al., 2012). Já após a administração oral aguda do monoterpeno 1-8-cineol, a estimativa da DL_{50} foi de 3849 mg/kg, não havendo, também, diferenças significativas do peso corporal e do peso relativo dos órgãos entre o grupo controle e os grupos de tratamento com 1,8-cineol (XU et al., 2014). Vitória et al. (2014) demonstraram que a administração oral do monoterpeno citronelal, nas doses de 200 e 400 mg/kg de peso, não causou a morte de nenhum animal, após observação por 72h.

5.1.2 Rota rod

Não foram observadas diferenças significativas no tempo de permanências dos animais na barra giratória, após a administração do HC i.p., nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, após 30 minutos ($179,3 \pm 0,3$, $173,3 \pm 2,4$, $173,5 \pm 1,3$), 60 minutos ($180,0 \pm 0,0$, $180,0 \pm 0,0$, $180,0 \pm 0,0$) e 120 minutos ($180,0 \pm 0,0$, $180,0 \pm 0,0$, $180,0 \pm 0,0$), quando comparados ao grupo

controle, nos tempos estabelecidos, aos 30 minutos ($177,5 \pm 0,9$) 60 minutos ($180,0 \pm 0,0$) e 120 minutos ($175,8 \pm 1,7$) (Figura 11).

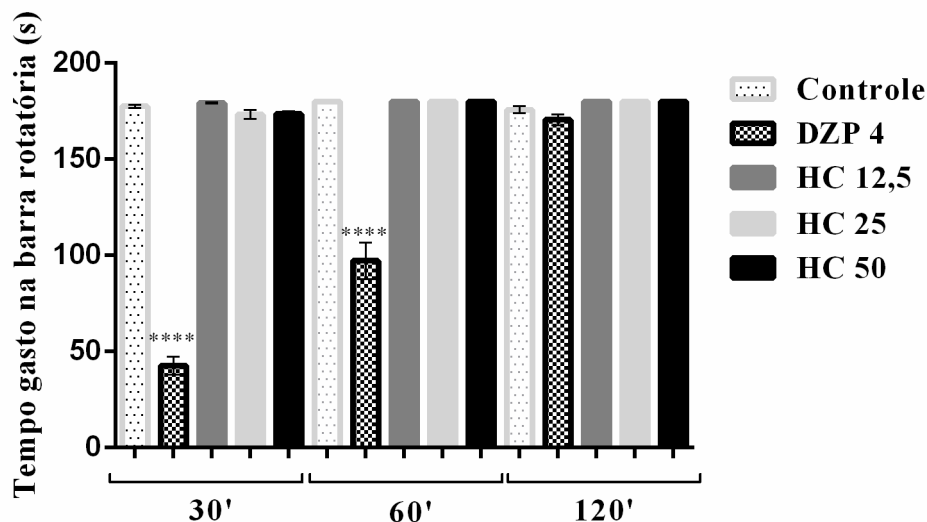


Figura 11 - Efeito do HC (i.p.) no tempo de permanência dos animais no rota-rod. A coluna representa a média $\pm$ E.P.M. (n = 8/grupo). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: (HC) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

As alterações comportamentais induzidas após a administração do HC (i.p.) foram avaliadas através dos testes da barra giratória, labirinto em cruz elevado e o campo aberto, sendo estes testes bem estabelecidos no estudo de substâncias com atividade no sistema nervoso central. Com exceção do teste da barra giratória, são modelos animais que se baseiam na observação de comportamentos inatos, ou seja, na etologia dos roedores.

O *Rota rod* é um clássico modelo utilizado para avaliar a influência de substâncias desconhecidas sobre a coordenação motora dos animais (DUNHAM; MIYA, 1957) promovida por agentes como os benzodiazepínicos e anestésicos (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). O modelo é realizado para eliminar a possível interferência da substância administrada sob a coordenação motora.

A utilização do diazepam (DZP) como controle permite a comparação do possível comprometimento da coordenação motora após a administração do HC com um dos medicamentos que é referência no tratamento da ansiedade e que é responsável por um dos efeitos colaterais mais relatados, que é o comprometimento do equilíbrio ou coordenação motora, possivelmente devido a neurotoxicidade dessas substâncias, restringindo, assim, a qualidade de vida dos pacientes que utilizam esses medicamentos (PREVOT et al., 2019).

Como foi observado no *rota rod*, a coordenação motora dos animais não foi comprometida após a administração do HC, diferente do que foi visto no grupo tratado com o DZP, o que permite inferir que o HC não comprometeu a coordenação motora dos animais no estudo. Monoterpenos como o o-eugenol (FONSÊCA et al., 2016), geraniol (COSTA et al., 2020) e acetato de periril (BRAGA et al., 2022) ao serem administrados não modificaram a locomoção desses, fato esse que permitiu a sua utilização nos estudos em questão, uma vez que compostos capazes de alterar a atividade locomotora pode prejudicar a interpretação do efeito farmacológico da substância (CAVALCANTE-SILVA et al., 2014).

5.1.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os resultados apresentados na Figura 12A mostram que os animais tratados com o HC 12,5 mg/kg ($6,6 \pm 0,3$), 25 mg/kg ($6,5 \pm 0,5$) e 50 mg/kg ($7,0 \pm 0,3$) aumentaram significativamente o número de entradas nos braços abertos do labirinto, em relação ao grupo controle ($4,3 \pm 1,0$), em 34,8%, 33,8% e 38,6%, respectivamente. O grupo tratado com Diazepam ($11,9 \pm 0,2$) também aumentou significativamente o número de entradas (63,5%) quando comparado ao controle.

Os resultados obtidos para o tempo de permanência dos animais nos braços abertos estão expostos na Figura 12B. O HC na dose de 12,5 mg/kg ($89,8 \pm 2,7$) 25 mg/kg ($102,7 \pm 9,8$) e 50 mg/kg ($104,5 \pm 6,3$) foi capaz de aumentar significativamente o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em 50,0%, 56,1% e 57,0%, respectivamente, em comparação ao grupo controle ($45,0 \pm 2,6$). O grupo ao qual foi administrado o Diazepam ($152,3 \pm 5,0$), também exibiu resultados significativos no aumento da permanência dos animais nos braços abertos do aparelho em 70,4 % em relação ao grupo controle.

A Figura 12C mostra os resultados do número de entradas, dos animais, nos braços fechados do labirinto. Os animais tratados com HC nas doses de 12,5 ($4,5 \pm 0,7$), 25 ($5,3 \pm 0,8$) e 50 ($4,7 \pm 0,9$) apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle ($12,0 \pm 1,0$), isso é, os animais entravam menos nos braços fechados do labirinto. O grupo tratado com DZP também entraram menos nos braços fechados ($2,2 \pm 0,4$).

Quanto ao tempo de permanência nos braços fechados (Figura 12D), os animais tratados com HC em doses de 12,5 ($137,5 \pm 17,6$), 25 ($163,0 \pm 7,3$) e 50 ($170,1 \pm 17,6$) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($247,5 \pm 16,0$) mostrando que os animais passaram menos tempo nos braços fechados do labirinto. O

grupo tratado com DZP também apresentou resultados significativos, com diminuição no número de entradas nos braços fechados ($185,4 \pm 0,4$).

As metodologias *in vivo*, para avaliar a atividade ansiolítica-símile de determinadas substâncias, induzem no animal comportamentos inibitórios devido ao estresse ocasionado pelo meio no qual este é submetido (CAPUTO et al., 2018). Esses comportamentos inibitórios podem ser expressos a partir da não realização de um movimento ou um aumento no tempo de imobilidade, visto que, naturalmente, os roedores são exploradores natos. Substâncias com ação ansiolítica devem ser capazes de diminuir esses comportamentos inibitórios (CAMPOS et al., 2013).

Empregando-se a metodologia do LCE, ANDRADE et al. (2020) ao avaliar o efeito ansiolítico-símile do monoterpeno álcool cinâmico, e ALVES et al. (2016) ao avaliar o ansiolítico-símile do monoterpeno R-(+)-limoneno, observaram que ambas as substâncias aumentavam o número de entradas nos braços abertos do LCE, bem como o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, concluindo-se que substâncias que apresentam potencial ansiolítico tendem a aumentar tanto o número de entradas quanto o tempo de permanência nos braços abertos do aparelho do labirinto em cruz elevado.

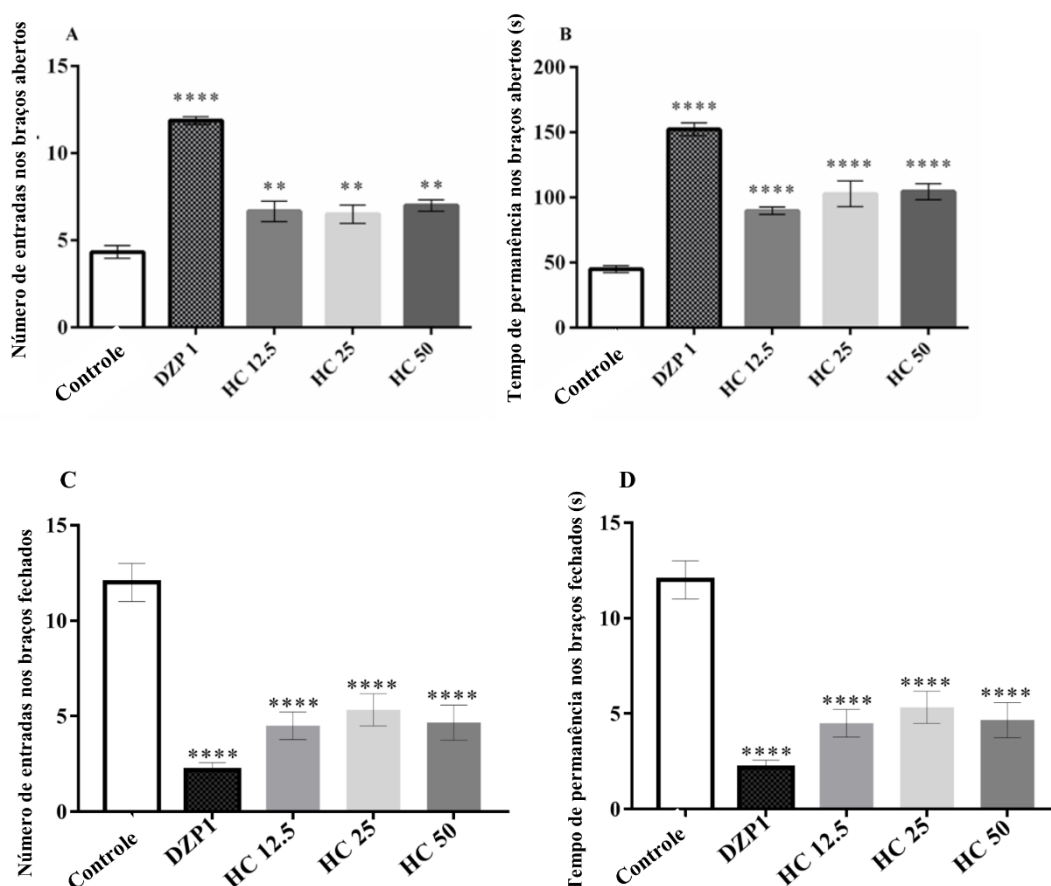


Figura 12 - Efeito do HC (i.p.) e do diazepam no número de entradas (A) e no tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos e no número de entradas (C) e no tempo de permanência (D) dos animais nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. A coluna representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 8/\text{grupo}$). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: (HC) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

Para melhor avaliar um possível efeito ansiolítico do HC, os animais foram submetidos ao modelo do LCE, o qual é considerado um dos mais bem estabelecidos testes e padrão de referência em detecção de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos (HOGG, 1996). O teste LCE induz no animal um conflito, entre explorar um ambiente novo e a tendência em evitar áreas perigosas (CAMPOS et al., 2013).

A administração do HC, nas três doses estudadas, aumentou significativamente a porcentagem de entradas e de permanência nos braços abertos do aparato, em relação ao grupo controle, indicando que a administração aguda do composto aumentou o comportamento de exploração dos animais indicando possível atividade ansiolítica nesse aparato. Esses resultados

estão de acordo com estudos que demonstraram a atividade ansiolítica dos constituintes voláteis, monoterpênicos, como o limoneno, linalol, citronelal e geranial, frente à metodologia do LCE (CAMPÊLO et al., 2011; LINCK et al., 2010; CAPUTO et al., 2018).

5.1.4 Campo Aberto (CA)

Com relação atividade locomotora dos animais nos segmentos do campo aberto, cujo resultado está apresentado na Figura 13A, foi percebido que houve um aumento significativo do grupo HC 12,5 mg/kg ($83,8 \pm 4,0$), 25 mg/kg ($82,0 \pm 10,6$) e 50 mg/kg ($71,0 \pm 7,6$) em 71,5%, 71,0% e 66,5%, respectivamente, quando comparada ao grupo controle ($23,8 \pm 1,5$). O grupo DZP ($74,2 \pm 1,5$) aumentou a ambulação dos animais em 67,9%, quando comparada ao grupo controle.

A Figura 13B apresenta os resultados obtidos do parâmetro *rearing*. Pode-se observar que os grupos HC 12,5 mg/kg ($25,8\% \pm 2,9$), 25 mg/kg ($19,1 \pm 2,5$) e 50 mg/kg ($14,0 \pm 2,9$) expressaram significativamente um aumento do comportamento de exploração vertical em 89,5%, 85,8% e 80,7%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($2,6 \pm 0,4$). O grupo DZP ($16,4 \pm 1,5$) aumentou esse mesmo comportamento em 83,4%.

Os resultados obtidos do parâmetro *grooming* podem ser observados na Figura 13C. Percebe-se que ocorreu diferença significativa no tempo de autolimpeza somente no grupo tratado com HC na dose de 25 mg/kg, i.p., ($60,3 \pm 13,6$), com uma diminuição desse parâmetro de 50,1% em relação ao grupo controle ($121,1 \pm 13,1$), e no grupo tratado com DZP ($1,2 \pm 0,2$), de 99,0%. As demais doses do HC não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

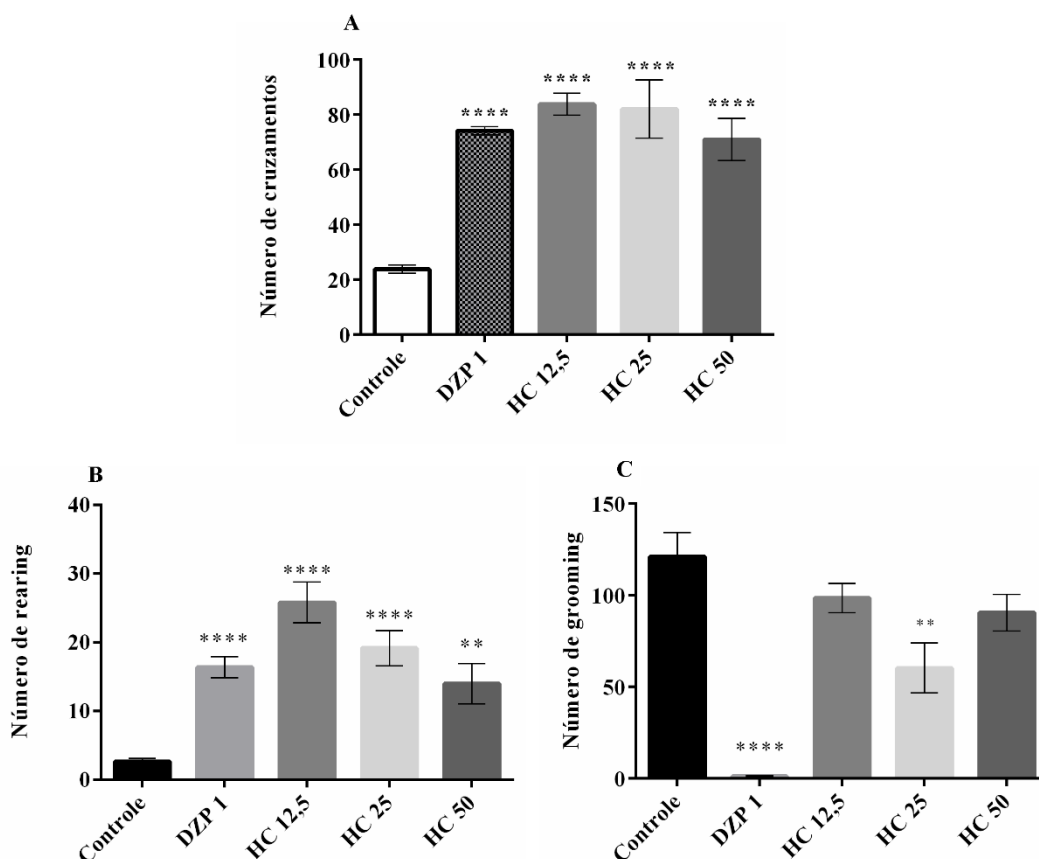


Figura 13 - Efeito do HC (i.p.) no número de cruzamentos (A), número de *rearing* (B) e número de *grooming* (C) no teste do campo aberto. A coluna representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 8$ /grupos). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: (HC) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

Além do número total de cruzamentos, outros parâmetros podem ser observados no modelo do campo aberto, como o número de respostas de autolimpeza (*Grooming*) e levantamentos verticais (*Rearing*) (KALUEFF; JENSEN; MURPHY, 2007; MACHADO et al., 2012). Ou seja, quanto maior o nível de ansiedade, menor será o número de *rearing* e maior será o número de *grooming*.

Após os tratamentos, os números de *rearing* aumentaram, significativamente, nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, em relação ao grupo controle. Já o número de *grooming* só foi diminuído quando administrada a dose de 25 mg/kg. De fato, uma redução de autolimpeza é frequentemente observada em animais tratados com compostos com potencial atividade ansiolítica (TING; FENG, 2011).

5.1.5 Placa perfurada (PP)

Os resultados da Figura 14A, referente ao número de vezes que o animal mergulhou a cabeça, totalmente, no orifício da placa perfurada, mostraram que os grupos tratados com o DZP ($31,8 \pm 1,0$), HC 12,5 ($20,8 \pm 0,8$), HC 25 ($24,5 \pm 1,6$) e HC 50 ($28,3 \pm 0,7$) mergulharam mais vezes a cabeça, com uma porcentagem de 57,0%, 34,1%, 44% e 51%, respectivamente, em comparação ao grupo salina ($13,7 \pm 1,4$).

Já em relação ao número de quadrantes cruzados pelos animais (Figura 14B), os grupos tratados com o DZP ($27,5 \pm 1,3$), HC 12,5 ($25,0 \pm 1,1$), HC 25 ($25,2 \pm 1,3$) e HC 50 ($19,3 \pm 1,1$) também tiveram um aumento significativo, sendo de 68,0%, 64,8%, 65,0% e 54%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo ($8,8 \pm 1,0$).

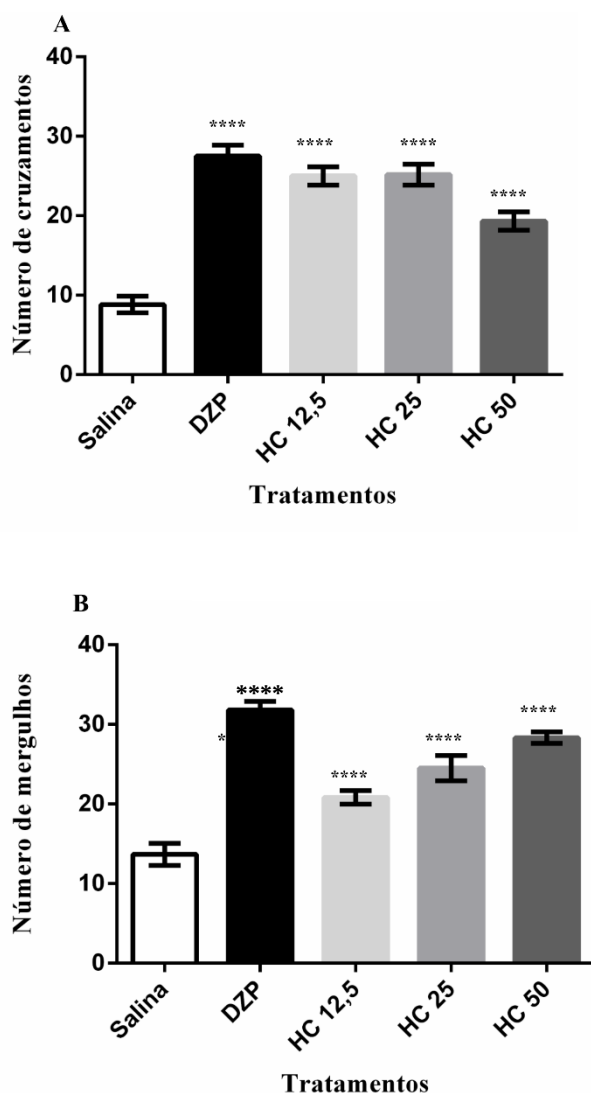


Figura 14 - Efeito do HC (i.p.) e do diazepam no número de mergulhos com a cabeça (A) e no número de cruzamento pelos quadrantes (B) dos animais na placa perfurada. A coluna

representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 8/\text{grupo}$). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: (HC) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

No modelo da placa perfurada a atividade ansiolítica é caracterizada pelo aumento do número de mergulhos de cabeça resultante do aumento de atividade exploratória (YAŞAR, 2013). Dessa forma, os resultados obtidos no teste da placa perfurada, reforçam a atividade ansiolítica-símile obtida no teste do LCE e do CA, uma vez que os animais circularam sobre o aparato com um comportamento característico de desinibição. Assim, os resultados sugerem que a substância HC possui características psicolépticas sem, necessariamente, comprometer os movimentos dos animais.

Monoterpenos presentes no OE da espécie *Citrus aurantium* L, como o limoneno, podem ser os responsáveis pelo aumento da atividade exploratória bem como o número de mergulhos realizados pelos animais, tratados com esse OE no estudo realizado por Neto (2021), o qual investigou a atividade ansiolítica desse fitocomplexo. O aparato placa perfurada também foi empregado na avaliação do monortepeno 4-terpineol, uma vez que o autor visava confirmar o perfil psicoléptico da substância (FARIAS, 2012).

5.1.6 Envolvimento da neurotransmissão GABAérgica

Os resultados da Figura 15A, referente ao número de entradas nos braços abertos do LCE mostram que o grupo flumazenil + HC 12,5 ($4,1 \pm 0,5$) apresentaram um menor número de entrada, com uma porcentagem de 12,7%, sendo essa menor do que a apresentada quando o HC, na dose de 12,5, foi administrado sem o antagonista (34,8%). Após a administração do antagonista mais o DZP ($4,3 \pm 0,4$) houve diminuição do número de vezes que o animal entrou nos braços abertos, apresentando uma porcentagem de 8,5%, sendo essa inferior à apresentada quando o DZP foi administrado isoladamente, que foi de 63,5%, sendo estes resultados não significativos, quando comparados ao grupo controle ($4,7 \pm 0,4$).

Na Figura 15B estão expostos os resultados do tempo de permanência gasto pelos animais nos braços abertos do LCE. Os animais do grupo tratado com o HC 12,5 apresentavam a porcentagem de tempo de permanência de 49,9% ($89,9 \pm 2,7$) passando para 25,3% ($35,3 \pm 4,3$), após o pré-tratamento com o antagonista. O mesmo ocorreu com o DZP, que teve a sua porcentagem de tempo de permanência diminuída de 70,4% ($152,3 \pm 5,0$), quando administrado sozinho, para 6,5% ($50,6 \pm 5,6$) após a administração do

flumazenil, não apresentando diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($47,3 \pm 3,4$).

Os grupos tratados com flumazenil + diazepam e flumazenil + HC 12,5 não apresentaram diferenças significativas no número de entradas nos braços abertos do LCE ($4,3 \pm 0,4$) e ($3,0 \pm 0,4$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($4,7 \pm 0,7$), nem no tempo de permanência ($50,6 \pm 5,3$) e ($35,3 \pm 4,3$), respectivamente, também comparados ao grupo controle ($47,3 \pm 3,4$).

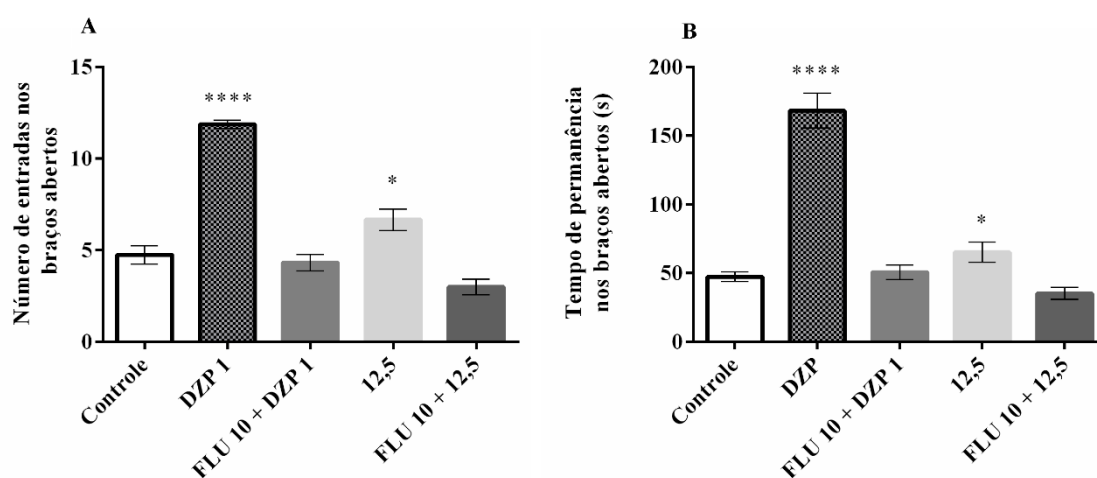


Figura 15 - Influência do HC após o uso do flumazenil no número de entradas (A) e no tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do LCE. A coluna representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 8/\text{grupo}$). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: (HC) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

Para avaliar se os efeitos observados com o HC envolvem interação com o sistema GABAérgico, foi utilizado o antagonista dos benzodiazepínicos no receptor GABA_A , flumazenil. Esse antagonista foi administrado previamente, antes da administração das substâncias em estudo, caso o efeito farmacológico seja revertido ou até mesmo, diminuído significativamente, isso implica dizer que, o antagonista ao se ligar ao alvo, impediu a ligação da substância, e que, consequentemente, aquela via está envolvida no efeito farmacológico (NETO et al., 2019).

O pré-tratamento com o antagonista flumazenil reverteu o efeito ansiolítico-símile do HC, assim como do DZP, sugerindo que o HC é capaz de reduzir a ansiedade por meio de um mecanismo de ação semelhante ao dos BZDs sobre o GABA_AR . Interações entre o GABA_AR e

os compostos presentes nos OEs, assim como com os seus compostos isolados, como o citrônolal, resultaram em atividade depressora do SNC (HELDWEIN et al., 2012; HELDWEIN et al., 2014; GARLET et al., 2016).

Alguns monoterpenos já tiveram a sua atividade inibitória sobre o SNC comprovada, principalmente devido a modulação positiva sobre os receptores GABAérgicos. A administração do geraniol (KUMAR et al., 2013), mentol (KUMAR et al., 2013) e citrônolal (MELO et al., 2011) em camundongos, gerou uma diminuição no número de convulsões induzidas pela picrotoxina e pelo pentilenotetrazol.

Jiménez-Ferrer et al. (2017) avaliaram o efeito ansiolítico das frações da planta *Aloysia triphylla*, a qual contém 21.6% do composto citrônolal, utilizando o teste do LCE, concluindo que todas as frações estudadas induziram um efeito ansiolítico-símile, essa atividade foi revertida com a utilização do antagonista flumazenil.

As propriedades sedativas da planta *Melissa officinalis* incluindo uma redução do estresse, agitação e ansiedade são atribuídas à presença de fitoconstituintes, dentre eles o citrônolal (2.92%). A atividade ansiolítica da *M. officinalis* foi atribuída a uma possível interação com os receptores GABA_A, assumindo uma atividade semelhante à dos BZD (SANTOS et al., 2016).

Santos et al. (2016), ao complexar o citrônolal à β -ciclodextrina, observaram um aumento no limiar de excitação neuronal, resultando numa diminuição da hiperalgesia muscular. Esse efeito é provavelmente resultante da atividade sobre o SNC, uma vez que Melo et al. (2010) demonstraram anteriormente que o citrônolal exerceu efeito analgésico central empregando o teste da placa quente, provavelmente devido a uma interação com o GABA_AR.

A interação do HC com o GABA_AR pode resultar em uma maior hiperpolarização neuronal. Após a ligação do HC com o receptor, sugere-se que ocorra um maior influxo de Cl⁻ na célula. O acúmulo de íons cloreto no interior da célula aumenta o limiar de excitação neuronal, impedindo a condução do impulso nervoso (FATURE et al., 2010; GARLET et al., 2016). A diminuição desta excitação pode agir, aliviando os sintomas característicos da ansiedade.

5.1.7 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica

A figura 16A mostra o número de vezes que os animais entraram nos braços abertos do LCE. Os resultados obtidos dos grupos tratados com HC 6,25 ($5,5 \pm 0,1$) e cetamina (1 mg/kg)

($4,5 \pm 0,6$) não foram significativos, apresentando uma porcentagem de 30,0% e 15,0%, respectivamente, comparados ao grupo controle ($3,8 \pm 0,1$). A não significância também persistiu nos resultados do tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE (Figura 16B), sendo de 14,0% ($63,0\% \pm 5,5$) para o grupo tratado com o HC 6,25 e de 26,5% ($73,5 \pm 5,7$) para o grupo tratado com a cetamina 1 mg, em comparação ao grupo controle ($54,0 \pm 8,8$).

Os animais do grupo tratados com HC 6,25 + CET 1 ($17,7 \pm 0,6$) entraram muito mais vezes nos braços abertos do LCE, com uma porcentagem de 83,0%, bem como permaneceram mais tempo nesse ambiente ($74,0\% - 213,0 \pm 8,7$) em relação ao grupo controle.

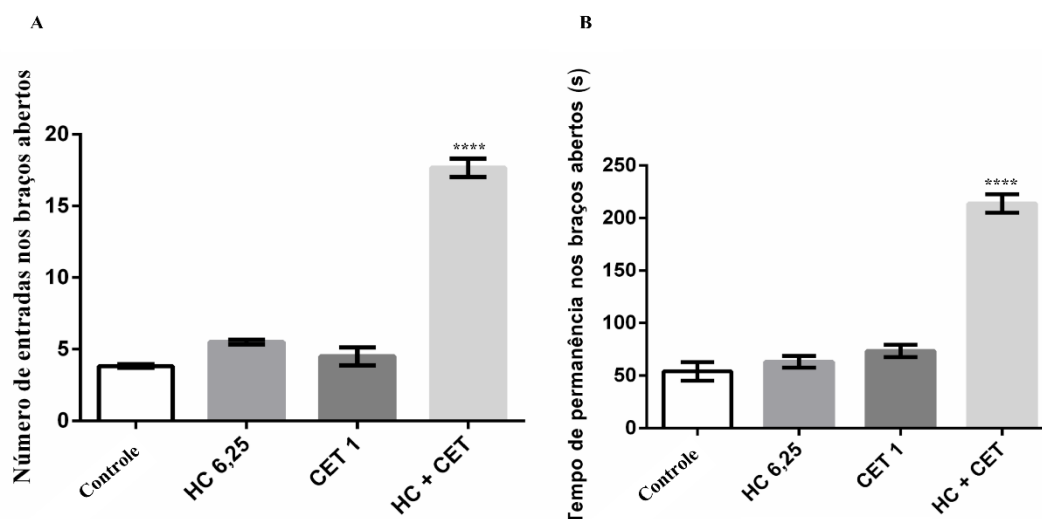


Figura 16 - Influência da associação entre a dose subativa do HC e da CET no número de entradas (A) e no tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do LCE. A coluna representa a média $\pm$ E.P.M. ($n = 8/\text{grupo}$). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: (HC) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

A modulação da neurotransmissão envolvendo os receptores do glutamato tem se mostrado um importante alvo para impedir a estimulação exacerbada do SNC. Alguns monoterpenos demonstraram capacidade de modular esses receptores, tais como o isopulegol que possuem atividade antinociceptiva devido, entre outros mecanismos, inibir a propagação do impulso doloroso via bloqueio do receptor NMDA (PRÓSPERO et al., 2018).

A cetamina, um antagonista dos receptores NMDA, aumenta o efeito da dose sub-ativa do HC, confirmando os resultados observados no estudo *in silico*, ou seja, após o bloqueio do

receptor, o HC, mesmo na dose sub-ativa, conseguiu diminuir o comportamento ansioso do animal. Drogas que inibem a sinalização do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), como por exemplo a fluoxetina (6,2 mg/kg) atuam modulando o sistema serotoninérgico, sendo uma das classes de medicamentos escolhidas para o tratamento da ansiedade (ZANOS; GOULD, 2018).

A cetamina interfere na ação dos aminoácidos excitatórios incluindo o glutamato e o aspartato, uma vez que o glutamato é libertado na fenda sináptica por, onde pode agonizar vários receptores, incluindo o NMDAR. Dessa forma, baixas concentrações da cetamina causam, predominantemente, o bloqueio do canal quando esse estiver fechado, enquanto que altas concentrações bloqueiam tanto o canal fechado como aberto. Este mecanismo de antagonismo do receptor do NMDA depende da concentração de cetamina, tendo implicações clínicas, verificando-se propriedades analgésicas (quando em baixas concentrações) e efeitos anestésicos (quando administrada em concentrações altas). De toda forma, o efeito final será uma diminuição da transmissão neuronal, como observado nos resultados (LÜTHI; LÜSCHER, 2014; SWAINSON et al., 2021).

Devido a importância do glutamato e de seus subtipos específicos de receptores na regulação da plasticidade sináptica a qual afeta processos de humor, cognição, aprendizado e recompensa, vários estudos clínicos foram iniciados com compostos que modulem a neurotransmissão glutamatérgica (SWAINSON et al., 2021).

A cetamina apresenta, em doses subanestésicas, efeito antidepressivo rápido e transitório. Essa substância também induziu efeito ansiolítico rápido e sustentado em pacientes que sofrem de TAG refratário e/ou transtorno de ansiedade social, que não estavam deprimidos. Em um relato de caso, a cetamina produziu um efeito em paciente com agorafobia e TAG após uma única infusão (RAY; KIOUS, 2016). Essa multiplicidade de efeitos associados à cetamina se deve a sua ação multimodal, pois a cetamina e seus metabólitos ativos podem atuar em outros alvos como os receptores opioides, serotoninérgicos, canais de cálcio, sódio e cloreto, transportador de 5-HT, entre outros (DU JARDIN et al., 2016).

5.2 Testes *in silico*

5.2.1 Docking molecular

Neste estudo os resultados gerados pelas cinco funções de pontuação usadas foram validados pelo redocking do ligante cristalográfico e calculado o RMSD das posições obtidas.

O redocking consiste em posicionar e prever a afinidade de ligação do ligante cristalográfico na região do sítio ativo do receptor. O RMSD compara e calcula o desvio da raiz quadra média das posições obtidas pelo redocking e a estrutura do ligante obtida experimentalmente. Para que o docking seja considerado confiável, é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior a 2.0 Å.

Os programas MVD, Vina e AD4 selecionam os melhores ligantes pelos valores de energia mais negativos, enquanto que o Gold e o Plants selecionam os melhores ligantes pelos valores de energia mais positivos. O HC obteve valor de afinidade de ligação superior ao ligante cristalográfico em pelo menos três programas (Tabela 3), indicando um grau de afinidade satisfatório pelo GABA_AR, sendo empregadas, posteriormente, técnicas computacionais para avaliar a estabilidade dessa ligação.

Tabela 3 - Resultados dos valores de energia de ligação (kcal/mol) em cinco funções de pontuação diferentes.

Molécula	Moldock (MVD)	Goldscore (GOLD)	(Autodock Vina)	(AutoDock)	(PLANTS)
Ácido gama-aminobutírico (GABA_A)					
HC	-75,40	29,52	-4,8	-5,38	37,94
Ligante PDB	-88,65	26,22	-5,7	-4,95	20,96

Fonte: autor (2022).

A Figura 17 mostra que o HC conseguiu formar interações mais estáveis, através de ligações de hidrogênio, com os resíduos Arg67, Thr202 e Tyr157 na região do sítio ativo. Enquanto que o ligante PDB, formou apenas uma interação de hidrogênio com o aminoácido Ser156. Interações estéricas também foram observadas entre os resíduos Tyr205 e Tyr97 e o ligante HC, assim como interações a curtas distâncias, sendo estas mais estáveis, entre os resíduos Arg67, Tyr157, Thr202 e Tyr205 e o HC.

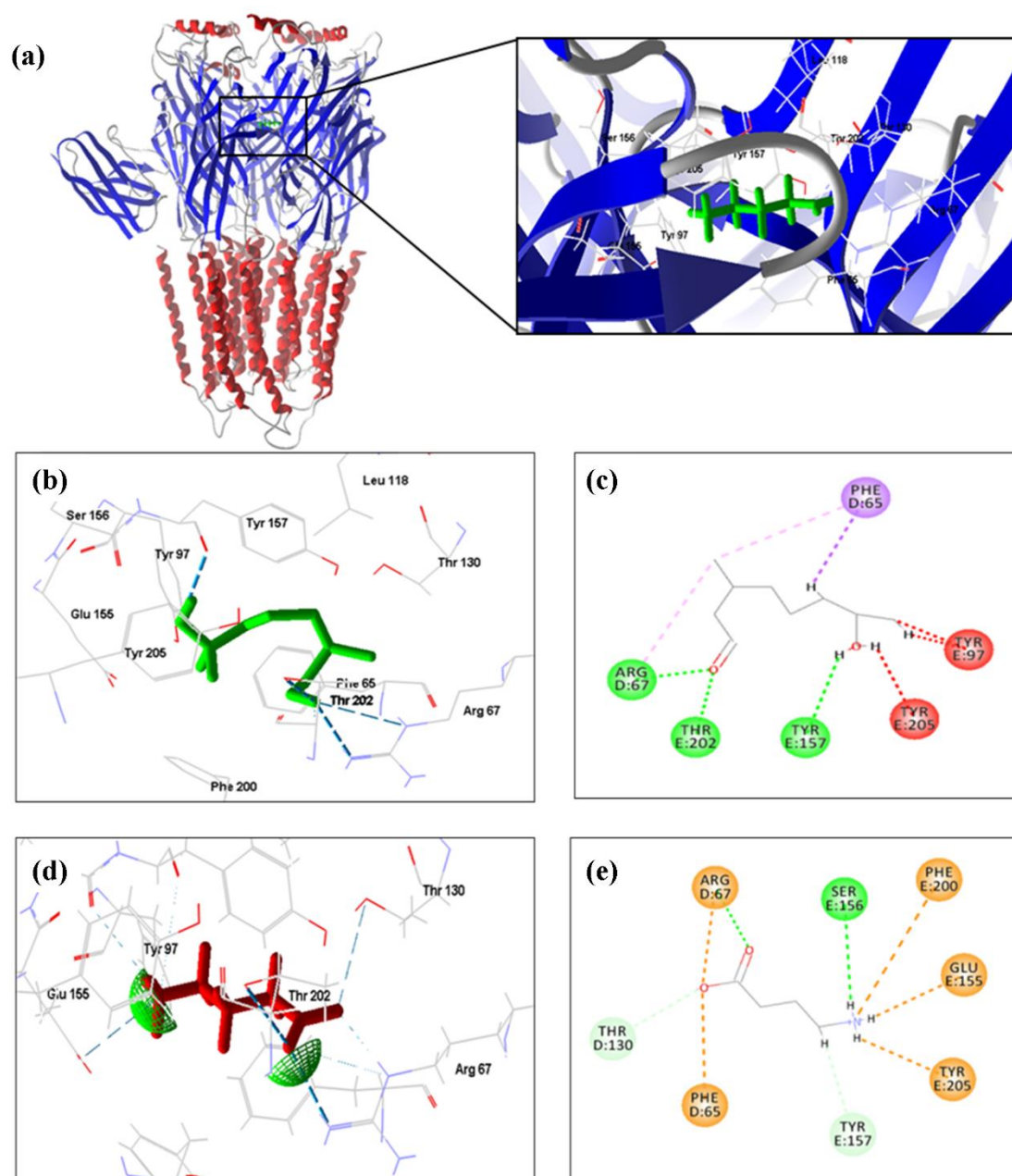


Figura 17 - Visualização das interações 2D e 3D entre os ligantes HC e PDB e o alvo GABA_A. Complexo GABA_A-HC (A). Interações 3D e 2D entre os aminoácidos do ligante HC e GABA_A (B e C). Interações 3D e 2D entre o ligante PDB e os aminoácidos do GABA_A (D e E). Em verde, são representadas as interações dos hidrogênios; em laranja, interações eletrostáticas; em vermelho, interações estéricas; e em roxo, interações hidrofóbicas.

A possível atividade ansiolítica do composto também foi avaliada através do envolvimento do receptor GABA_A, um dos principais alvos biológicos das substâncias ansiolíticas, empregando-se metodologias *in silico*. As metodologias computacionais,

utilizadas nas etapas iniciais de desenvolvimento de medicamentos, visam refutar uma série de hipóteses sobre moléculas desconhecidas, como a avaliação de potenciais alvos biológicos, direcionando melhor os estudos posteriores (SANTOS et al., 2014).

Devido a suas características inibitórias O neurotransmissor inibitório mais importante do sistema nervoso central, sem dúvida, é o ácido gama-aminobutírico (GABA). Qualquer fator que influencie na diminuição da transmissão GABAérgica resultará no desencadeamento de comportamentos ansiosos e agressivos (NARVAES; ALMEIDA, 2014). Esse neurotransmissor se liga a diferentes tipos de receptores, sendo os principais, os do tipo GABA_AR, GABA_BR e GABA_CR. Os GABA_AR e GABA_CR são do tipo ionotrópicos, já o GABA_BR pertence à classe dos receptores acoplados a proteína G. Essa variedade de receptores GABAérgicos, representa um importante desafio para a química medicinal na concepção de agentes terapêuticos específicos (CHEBIB; JOHNSTON, 2000).

A química medicinal tem se tornado uma grande aliada no descobrimento e desenvolvimento racional de candidatos a novos fármacos. Levando-se em consideração o conhecimento da estrutura do hidroxicitronelal (HC), assim como do GABA_AR, foi possível identificar, por exemplo, a atividade agonista do composto sobre esse receptor, através do processo de complementaridade molecular (BERMAN et al., 2013).

A interação do HC com o GABA_AR a partir de aminoácidos diferentes, quando comparado com os aminoácidos envolvidos na interação BZD e GABA_AR, pode ser a responsável pelo não surgimento de reações adversas associadas aos benzodiazepínicos, como o comprometimento locomotor (BERGMANN et al., 2013). Essa característica faz do HC uma substância que poderá ser empregada na produção de um novo medicamento ansiolítico, permitindo, desta forma, que as pessoas possam desempenhar normalmente as suas funções diárias, sem riscos de acidentes.

As interações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos do GABA_AR e o HC, quando comparado ao ligante cristalográfico, demonstram possuir uma maior afinidade. As interações entre uma enzima e seu substrato são complementares e foi, inicialmente, introduzida pelo famoso modelo “chave-fechadura”, proposto por Emil Fischer, em 1894. Tal complementaridade, a nível molecular, seria observada através de interações intermoleculares, representadas pelas interações hidrofóbicas, de van der Waals, entre nuvens π , ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas (VERLI; BARREIRO, 2005).

Estudos de *docking* molecular entre o diazepam (DZP) e os GABA_AR (BERGMANN et al., 2013) indicam que o fármaco se liga aos aminoácidos Lys105, Tyr160, Tyr210 e Val212

nas subunidades $\alpha 1$ e ao aminoácido Phe77 na subunidade $\beta 2$. O HC na sua forma estável de ligação interagiu com os aminoácidos Arg67, Thr157 e Tyr157, sendo esta mudança de aminoácidos, o possível motivo para tornar a interação entre o HC e o GABA_AR mais estável, quando comparado com a interação entre o DZP e o GABA_AR, como observado nos estudos da dinâmica molecular. Dessa forma, conclui-se que o HC se liga ao receptor GABA_A de forma semelhante ao ligante PDB, possivelmente, no sítio de ligação dos benzodiazepínicos.

Os resultados de *docking* utilizando a proteína homóloga ao NMDAR foram gerados usando duas funções de pontuação, o Moldock score e o Rerank score. Valores mais negativos indicaram melhores previsões para a maioria das funções de pontuação. Os resultados de docking podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de energia de ligação (kcal/mol) do composto HC analisados na proteína NMDAR.

Proteína	HC		Controle positivo	
	Moldockscore	Rerankscore	Moldockscore	Rerankscore
NMDA	-52.2954	-42.8138	-42.2035	-33.7438

Fonte: dados da pesquisa (2022).

Segundo os resultados, o composto HC obteve energias negativas em todos os alvos, demonstrando, dessa forma que ocorreu interação com todos os alvos em estudo. Além disso, o composto demonstrou uma maior afinidade aos alvos: GABA_A e NMDAR, visto que, apresentou score de energia menor ou próximo quando comparado ao controle positivo.

O acoplamento molecular com o receptor NMDA permitiu observar que o HC estabeleceu interações do tipo hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa), sendo estas ocorridas em sua totalidade com os átomos de Carbono (C) correspondentes aos grupamentos metilas (CH₃) da estrutura química do composto por intermédio dos resíduos Ala 75 (1 interação) e Tyr 109 (3 interações).

Diferentemente do ocorrido com o HC, o controle positivo, cetamina, estabeleceu apenas interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) com o receptor NMDA, estas ocorreram com os átomos de Nitrogênio do grupamento amina (NH) e foram estabelecidas através dos resíduos Phe 113 (1 interação) e Tyr 109 (1 interação). Não foram observadas interações semelhantes entre os resíduos estabelecidos pelos compostos em estudo. A Figura 18 demonstra o acoplamento molecular ocorrido entre o composto Hidroxicitronelal, a cetamina e o receptor NMDA. Portanto, o HC se liga ao receptor NMDA de forma efetiva, e

pode desencadear o bloqueio desse receptor, levando em consideração a semelhança de ligação com o ligante PDB (cetamina) e os dados obtidos nos estudos *in vivo*.

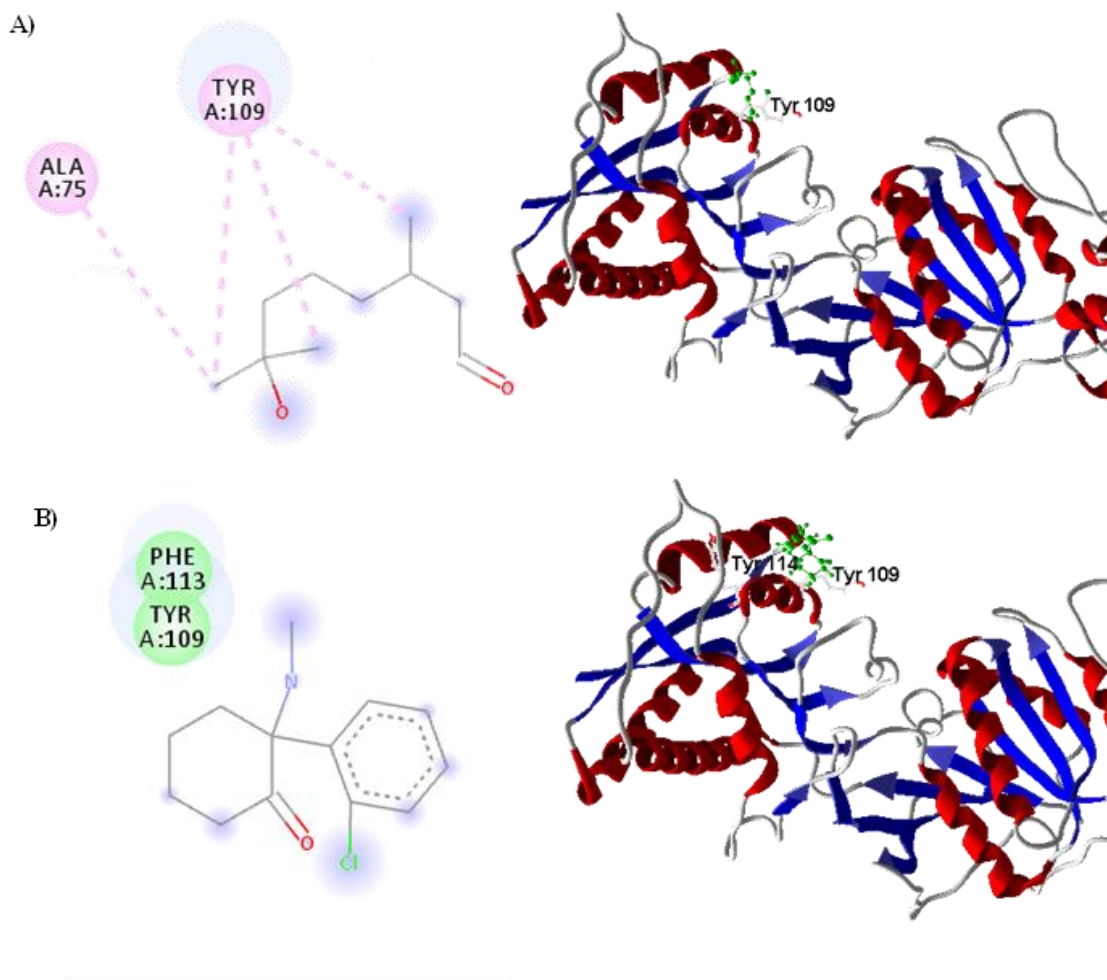


Figura 18 - Interações entre a molécula do HC com o receptor NMDA (A) e entre a cetamina e o receptor NMDA (B).

5.2.2 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas entre o HC e o GABA_AR levando em consideração os melhores resultados obtidos no *docking* consenso. Portanto, foram avaliadas as interações entre o GABA_AR e o HC, assim como o ligante cristalográfico complexado, usados para estudar a flexibilidade e mudanças conformacionais dos complexos durante a simulação de DM. Para isso, o desvio médio quadrático (RMSD) foi calculado para os átomos de Ca da proteína e das estruturas de cada ligante separadamente. A análise de RMSD do GABA_AR mostrou que a proteína atingiu conformações variando de 0,3 a 0,4 nm de tamanho

em 10 ns. Os resultados mostraram que a proteína é estável (Figura 19A), sem alterações relevantes. Além disso, quando comparada a flexibilidade da proteína complexada aos ligantes, foi observado que o HC complexado ao GABA_AR se mantém estável durante a maior parte do tempo, enquanto que o ligante cristalográfico complexado ao GABA_AR apresentou picos de modificações estruturais entre 3 e 4 nm.

A análise de RMSD dos ligantes mostrou que o HC é mais estável que o ligante cristalográfico (Figura 19B), sugerindo que, embora a proteína sofra pequenas alterações estruturais, o HC tende a permanecer no sítio ativo por mais tempo. Dessa maneira, a afinidade de ligação não é perdida mesmo na presença de diferentes fatores, como temperatura, pressão solvente e íons.

Para compreender a flexibilidade dos resíduos e os aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional do GABA_AR, foram calculadas as flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) de cada aminoácido do receptor. Resíduos com altos valores de RMSF sugerem mais flexibilidade, enquanto que valores baixos de RMSF apresentam menor flexibilidade. Considerando que os aminoácidos com flutuações acima de 0,3 nm, contribuem para a flexibilidade da estrutura proteica, constatamos que dentre os aminoácidos das cadeias E e D que interagem com o ligante agonista, nenhum contribui para a mudança conformacional da proteína (Figura 19C). Assim, sendo o sítio ativo estável, a afinidade de ligação com os compostos tende a permanecer inalterável.

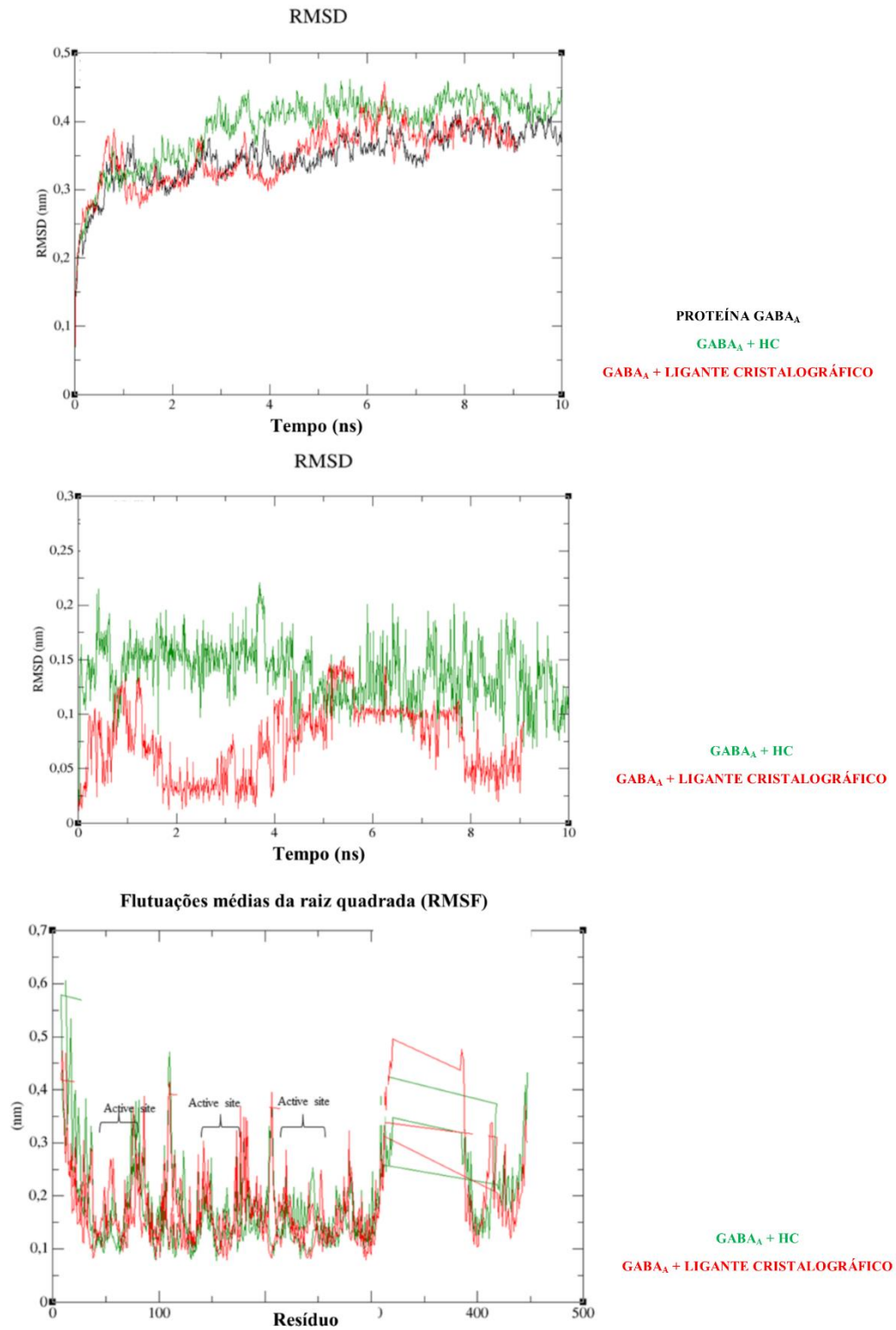


Figura 19 - RMSD de átomos Ca do GABA_{A} R isolados e complexados com ligantes HC e cristalográfico. (B) RMSD dos átomos Ca dos ligantes HC e cristalográfico. (C) RMSF de átomos Ca de GABA_{A} R complexados com os ligantes HC e cristalográfico.

As interações observadas no docking para o complexo GABA_{A} R-HC mantiveram-se durante as simulações de dinâmica molecular. Quando analisado através de programas gráficos, notou-se que o HC perde as interações com os aminoácidos observados no *docking* (Figura 20), surgindo novas interações, principalmente através de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos Phe35, Phe54, Arg56 e Glu492. Diversos fatores podem contribuir para a troca de interações com os aminoácidos, como por exemplo, a interação dos compostos com moléculas de água e íons presentes no sistema que compõe a dinâmica molecular.

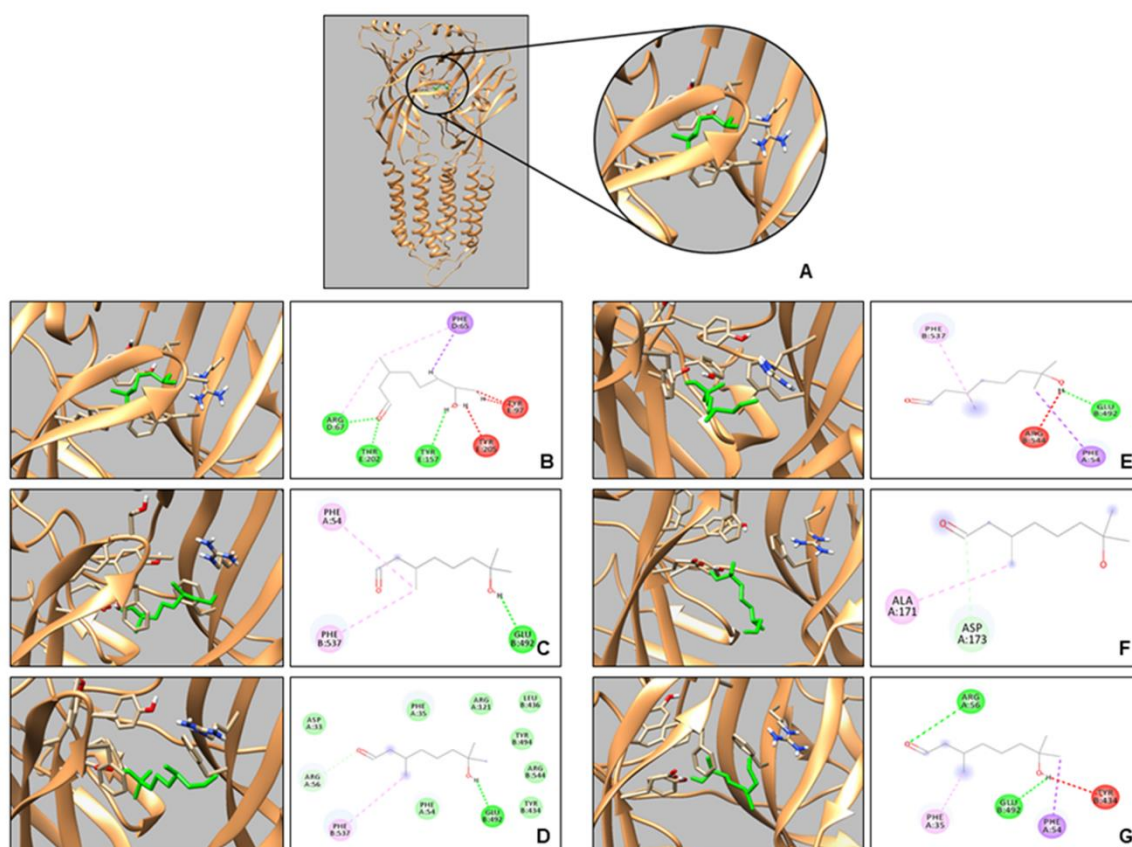


Figura 20 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps. Estrutura do complexo GABA_{A} R-HC e seu sítio ativo (A), estrutura inicial (B), 200ps (C), 400ps (D), 600ps (E) 800ps (F) e 1000ps (G).

A realização de dinâmica molecular é de extrema importância, pois objetiva avaliar a diferença estrutural entre duas moléculas, como foi realizado para os agonistas HC e cristalográfico. Quanto maior o valor de RMSD, maior é a diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que estão sendo comparadas, como observado para o ligante HC (SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017).

Neste estudo, baixos valores de RMSD ($>0,3$ nm) foram observados durante quase todo o tempo de simulação, indicando alta estabilidade do HC comparado ao ligante cristalográfico no sistema, onde, mudanças bruscas de RMSD denotam mudanças conformacionais importantes na molécula, enquanto pequenas oscilações de RMSD indicam equilíbrio do sistema (CARUGO, 2003), tal equilíbrio, influencia diretamente na interação do ligante e seu receptor.

Com os resultados obtidos na dinâmica molecular, observa-se uma melhor estabilidade de ligação entre o HC e o GABA_AR. Essa estabilidade pode estar relacionada aos hidrogênios dos grupos funcionais CHO (aldeído), os quais estão participando de ligações de hidrogênio não clássicas com algum resíduo de aminoácido. A interação com os aminoácidos do GABA_AR resulta no influxo de íons cloreto na célula, diminuindo a excitação neuronal.

5.2.3 Predições farmacocinéticas

As predições farmacocinéticas (Tabela 6) *in silico* foram realizadas através da avaliação dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), com o objetivo de identificar as possíveis desvantagens farmacocinéticas da substância HC. De acordo com as regras de Lipinski, o fármaco em potencial é ativo por via oral quando atende aos seguintes critérios: a) peso molecular ≤ 500 Da; b) LogP ≤ 5 (ou MLogP $\leq 4,15$); c) número de aceptadores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; d) número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 (LIPINSKI et al., 2012).

O HC possui um LogP de 2,15, atendendo a uma das regras Lipinski, assim como números adequados de doadores e aceptadores de ligações de hidrogênio, o que sugere uma boa biodisponibilidade. Em relação ao LogS, o valor encontrado para o composto está na faixa adequada (-4 e -2), o que indica uma solubilidade adequada, que irá favorecer diretamente a biodisponibilidade do composto (ELDER; HOLMB, 2013).

Moléculas que apresentam valores de TPSA (*Topological Polar Surface Area*) menores que $140 \text{ \AA}^2$, e valores acima de 0,90 (log Papp; log cm/s), para o parâmetro Caco-2 indicam que a substância possui altas chances de possuir uma absorção intestinal adequada, sendo estes

modelos *in vitro* bastante empregados para avaliação de tais parâmetros (MORAES et al., 2018).

O volume de distribuição (VDss) indica o volume teórico de uma determinada substância uniformemente distribuída no plasma sanguíneo. Valores abaixo de 0,45 (log L/kg) indicam boa distribuição do plasma, estando a substância disponível, prontamente, para interagir com o seu alvo biológico. Em contrapartida, a eliminação da substância não foi aumentada devido a sua forma livre, como observado no parâmetro de depuração renal (Clearance/ml/min/kg). Quanto maior o clearance total, maior e mais rápida seria a eliminação da substância (LAMBERTUCC et al., 2018; ELDER; HOLMB, 2013).

Os parâmetros de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET) também foram avaliados para se traçar um perfil farmacocinético adequado do HC. A absorção e a distribuição influenciam diretamente na biodisponibilidade da substância, enquanto que o metabolismo e a excreção afetam a taxa de eliminação da substância do organismo. A eliminação adequada das substâncias diminui as chances de serem desencadeados possíveis eventos tóxicos (MORAES et al., 2018).

Reforçando a ideia de que um fármaco para apresentar uma boa biodisponibilidade deve obedecer pelo menos a três dos seguintes parâmetros: peso molecular menor ou igual a 500 Daltons (Da), alta lipofilicidade (LogP menor que 5), número de doadores de ligação hidrogênio (DLH) menor que 5 e número de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) menor que 10 (LIPINSKI et al., 2012), na triagem oriunda via farmacóforo, não foi observado nenhuma violação a esses parâmetros para o HC.

O HC foi administrado pela via intraperitoneal nos experimentos *in vivo*, principalmente devido a suas características físico-químicas, como a lipossolubilidade. A lipossolubilidade de uma substância determina a sua capacidade de permear as membranas biológicas, para chegar até o seu alvo (SANTIN et al., 2013). As predições farmacocinéticas demonstram que o HC possui lipofilicidade suficiente para interagir com a bicamada lipídica das membranas biológicas, assim como uma hidrossolubilidade compatível com a dissolução destas moléculas no fluido biológico aquoso, resultando em uma boa absorção.

Diante do exposto, o HC demonstrou possuir uma atividade ansiolítica-símile comprovada a partir de metodologias *in vivo* e *in silico*. Os estudos *in silico* demonstraram que essa substância possui uma capacidade de interagir com receptores GABA_A e NMDA de forma efetiva, bem como apresentam características farmacocinéticas adequadas.

Tabela 5 - Dados farmacocinéticos *in silico* estimados em serviços da web SwissADME ou pkCSM. ^aSwissADME (log de moriguchi do coeficiente de partição octanol-água). ^bSwissADME (log de solubilidade aquosa). ^cSwissADME (cálculo da área de superfície polar topológica (TPSA)). ^dpkCSM (previsão da permeabilidade das células Caco-2 como estimativa da absorção na mucosa intestinal humana). ^epkCSM (previsão da proporção de absorção do composto no intestino delgado humano). ^fpkCSM (previsão do log do volume de distribuição em estado estacionário (VDss)). ^gpkCSM (previsão da fração composta não ligada no plasma (não ligada às proteínas séricas)). ^hpkCSM (previsão do log da depuração total da substância).

Composto	LogP ^a	LogS ^b	TPSA (Å ²) ^c	Caco-2 permeabilidade (log Papp; log cm/s) ^d	Int. Abs. (%) ^e	VDss (log L/kg) ^f	Fract. Unb. ^g	Clearance total (log ml/min/kg) ^h
HC	2,15	-2,04	37,30	1,49	93,84	-0,04	0,50	1,36

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que o hidroxicitronelal possui provável efeito ansiolítico-símile como foi observado a partir dos modelos empregados (labirinto em cruz elevado, campo aberto e placa perfurada). Essa atividade ansiolítica-símile se deve a uma interação entre os receptores GABA_A, bem como devido a um bloqueio da neurotransmissão excitatória mediada pelo NMDAR, como foi identificado nos resultados *in vivo* e *in sílico*. A atividade ansiolítica-símile do composto, em estudo, não foi acompanhada pelos efeitos adversos observados nos benzodiazepínicos, tais como sedação e comprometimento neuromuscular, afastando uma possível neurotoxicidade do HC. Além disso, o HC também atende aos parâmetros ADME, avaliados nas previsões farmacocinéticas. Esses achados reforçam o potencial farmacológico do monoterpeno citronelal e de seus derivados, como sendo potenciais substâncias com características psicoléticas sobre o SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, S.; PÁLL, S.; SMITH, J.; HESS, B.; LINDAHL, E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2006.

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.

ALVES, M. F.; ALVES, V. F.; RAMALHO, J. A.; DIAS, G. E. N.; OLIVEIRA, K. M.; LIRA, O. A. B.; SANTOS, S. G.; ALMEIDA, R. N.; DINIZ, M. F. F. M. Preclinical evaluation of repeated dose toxicity and anxiolytic activity of monoterpene R - (+) – limonene via inhalation. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 29, p. 598-603, 2016.

ANDRADE, H. H. N.; MONTEIRO, A. B.; BRAGA, R. M.; DA CRUZ, R. M. D.; MIRIAN, G. S. S. S.; SCOTTI, M. T.; DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R. N. Anxiolytic and antinociceptive-like effects of cinnamic alcohol by possible gabaergic pathway modulation: *in vivo* and *in silico* studies. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 51372-51389, 2020.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KUSTRIN, E.; GEGECHKORI, V.; MORTON, D. W. Anxiolytic terpenoids and aromatherapy for anxiety and depression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1260, p. 283-296, 2020.

APROTOSOAIE, A. C.; HÂNCIANU, M.; COSTACHE, I. I.; MIRON, A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, p. 193–219, 2014.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205–235, 1973.

BALDWIN, D. S.; AJEL, K.; MASDRAKIS, V. G.; NOWAK, M.; RAFIQ, R. Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, p. 883-892, 2013.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93-107, 2017.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–35, 2015.

BALDWIN, D. S.; AJEL, K.; MASDRAKIS, V. G.; NOWAK, M.; RAFIQ, R. Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, p. 883-892, 2013.

BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. How community has shaped the protein data bank. **Structure**, v. 21, n. 9, p. 1485–1491, 2013.

BEHLKE, L. M.; FOSTER, R. A.; LIU, J.; BENKE, D.; BENHAM, R. S.; NATHANSON, A. J.; YEE, B. K.; ZEILHOFER, H. U.; ENGIN, E.; RUDOLPH, U. A pharmacogenetic ‘restriction-of-function’ approach reveals evidence for anxiolytic-like actions mediated by alpha5-containing GABA_A receptors in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 2492–2501, 2016.

BELVIRANLI, M.; OKUDAN, N.; KABAK, B. The effects of acute high-intensity interval training on hematological parameters in sedentary subjects. **Medical Sciences**, v.5, n. 3, p. 15, 2017.

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

BERGMANN, R.; KONGSBK, K.; SØRENSEN, P. L.; SANDER, T.; BALLE, T. A Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. **PLoS One**, n. 8, 2013. e52323.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J.; MEYER JR, E. F.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCI, T.; TASUMI, M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, p. 535–542, 1977.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEM, R. Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 43–56, 1995.

BIALA, G.; KRUKA, M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of D-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, p. 54-61, 2008.

BRAAT, S.; KOOY, R. F. The GABA_A Receptor as a therapeutic target for neurodevelopmental disorders. **Neuron**, v. 86, p. 1119–1130, 2015.

BRITO, R. G.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; SANTOS, M. R. V.; SOUSA, D. P.; BADAUE-PASSOS JR, D.; LUCCA, W.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; OLIVEIRA, A. P.; QUINTANS-JR, L. J. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 637–644, 2012.

BRITO, A. F.; FAJEMIROYE, J. O.; NERI, H. F. S.; SILVA, D. M.; SILVA, D. P. B.; SANZ, G.; VAZ, B. G.; DE CARVALHO, F. S.; GHEDINI, P. C.; LIAO, L. M.; MENEGATTI, R.; COSTA, E. A. Anxiolytic-like effect of 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethanol is mediated through the benzodiazepine and nicotinic pathways. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, p. 432-442, 2017.

BONDI, A. Van der waals volumes and radii. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 68, p. 441–51, 1964.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. S101-11, 2013a.

CAMPÊLO, L. M. L.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. L. M.; CERQUEIRA, G. S.; SOUSA, G. S.; SALDANHA, G. B.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M. Antioxidant and antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.

CARUGO, O. How root-mean-square distance (R.M.S.D) values depend on the resolution of protein structures that are compared. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 125-128, 2003.

CAPUTO, L.; REGUILON, M. D.; MIÑARRO, J.; DE FEO, V.; RODRIGUEZ-ARIAS, M. *Lavandula angustifolia* essential oil and linalool counteract social aversion induced by social defeat. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2694, 2018.

CAVALCANTE-SILVA, L. H.; FALCÃO, M. A.; VIEIRA, M. D.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SOUSA, J. C.; SILVA, T. M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; NOEL, F.; MIRANDA, G. E. C.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Assessment of mechanisms involved

in antinociception produced by the alkaloid caulerpine. **Molecules**, v. 19, n. 9, p.14699-709, 2014.

CID-10. **Organização Mundial da Saúde**. Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. 10a rev. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

CHAKI, S. mGlu2/3 Receptor antagonists as novel antidepressants. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 38, n. 6, p. 569-580, 2017.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 8, 2000.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-60, 2001.

CHENG, S.; DING, Y. The quantitative structure-activity relationships between GABA_A receptor and ligands based on binding interface characteristic. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 17, n. 6, p. 785-796, 2021.

COHEN, B. E., EDMONDSON, D.; KRONISH, I. M. State of the art review: depression, stress, anxiety, and cardiovascular disease. **American Journal of Hypertension**, v. 28, n. 11, 2015.

CONG-YUAN, X.; JUN, H.; LI-DA, D.; YU, Y.; WEN-WEN, L.; JIE-KUN, X.; WEI-KU, Z. Targeting the dysfunction of glutamate receptors for the development of novel antidepressants. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 226, 2021.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology, 7 ed. New York: Oxford University Press, 1996.

CRESTANI, F.; LOREZ, M.; BAER, K.; ESSRICH, C.; BENKE, D.; LAURENT, J. P.; BELZUNG, C.; FRITSCHY, J. M.; LÜSCHER, B.; MOHLER, H. Decreased GABA_A-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 833–839, 1999.

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

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, p. 192 – 217, 2012.

DA SILVA, D. M.; SANZ, G.; VAZ, B. G.; DE CARVALHO, F. S.; LIÃO, L. M.; DE OLIVEIRA, D. R.; MOREIRA, L. K. D. S.; CARDOSO, C. S.; DE BRITO, A.F.; DA SILVA, D. P. B.; DA ROCHA, F. F.; SANTANA, I. G. C.; GALDINO, P.M.; COSTA, E. A.; MENEGATTI, R. Tert-butyl 4-((1- phenyl-1H-pyrazol-4-yl) methyl) piperazine-1-carboxylate (LQFM104)- New piperazine derivative with antianxiety and antidepressant-like effects: Putative role of serotonergic system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 546-552, 2018.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

GAUTAM, B. K.; JINDAL, A.; DHAR, A.K.; MAHESH, R. Antidepressant-like activity of 2-(4- phenylpiperazin-1-yl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (7a), a 5-HT₃ receptor antagonist in behaviour based rodent models: evidence for the involvement of serotonergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.109, p. 91–97, 2013.

GRUPE, D. W.; NITSCHKE, J. B. Uncertainty and Anticipation in Anxiety: An integrated neurobiological and psychological perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 488–501, 2013.

DESPINASSE, Y.; FIORUCCI, S.; ANTONCZAK, S.; MOJA, S.; BONY, A.; NICOLÈ, F.; BAUDINO, S.; MAGNARD, J. L.; JULLIEN, F. Bornyl-diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: A major monoterpene synthase involved in essential oil quality. **Phytochemistry**, v. 137, 2017.

DIAS, R.; SHEPPARD, W. F. A.; FRADLEY, R. L.; GARRETT, E. M.; STANLEY, J. L.; TYE, S. J.; GOODACRE, S.; LINCOLN, R. J.; COOK, S. M.; CONLEY, R.; HALLETT, D.; HUMPHRIES, A. C.; THOMPSON, S. A.; WAFFORD, K. A.; STREET, L. J.; CASTRO, J. L.; WHITING, P. J.; ROSAHL, T. W.; ATTACK, J. R.; MCKERNAN, R. M.; DAWSON, G. R.; REYNOLDS, D. S. Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABA_A receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Journal Neuroscience**, v. 25, p. 10682–10688, 2005.

DINIZ, L. R. L.; SOUSA, M. T. S.; BARBOZA, J. N.; ALMEIDA, R. N.; SOUSA, D. P. Antidepressant Potential of Cinnamic Acids: Mechanisms of Action and Perspectives in Drug Development. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 4469, 2020.

DOUGNON, G.; ITO, M. Inhalation administration of the bicyclic ethers 1,8- and 1,4-cineole prevent anxiety and depressive-like behaviours in mice. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1884, 2020.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208–9, 1957.

DU JARDIN, K. G.; MÜLLER, H. K.; ELFVING, B.; DALE, E.; WEGENER, G.; SANCHEZ, C. Potential involvement of serotonergic signaling in ketamine's antidepressant actions: a critical review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 71, p. 27–38, 2016.

ELDER, D.; HOLM, R. Aqueous solubility: Simple predictive methods (in silico, in vitro and bio-relevant approaches). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 3–11, 2013.

FATURI, C. B.; LEITE, J. R.; ALVES, P. B.; CANTON, A. C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in wistar rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 605-609, 2010.

FEDOTOVA, J.; KUBATKA, P.; BÜSSELBERG, D.; SHLEIKIN, A. G.; CAPRND, M.; DRAGASEK, J.; RODRIGO, L.; POHANKA, M.; GASPAROVA, I.; NOSAL, V.; OPATRILOVA, R.; QARADAKHI, T.; ZULLI, A.; KRUZLIK, P. Therapeutic strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, p. 437–446, 2017.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e química dos compostos naturais. **Química nova**, v. 39, 2017.

FILHO, A. A. O.; OLIVEIRA, H. M. B. F.; MEDEIROS, C. I. S.; PESSÔA, H. Antifungal effect of 7-hydroxycitronellal against *C. Tropicalis* strains: an in vitro approach. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 1, p. 204-208, 2017.

FONSÊCA, D. V.; FILHO, C. S. M. B.; LIMA, T. C.; ALMEIDA, R. N.; SOUSA, D. P. Anticonvulsant essential oils and their relationship with oxidative stress in epilepsy. **Biomolecules**, v. 9, p. 1–40, 2019.

FLORES, C. E. Shaping inhibition: activity dependent structural plasticity of GABAergic synapses. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 327, 2014.

GARLET, Q. I.; PIRES, L. C.; SILVA, D. T.; SPALL, S.; GRESSLER, L. T.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, 2016.

GALDINO, P. M. **Avaliação da atividade tipo ansiolítica do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. ST. HIL. – possível mecanismo envolvido**. 102p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2011.

GHAZIZADEH, J.; HAMEDEYAZDAN, S.; TORBATI, M.; FARAJDOKHT, F.; FAKHARI, A.; MAHMOUDI, J.; ARAJ-KHODAEI, M.; SADIGH-ETEGHAD, S. *Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. **Experimental Physiology**, v. 105, p. 707–720, 2020.

GUIDOTTI, A.; BARALDI, M.; LEON, A.; COSTA, E. Benzodiazepines: a tool to explore the biochemical and neurophysiological basis of anxiety. **Biochemical Journal**, v. 39, p. 3039-3042, 1980.

GUIMARÃES, A. M. V.; NETO, A. C. S.; VILAR, A. T. S.; ALMEIDA, B. G. C.; FERMOSELI, A. F. O.; ALBUQUERQUE, C. M. F. Transtornos de ansiedade: um estudo de prevalência sobre as fobias específicas e a importância da ajuda psicológica. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 3, p.115-128, 2015.

GREGER, I. H.; WATSON, J. F.; CULL-CANDY, S. G. Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins. **Neuron**, v. 94, n. 4, p. 713-730, 2017.

GRAVIELLE, M. C. Regulation of GABA_A receptors by prolonged exposure to endogenous and exogenous ligands. *Neurochemistry International*, v. 118, p. 96-104, 2018.

HARVEY, B.; SHAHID, M. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 775-800, 2012.

HATANO, V. Y.; TORRICELLI, A. S.; GIASI, A. C. C.; COSLOPE, L. A.; VIANA, M. B. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 238-243, 2012.

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

HELDWEIN, C. G.; SILVA, L. L.; GAI, E. Z.; ROMAM, C.; PARODI, T. V.; BURGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E. M. M.; HEINZMANN, B. M. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, p. 621–9, 2014.

HELDWEIN, C. G.; SILVA, L. L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F. M. C.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C. A.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 436–43, 2011.

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

HOOD, S. D.; NORMAN, A.; HINCE, D. A.; MELICHAR, J. K.; HULSE, G. K. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 285–294, 2012.

IRMES, G.; VERESS, G.; VOLFORD, A.; FARKAS, O. Molecules from the Minkowski space: an approach to building 3D molecular structures. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, v. 666-667, p. 51-59, 2003.

JIMÉNEZ-FERRER, E.; SANTILLÁN-URQUIZA, M. A.; ALEGRÍA-HERRERA, E.; ZAMILPA, A.; NOGUERÓN-MERINO, C.; TORTORIELLO, J.; NAVARRO-GARCÍA, V.; AVILÉS-FLORES, M.; FUENTES-MATA, M.; HERRERA-RUIZ, M. Anxiolytic effect of fatty acids and terpenes fraction from *Aloysia triphylla*: Serotonergic, GABAergic and glutamatergic implications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 320–327, 2017.

KALUEFF, A.; JENSEN, C. L.; MURPHY, D. L. Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. **Brain Research**, v. 1169, p. 87-97, 2007.

KEESHIN, B. R.; STRAWN, J. R.; OUT, D.; GRANGER, D. A.; PUTNAM, F. A. Cortisol awakening response in adolescents with acute sexual abuse related posttraumatic stress disorder, **Depression and Anxiety**, v. 31, n. 2, p. 107-14, 2013.

LAMBERTUCCI, C.; MARUCCI, G.; BEM, D. D.; BUCCIONI, M.; SPINACI, A.; KACHLER, S.; KLOTZ, K. N.; VOLPINI, R. New potent and selective A1 adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.

LA ROCCA, V.; FONSÊCA, D. V.; SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; SOUSA, D. P.; SANTOS, P. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; LEAL-CARDOSO, J. H.; ALMEIDA, R.N. Geraniol induces antinociceptive effect in mice evaluated in behavioural and electrophysiological models. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, p. 22–29, 2020.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LEVI, S.; ROUX, N. L.; EUGÈNE, L.; PONCER, J. C. Benzodiazepine ligands rapidly influence GABA_A receptor diffusion and clustering at hippocampal inhibitory synapses. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 199-208, 2015.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

LIMA, N. G.; SOUSA, D. P.; PIMENTA, F. C. F.; ALVES, M. F.; SOUSA, 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 & Behavior**, v. 103, n. 3, p. 450-4, 2013.

LINCK, V. M.; SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ, M.; CARAMÃO, E. B.; MORENO, P. R. H.; ELIZATETSKY, E. Effects of inhaled linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, 2010.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 2012.

LIU, D.; GENG, T.; ZHANG, L.; YAO, W.; DING, A.; SHAN, M. Acute and subacute toxicity and genotoxicity of schizonepetin, a naturally occurring monoterpene with antiviral activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2256–2262, 2012.

LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDAL, W. B.; BAKKER, P. I. W.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v. 50, n. 3, p. 437-450, 2003.

LÜTHI, A.; LÜSCHER, C. Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. **Nature Neuroscience**, v. 17, p. 1635-43, 2014.

MACHADO, M. B.; IGNÁCIO, Z. M.; JORNADA, L.; RÉUS, G. Z. Prevalência de transtornos ansiosos e algumas comorbidades em idosos: um estudo de base populacional. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 65, p. 28-35, 2016.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A.; GRANDO, J.; BROCARD, P. S.; BETTIO, L. E. B.; CAPRA, J. C.; RODRIGUES, A. L. S. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 103, n. 2, p. 220-9, 2012.

MALDE, A. K.; ZUO, L.; BREEZE, M.; STROET, M.; POGER, D.; NAIR, P. C.; OOSTENBRINK, C.; MARK, A. E. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, p. 4026-37, 2011.

MARON, E.; NUTT, D. Biological markers of generalized anxiety disorder. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, p. 147-157, 2017.

MELO, M. S.; SANTANA, M. T.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, R. S.; SOUSA, D. P.; SANTOS, M. R. V.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S.; ONOFRE, A. S. C.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 697-703, 2011.

MELO, M. S.; SENA, L. C. S.; BARRETO, F. J. N.; BONJARDIM, L. R.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SOUSA, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 411-6, 2010.

MENEZES, P.; ARAÚJO, F. O.; ANDRADE, T. A.; TRINDADE, I. A. S.; ARAUJO-FILHO, H. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MENEZES, L. R. A.; ALMEIDA, R. N.; BRAGA, R. M.; SERAFINI, M. R.; COSTA, E. V.; ARAUJO, A. A. S. Physicochemical Characterization and Antinociceptive Effect of β -cyclodextrin/Lippia pedunculosa Essential Oil in Mice. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 797-807, 2018.

MERCKEL, F.; BERNARD, G.; MUTSCHLER, J.; GIMÉNEZ-ARNAU, E.; GERBERICK, G. F.; LEPOITTEVIN, J. P. Effect of a microemulsion system on hapten-peptide reactivity studies: examples of hydroxycitronellal and citral, fragrance skin sensitizers, with glutathione. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 411-416, 2010.

MORAES, A. D. T. O.; MIRANDA, M. D. S.; JACOB, I. T. T.; AMORIM, C. A. C.; MOURA, R. O.; SILVA, S. A. S.; SOARES, M. B. P.; ALMEIDA, S. M. V.; SOUZA, T. R. C. L.; OLIVEIRA, J. F.; SILVA, T. G.; MELO, C. M. L.; MOREIRA, D. R. M.; LIMA, M. C. A. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazones derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 5388–5396, 2018.

MOREIRA, M. R. C. **Efeitos do monoterpeno (-)-mirtenol sobre o Sistema Nervoso Central: estudos *in vitro* e *in vivo***. 191p. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2013.

MOHEBITABAR, S.; SHIRAZI, M.; BIOOS, S.; RAHIMI, R.; MALEKSHAHI, F.; NEJATBAKHSH, F. Therapeutic efficacy of rose oil: a comprehensive review of clinical evidence. **Avicenna Journal of Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 206–213, 2017.

NARVAES, R.; ALMEIDA, R. M. M. Aggressive behavior and three neurotransmitters: dopamine, GABA, and serotonin—a review of the last 10 years. **Psychology & Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 601-607, 2014.

NARDELLI, A.; DRIEGHE, J.; CLAES, L.; BOEY, L.; GOOSSENS, A. Fragrance allergens in ‘specific’ cosmetic products. **Contact Dermatitis**, v. 64, p. 212-219, 2011.

NETO, H. C. A.; FONSÊCA, D. V.; BRAGA, R. M.; SCOTTI, M. T.; NASCIMENTO, T. W. A. B.; ASSIS, D. B.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; SILVA, L. H. A. C.; GALVÃO, J. G. F. M.; ROCHA, H. A. O.; VIDAL, A. A. J.; FILHO, J. M. B.; ALMEIDA, R. N. 2-allylphenol reduces IL-1 β and TNF- α , promoting antinociception through adenosinergic, anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

NETO, G.; C. **Estudo não-clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em um complexo de inclusão com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina**. 2021. 85f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Em Medicamentos – PPGDITM). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2021.

NESTLER, J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NOBREGA, F. F. F.; SALVADORI, M. G. S. S.; MASSON, C. J.; MELLO, C. F.; NASCIMENTO, T. S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Monoterpenoid terpinen-4-ol exhibits anticonvulsant activity in behavioural and electrophysiological studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

NOGOCEKE, F. P.; BARCARO, I. M. R.; SOUSA, D. P.; ANDREATINI, R. Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice. **Neuroscience Letters**, v. 619, 43-48, 2016.

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

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, p. 528-543, 2014.

OLIVEIRA, J. D.; ALVES, D. K. M.; MIRANDA, M. L. D.; ALVES, J. M.; XAVIER, M. N.; CAZAL, C. M.; ALVES, C. C. F. Chemical composition of essential oil extracted from leaves of *Campomanesia adamantium* subjected to different hydrodistillation times. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47. 2017.

OLIVEIRA-FILHO, A. A. **Avaliação dos efeitos farmacológicos e toxicológicos do estrato etanólico, fase clorofórmica e flavonoide de *Praxelis clematidea* (griseb.) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae)**. 2015. 174 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

OLSEN, R. W. Allosteric ligands and their binding sites define gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes. **Advances in Pharmacological**, v. 73, p. 167–202, 2015.

OMS – **Organização Mundial Da Saúde**. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017.

OSÓRIO, C. B. H. **Atividade gastroprotetora do hidroxycitronelal em modelos de lesão gástrica aguda em camundongos**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Farmacologia). Departamento de Fisiologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2011.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605–1612, 2004.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 24, 525-529, 1986.

PENNINX, B. W. J. H.; PINE, D. S.; HOLMES, E. A.; REIF, A. Anxiety disorders. **Lancet**, v. 397, p. 914–27, 2021.

PETRISOR, G.; MOTELICA, L.; CRACIUN, L. N.; OPREA, O. C.; FICAI, D.; FICAI, A. *Melissa officinalis*: composition, pharmacological effects and derived release systems—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 2022.

PERNA, G.; ALCIATI, A.; RIVA, A.; MICIELI, W.; CALDIROLA, D. Long-term pharmacological treatments of anxiety disorders: an updated systematic review. **Current Psychiatry Reports**, v. 18, n. 23, 2016.

POMPEU, T. E.; ALVES, F. R. S.; FIGUEIREDO, C. D. M.; ANTONIO, C. B.; HERZFELDT, V.; MOURA, B. C.; RATES, S. M. K.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; NOËL, F. Synthesis and pharmacological evaluation of new N-phenylpiperazine derivatives designed as homologues of the antipsychotic lead compound LASSBio-579. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 122-34, 2013.

PREVOT, T. D.; LI, G.; VIDOJEVIC, A.; MISQUITTA, K. A.; FEE, C.; SANTRAC, A.; KNUTSON, D. E.; STEPHEN, M. R.; KODALI, R.; ZAHN, N. M.; ARNOLD, L. A.; SCHOLZE, P.; FISHER, J. L.; MARKOVIĆ, B. D.; BANASR, M.; COOK, J. M.; SAVIC, M.; SIBILLE, E. Novel Benzodiazepine-Like Ligands with Various Anxiolytic, Antidepressant, or Pro-Cognitive Profiles. **Molecular Neuropsychiatry**, v. 5, n. 2, p. 84–97, 2019.

PRÓSPERO, D. F. A.; FILHO, A. C. R.; PIAUILINO, C. A.; LOPES, E. M.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, F. R. C. Effects of isopulegol in acute nociception in mice: possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and L-arginine/NO/cGMP pathway. **Chemico-Biological Interactions**, 293:55-60, 2018.

PYTKA K.; ŻMUDZKA E.; LUSTYK K.; RAPACZ A.; OLCZYK A.; GAŁUSZKA A.; WASZKIELEWICZ A.; MARONA H.; SAPA J.; BARBARA F. The antidepressant- and anxiolytic-like activities of new xanthone derivative with piperazine moiety in behavioral tests in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 286-91, 2016.

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

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELO, M. S.; SOUSA, D. P.; ARAÚJO, A. A. S.; ONOFRE, A. C. S.; GELAIN, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BONJARDIM, L. R. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of Orofacial Pain**, v. 24, n. 3, p. 305-312, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; ROCHA, R. F.; CAREGNATO, F. F.; MOREIRA, J. C. F.; SILVA, F. A.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS, J. P. A.; MELO, M. S.; SOUSA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; GELAIN, D. P. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 630–9, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. 7 ed, Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2012.

RANG, H. P.; RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAHMANI, B.; GHASEMI, R.; DARGAHI, L.; AHMADIANI, A.; HAERI, A. Neurosteroids; potential underpinning roles in maintaining homeostasis. Neurosteroids; potential underpinning roles in maintaining homeostasis. **General and comparative endocrinology**, v. 225, p. 242–50, 2016.

RAY, S. M.; KIOUS, B. M. Sustained resolution of panic disorder, agoraphobia, and generalized anxiety disorder with a single ketamine infusion: a case report. **Primary Care Companion for CNS Disorders**, v. 18, p. 2–4, 2016.

REHMAN, R., HANIF, M. A.; MUSHTAQ, Z.; AL-SADI, A. M. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: a review. **Food research international**, v. 32, p. 117-160, 2016.

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, n. 3, p. 247–267, 2018.

RIBEIRO, N. F. Tratamento da Insônia em Atenção Primária à Saúde. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 11, n. 38, p.1-14, 2016.

RODRIGUES, A. L.; ROCHA, J. B.; MELO, C. F.; SOUZA, D. O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 150-6, 1996.

RUSCIO, A. M.; HALLION, L.; LIM, C. C. W.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; AL-HAMZAWI, A.; ALONSO, J.; ANDRADE, L. H.; BORGES, G.; BROMET, E. J.; BUNTING, B.; ALMEIDA, J. M. C.; DEMYTTENAERE, K.; FLORESCU, S.; GIROLAMO, G.; GUREJE, O.; HARO, J. M.; HE, Y.; HINKOV, H.; HU, C.; JONGE, P.; KARAN, E. G.; LEE, S.; LEPINE, J. P.; LEVINSON, D.; MNEIMNEH, Z.; NAVARRO-MATEU, F.; POSADA-VILLA, J.; SLADE, T.; STEIN, D. J.; TORRES, Y.; UDA, H.; WOJTYNIAK, B.; KESSLER, R. C.; CHATTERJI, S.; SCOTT, K. M. Cross-sectional comparison of the epidemiology of DSM-5 generalized anxiety disorder across the globe. **JAMA Psychiatry**, v. 74, p. 465–75, 2017.

SALGADO, P. R. R.; FONSÊCA, D. V.; MELO, C. G. F.; LEITE, F. C.; ALVES, A. F.; FERREIRA, P. B.; PIUVEZAM, M. R.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Comparison of behavioral, neuroprotective, and proinflammatory cytokine modulating effects exercised by (+)-cis-EC and (–)-cis-EC stereoisomers in a PTZ-induced kindling test in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 32, p. 507–515, 2018.

SANTIN J. R., UCHÔA, F. D. T.; LIMA, M. C. A.; RABELLO, M. M.; MACHADO, I. D.; HERNANDES, M. Z.; AMATO, A. A.; MILTON, F. A.; WEBB, P.; NEVES, F. A. R.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; FARSKY, S. H. P. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4-5, p. 689-97. 2013.

SANTANA, M. T., OLIVEIRA, M. G. B.; SANTANA, M. F.; SOUSA, D. P.; SANTANA, D. G.; CAMARGO, E. A.; OLIVEIRA, A. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 1144–9, 2013.

SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Theory and Computacional**, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.

SANTOS, P. S.; FREITAS, R. M. Atividades ansiolítica e anticonvulsivante de constituintes de óleos essenciais. **Revista Interdisciplinar**, v. 6, n. 1, p. 105-111, 2013.

SANTOS, C. B. R.; LOBATO, C. C.; BRAGA, F. S.; MORAIS, S. S. S.; SANTOS, C. F.; FERNANDES, C. P.; BRASIL, D. S. B.; HAGE-MELIM, L. I. S.; MACÊDO, W. J. C.; CARVALHO, J. C. T. Application of hartree-fock method for modeling of bioactive molecules using SAR and QSPR. **Computational Molecular Bioscience**, v. 4, p. 1-24, 2014a.

SANTOS, P. L.; BRITO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; QUINTANS, J. S. S.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, M. R. V.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, v. 23, p. 948–957, 2016.

SATOU, T.; KASUYA, H.; MAEDA, K.; KAZUO, K. Daily inhalation of alpha-pinene in mice: effects on behavior and organ accumulation. **Phytotherapy Research** 28(9): 1284-1287, 2014.

SALEHI, B.; UPADHYAY, S.; ORHAN, I. E.; JUGRAN, A. K.; JAYAWEEERA, S. L. D.; DIAS, D. A.; SHAROPOV, F.; TAHERI, Y.; MARTINS, N.; BAGHALPOUR, N.; CHO, W. C.; SHARIFI-RAD, J. Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature. **Biomolecules**, v. 9, n. 738, 2019.

SILVA, D. M.; SANZ, G.; VAZ, B. G.; CARVALHO, F. S.; LIÃO, L. M.; OLIVEIRA, D. R.; MOREIRA, L. K. S.; CARDOSO, C. F.; BRITO, A. F.; SILVA, D. P. B.; ROCHA, F. F.; SANTANA, I. G. C.; GALDINO, P. M.; COSTA, E. A.; MENEGATTI, R. Tert-butyl 4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl) methyl) piperazine-1-carboxylate (LQFM104)- new piperazine derivative with antianxiety and antidepressant-like effects: putative role of serotonergic system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 546-552, 2018.

SILVA, L. C. C. P.; CHUMBINHO, L. C.; PIZZINI, C. C.; BATISTA, W. S.; OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, G. M. O uso de animais de laboratório como modelos experimentais para o estudo de transtornos psiquiátricos. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, p. 270-278, 2012.

SILVEIRA, N. S.; OLIVEIRA-SILVA, G. L.; LAMANES, B. F.; PRADO, L. C. S.; BISPO-DA-SILVA, L. B. The Aversive, Anxiolytic-Like, and Verapamil-Sensitive Psychostimulant Effects of Pulegone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 771–778, 2014.

SIEGHART, W. Allosteric modulation of GABA_A receptors via multiple drug-binding sites. **Advances in Pharmacological**, v. 72, p. 53–96, 2015.

SOUSA, L. P. C.; VEDANA, KELLY, G. G.; MIASSO, A. I. Adesão ao tratamento medicamentoso por pessoas com transtorno de ansiedade. **Cogitare Enfermagem**, v. 21, n. 1, p.1-11, 2016.

SOUSA, D. P. Medicinal essential oils: Chemical, pharmacological and therapeutic aspects. **Nova Science Publishers**, 2012.

SOETER, M.; KINDT, M. An abrupt transformation of phobic behavior after a post-retrieval amnesic agent. **Biological Psychiatry**, v. 78, p. 880–886, 2015.

SONG, Y.; SEO, S.; LAMICHHANE, S.; SEO, J.; HONG, J. T.; CHA, H. J.; YUN, J. Limonene has anti-anxiety activity via adenosine A2A receptor-mediated regulation of dopaminergic and GABAergic neuronal function in the striatum. **Phytomedicine**, v. 83, 2021.

SHAW, D.; NORWOOD, K.; KENNEDY, P. J.; LESLIE, J. C. Effects of linalool on extinction of mouse operant behaviour. **Behavioural Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 73-80, 2020.

SMOLLER, J. W. The genetics of stress-related disorders: PTSD, depression, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 297–319,

SMITH, K. S.; ENGIN, E.; MELONI, E. G.; RUDOLPH, U. Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABA_A receptor subtypes in mice. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 250–258, 2012.

SWAINSON, J.; MCGIRR, A.; BLIER, P.; BRIETZKE, E.; RICHARD-DEVANTOY, S.; RAVINDRAN, N.; BLIER, J.; BEAULIEU, S.; FREY, B. N.; KENNEDY, S. H.; MCINTYRE, R. S.; MILEV, R. V.; PARIKH, S. V.; SCHAFFER, A.; TAYLOR, V. H.; TOURJMAN, V.; AMERINGEN, M. V.; YATHAM, L.; N.; RAVINDRAN, A.; V.; LAM, R. W. The Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) Task Force Recommendations for the Use of Racemic Ketamine in Adults with Major Depressive Disorder. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 113-125, 2021.

STOJANOVIĆ, N.; MLADENOVIĆ, M. Z.; MASLOVARIĆ, A.; STOJILJKOVIĆ, N. I.; RANDJELOVIĆ, P. J.; RADULOVIĆ, N. S. Lemon balm (*melissa officinalis* l.) Essential oil and citronellal modulate anxiety-related symptoms – *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 284, 2022.

VITÓRIA, F. N.; AVERSA, R.; PENTEADO, F.; CASTRO, M.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. Antioxidant and antidepressant-like activities of semi-synthetic α -phenylseleno citronellal. **European Journal of Pharmacology**, v. 742, p. 131–138, 2014.

TANKAM, J. M.; ITO, M. Inhalation of the essential oil of *Piper guineense* From Cameroon Shows sedative and anxiolytic-like effects in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 1608–1614, 2013.

TING, J. T.; FENG, G. Neurobiology of obsessive-compulsive disorder: insights into neural circuitry dysfunction through mouse genetics. **Current Opinion Neurobiology**, v. 21, n. 6, p. 842-8, 2011.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 148, n. 63–106, 2015.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3315–21, 2006.

UMEZU, T. Behavioral effects of plant-derived essential oils in the Geller type conflict test in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 150–153, 2000.

VAIDYA, A.; JAIN, S.; JAIN, A. K.; AGRAWAL, A.; KASHAW, S. K.; JAIN, S. K. AGRAWAL, R. K. Metabotropic glutamate receptors: a review on perspectives and therapeutic aspects. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 1967-1981, 2013.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. Swiss-model: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 296-303, 2018.

WANG, Z. J.; HEINBOCKEL, T. Essential oils and their constituents targeting the GABAergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. **Molecules**, v. 23, p. 1061, 2018.

WANG, W.; ZHOU, T.; JIA, R.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, C.; DONG, Y.; WANG, J.; SHENG, L.; WU, H.; CHEN, G.; XUE, W. NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway contribute to the antidepressant-like effect of Yueju pill in mice. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 9, 2019.

WILTGEN, B. J.; GODSI, B. P.; PENG, Z.; SAAB, F.; JUNE, H. L.; LINN, M. L. V.; COOK, J. M.; HOUSER, C. R.; O'DELL, T. J.; HOMANICS, G. E.; FANSELOW, M. S. The $\alpha 1$ subunit of the GABA(A) receptor modulates fear learning and plasticity in the lateral amygdala. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. 37, 2009.

WILSON, H.; MANNIX, S.; OKO-OSI, H.; REVICKI, D. A. The impact of medication on health-related quality of life in patients with generalized anxiety disorder. **CNS Drugs**, v. 29, p. 29–40, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health atlas 2011**. Geneva: World Health Organization. 2017.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A. Toxicity of selected monoterpenes and essential oils rich in these compounds. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1716, 2022.

XU, Y.; WANG, C.; KLABNIK, J. J.; DONNELL, J. M. O. Novel Therapeutic targets in depression and anxiety: antioxidants as a candidate treatment. **Current Neuropharmacology**, v. 12, n. 2, p. 108–119, 2014.

XU, X.; HU, Z. Q.; WANG, C.; YIN, Z. Q.; WEI, Q.; ZHOU, L. J.; LI, L.; DU, Y. H.; JIA, R. Y.; LI, M.; FAN, Q. J.; LIANG, X. X.; HE, C. L.; YIN, L. Z. Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 7, n. 4, p. 1495-1501, 2014.

YANG, H.; WOO, J.; PAE, A. N.; UM, M. Y.; CHO, N. C.; PARK, K. D.; YOON, M.; KIM, J.; LEE, C. J.; CHO, S. α -pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABA_A-benzodiazepine receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 530-539, 2016.

YAŞAR, Ş. N.; CAN, O. D.; OZTÜRK, N.; SAGRATINI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; MAGGI, F. Central Nervous System activities of *Hypericum origanifolium* extract via GABAergic and opioidergic mechanisms. **Phytoterapy Research**. v. 27, p. 877-884, 2013.

ZANOS, P.; GOULD, T. D. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 4, p. 801-811, 2018.

ZHUO, M. Cortical kainate receptors and behavioral anxiety. **Molecular Brain**, (2017) v. 10, n. 16, 2017.

ANEXO 1

Certificado CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MONOTERPENO COM POTENCIAL AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E/OU ANSIOLÍTICA: POSSÍVEIS MECANISMOS NEURAIS", protocolada sob o CEUA nº 1854110719 (ID 000751), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida e equipe; JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 09/08/2019.

We certify that the proposal "MONOTERPENE WITH POTENTIAL ANTINOCICEPTIVE AND / OR ANSIOLYTIC ACTION: POSSIBLE NEURONAL MECHANISMS", utilizing 357 Heterogenics mice (357 males), protocol number CEUA 1854110719 (ID 000751), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida and team; JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 08/09/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2019 a 12/2023** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IpeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 4 meses**

N: **357**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **20 a 40 g**

Local do experimento: **Laboratório de Psicofarmacologia/IpeFarM/UFPB**

João Pessoa, 09 de agosto de 2019

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO 2

Tabela utilizada para a realização da triagem
farmacológica (ALMEIDA, 2006)

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	Até 30'	1 h	2 h	3 h	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					

Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Fonte: Almeida (2006)

ANEXO 3

Artigo produzido na vigência do doutorado

Research Article

Involvement of GABA_A Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal

Jéssica C. Andrade¹, Álefe B. Monteiro¹, Humberto H. N. Andrade¹,
Thallita K. S. N. Gonzaga¹, Pablo R. Silva¹, Danielle N. Alves², Ricardo D. Castro²,
Mayara S. Maia³, Marcus T. Scotti³, Danião P. Sousa⁴ and Reinaldo N. Almeida¹

¹Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-085, Via Ipê Amarelo/SN, João Pessoa, Paraíba, Brazil

²Department of Clinic and Social Dentistry, Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil

³Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-000, Via Ipê Amarelo/SN, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Correspondence should be addressed to Reinaldo N. Almeida; reinaldoan@uol.com.br

Received 7 March 2021; Accepted 3 June 2021; Published 17 June 2021

Academic Editor: Bogdan Tamba

Copyright © 2021 Jéssica C. Andrade et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hydroxycitronellal (HC) is a monoterpene present in essential oils of aromatic plants of different species, obtained from semisynthesis of citronellal, and is widely used as a fragrance in cosmetics. The objective of this work was to evaluate the possible anxiolytic-like activity of HC and its possible mechanism of action using *in vivo* and *in silico* methodologies. Swiss male mice (*Mus musculus*) were treated with HC (12.5, 25, and 50 mg/kg, i.p.) and subjected to the rota rod, elevated plus maze, and open field tests. No significant impairments were observed in the rota rod tests for the motor activity of the animals treated with HC at 12.5, 25, and 50 mg/kg, i.p., indicating no myo-relaxing or sedative effects. In the elevated plus maze, HC (in the three doses) induced significant increases in the percentage of entries (respectively, 34.8%, 33.8%, and 38.6%) and in the length of stay (respectively, 49.9%, 56.1%, and 57.0%) in the open arms of the EPM, as well as the number of crossings in the open field tests. The mechanism of action of the compound's anxiolytic-like activity can be attributed to the involvement of GABA_A receptors, and this interaction was observed in *in vivo* and *in silico* studies. For HC, the results suggest anxiolytic-like effects, possibly via modulation of the GABAergic system. The use of natural products to treat anxiety can become an alternative to existing synthetic products.

1. Introduction

Anxious behavior is part of the normal spectrum of human experience. In certain situations, all people in life experience anxiety, especially when faced with some warning of imminent danger. This reaction allows us to escape from dangerous situations, as well as to improve our response in the face of adverse conditions when imposed by the environment

[1]. If the risk response is emotionally disproportionate to the situation that triggers it, anxiety becomes a disorder [2].

Inherited genetic, neurobiological, environmental, and traumatic experiences can trigger pathologically anxious behavior. Anxious disorders are a clinical condition in which anxiety is the primary symptom and does not originate in other disorders, such as depression [3]. According to the World Health Organization, the proportion of the

ANEXO 4

Trabalho apresentado na vigência do doutorado



Universidade do Estado da Bahia
Departamento de Ciências da Vida - Campus I
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Certificado



Certificamos que JÉSSICA CABRAL DE ANDRADE participou da I Escola De Inverno em Ciências Farmacêuticas, promovida pelo PPGFARMA/UNEB em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PPgPNSB/UFPB), apresentando os resultados do seu projeto de pesquisa (carga-horária 2 horas).

Salvador, 13 de Agosto de 2021



Aníbal de Freitas Santos Júnior
Coordenação Geral do Evento

Certificado registrado sob o número 402893891.39.20210813

ANEXO 5

Trabalho submetido na vigência do doutorado

Current Neuropharmacology



Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Diseases: An Review with experimental approach.

Journal:	<i>Current Neuropharmacology</i>
Manuscript ID	CN-2022-0104
Manuscript Type:	Thematic Issue Article
Date Submitted by the Author:	24-Apr-2022
Complete List of Authors:	da Silva, Pablo; Universidade Federal da Paraiba, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos ; ANDRADE, JESSICA FERREIRA, NATÁLIA PORTELA, ANNE PIRES, HUGO REMÍGIO, MARIA ALVES, DANIELLE ANDRADE, HUMBERTO GOLZIO, ADRIANA CASTRO, RICARDO FELIPE, CÍCERO Scotti, Marcus; Universidade Federal da Paraiba ALMEIDA, REINALDO Scotti, Luciana; Federal University of Paraiba,
Keywords:	Molecular Docking, Neurodegeneration, Natural Products, Monoterpenes, Neuroprotection, neuropathy

SCHOLARONETM
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/crn>