



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI, URCA – CE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO**  
**MOLECULAR**

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-  
SÍMILE DO  $\alpha$ -HUMULENO EM CAMUNDONGOS**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**GIOVANA MENDES DE LACERDA LEITE**

**CRATO-CE**

**2020**

**GIOVANA MENDES DE LACERDA LEITE**

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO  $\alpha$ -HUMULENO  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Regional do Cariri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, área de concentração em Bioprospecção de Produtos Naturais, para obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Regina Kerntopf

Orientadora

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

Coorientador

CRATO-CE  
2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA  
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva de Sousa CRB: 3/1000

Leite, Giovana Mendes de Lacerda.  
L533d Determinação do efeito antidepressivo-símile do  $\alpha$ -humuleno em camundongos/ Giovana Mendes de Lacerda Leite. – Crato – CE, 2020.  
158p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais  
Orientadora: Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf  
Coorientador: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

1. Transtornos mentais, 2. Depressão, 3. Sesquiterpenos, 4. Atividade antidepressiva-símile 5.  $\alpha$ -humuleno; I. Título

CDD: 616.8527

GIOVANA MENDES DE LACERDA LEITE

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO  $\alpha$ -HUMULENO  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Regional do Cariri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, área de concentração em Bioprospecção de Produtos Naturais, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 24 de setembro de 2020.

Prof.ª. Dr.ª. Roseli Barbosa – URCA

Prof. Dr. Diógenes de Queiroz Dias – FATENE

Prof.ª. Dr.ª. Marta Regina Kerntopf – Orientadora

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe – Co-orientador

Prof.ª. Dr.ª. Marta Regina Kerntopf  
Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

Dedico este trabalho à Deus, à meu marido, aos meus pais e toda minha família, por sempre me apoiarem durante todo caminho que trilhei até aqui, e por saber que sempre estarão ao meu lado, dando força e me fazendo acreditar que: “Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses 4: 13)”.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente **a Deus**, por ter me concedido o direito à vida, e por ter dado forças para vencer todos os obstáculos que encontrei durante minha caminhada.

**À meu esposo**, João Carlos, por todo amor, companheirismo e paciência que ele teve comigo em todos esses anos. Foram muitos momentos nos quais ele sempre esteve pronto para me ouvir, me apoiar e me confortar. TE AMO!

**Aos meus pais**, Maria do Socorro Mendes de Lacerda Lucena e Manoel Nertan de Lacerda Lucena, pelos incansáveis esforços que fizeram para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos por completo. Agradeço pelos conselhos e por toda força que me deram para que hoje eu pudesse estar vencendo mais uma etapa no ciclo da vida. **À minha irmã**, Ludmila Lacerda. E à toda minha família. Vocês são muito importantes para mim!

**Às minhas amigas** (irmãs do coração), **Brenda, Neyze, Thais Albuquerque e Tatyelle** por continuarem comigo, mesmo após o término da graduação, estendendo nossa amizade além dos limites da universidade. Enfim, agradeço a todas por serem minha família no Crato, e por aguentarem minhas lamentações nos momentos de estresse. AMO TODAS!

**À minha orientadora**, Dr. Marta Regina Kerntopf, por todas as oportunidades que me proporcionou desde que a conheci; pelos conhecimentos transmitidos; por colocar as pessoas certas na minha vida que tanto me ensinaram (Rafael, Álefe, Izabel, Gyllyandeson, Diógenes e o professor Cicero); por me fazer acreditar no meu potencial e por nunca deixar que eu desistisse do laboratório e dos sonhos que construí dentro da Universidade, me incentivando a tentar o mestrado e aqui estou. – “Professora, serei eternamente grata por todo carinho e consideração!”.

**Ao meu co-orientador**, o prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe, por todos os ensinamentos. Mesmo distante, sempre estava pronto para nos ajudar na construção desta dissertação. Gratidão professor!

**À todos que fazem a família LFPN, LFCE e LFQM**, minha eterna gratidão por todo suporte, ensinamentos e companheirismo durante minha graduação e mestrado. Que externar meus agradecimentos, também, de maneira especial ao professor Dr. Irwin e a prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseli por todos os ensinamentos, junto a prof<sup>a</sup>. Marta. Todos foram muito importantes para a pesquisadora que me tornei.

**Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** meus agradecimentos por todo ensinamento e colaboração para construção deste trabalho. Gratidão!

**Às minhas irmãs que o mestrado me deu, Maysa e Janice.** Eu sempre acredito que Deus coloca as pessoas certas no momento certo para nos ajudar. Gratidão por todo companheirismo e por poder nos fortalecer juntas durante essa caminhada. Enfim, foram muitos risos, conversas, sermões, as vezes tristezas; mas estamos aqui, e espero que esta amizade siga para além deste mestrado.

**Aos meus avaliadores de qualificação e defesa,** gratidão por todo carinho e prontidão em aceitar o convite para fazerem parte deste momento, e por contribuírem tanto neste trabalho.

A todos que fazem parte da **Universidade Regional do Cariri (URCA)**, muito obrigada por todo suporte desde a graduação até o mestrado. A esta universidade que tanto temos orgulho de dizermos fazer parte, gratidão por todas as oportunidades. **Ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular**, por todos os ensinamentos e por tornar possível meu sonho de ser Mestre. A coordenação e a todos os professores pelo imenso suporte, minha eterna gratidão. A nossa secretária do PPBM, a **querida Francy**, muito obrigada por todo carisma, prontidão e zelo em nos atender; muito obrigada Francy por trabalhar tão bem.

**Às unidades de fomento, FUNCAP, FINEP, CNPQ e CAPES,** por auxiliarem nas pesquisas com a parte financeira. Desde estrutura física, bolsas para alunos de iniciação científica que sempre nos ajudam em nossas pesquisas, financiamentos de aparelhos e materiais; muito obrigada. **À FUNCAP**, agradeço por ser a unidade de fomento da bolsa que tive no mestrado. Todos foram muito importantes para conclusão de todos os objetivos.

**Ao biotério,** e todos que fazem parte de sua organização, obrigada por todo empenho. **Aos animais de experimentação** que foram utilizados neste trabalho. Meu respeito!

## SUMÁRIO

<b>Lista de Símbolos e Abreviaturas</b>	i
<b>Lista de Figuras</b>	iii
<b>Lista de Tabelas e quadros</b>	iv
<b>Resumo</b>	v
<b>Abstract</b>	vi
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão de Literatura</b>	5
2.1. Transtornos Mentais	5
2.2. Depressão	6
2.2.1. Causas biológicas da depressão	6
2.2.1.1. Neurotransmissores cerebrais (hipótese monoaminérgica)	7
2.2.1.2. Participação do estresse oxidativo no desenvolvimento da Depressão	9
2.3. Terapia farmacológica e a utilização de plantas com fins medicinais	10
2.4. Terpenos	12
2.4.1. $\alpha$ -humuleno	13
2.4.2. Artigo 1 – Atividades farmacológicas e toxicológicas do $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros: uma revisão sistemática	14
<b>3. Procedimento experimental e Resultados</b>	54
3.1. Artigo 2 - DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO $\alpha$ -HUMULENO EM CAMUNDONGOS	54
<b>4. Considerações finais</b>	87
<b>Referências</b>	88
<b>Anexos</b>	
<b>Apêndices</b>	



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**5-HT**- 5-Hidroxitriptamina /Serotonina  
**ADT**- Antidepressivos Tricíclicos  
**AIR**- Acinesia Induzida por Reserpina  
**ANOVA**- Análise de variância  
**APA**- *American Psychiatric Association*  
**BUP**- Bupropiona  
**CA**- Campo Aberto  
**CEUA**- Comissão de Experimentação e Uso de Animais  
**CIUCA**- Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais  
**CL**- Controle  
**CNS**- Conselho Nacional de Saúde  
**COBEA**- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
**CONCEA**- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
**COX-2**- Enzima Ciclooxygenase 2  
**DA**- Dopamina  
**DL<sub>50</sub>**- Dose letal media  
**DTNB**- Ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico  
**DZP**- Diazepam  
**ELISA**- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
**EO**- Estresse oxidativo  
**ERN**- Espécies Reativas de Nitrogênio  
**ERO**- Espécies Reativas de Oxigênio  
**FLU**- Fluoxetina  
**GABA**- Ácido gama aminobutírico  
**HC**- Hipocampo  
**i.p.**- via intraperitoneal  
**IL-1 $\beta$** - Interleucina 1 $\beta$   
**IMAOs**- Inibidores da monoaminoxidase  
**IMIP**- Imipramina  
**ISRSs**- Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina  
**IUPAC**- *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
**LCE**- Labirinto em Cruz Elevada  
**LPI**- Latência para imobilidade  
**MAO**- Monoamina oxidase  
**MDA**- Malondialdeído  
**NC**- Número de cruzamentos  
**NE**- Noradrenalina  
**NEBA**- Número de entradas nos braços abertos  
**NEBF**- Número de entradas nos braços fechados  
**NF- $\kappa$ B**- Fator Nuclear de transcrição Kappa B  
**NG**- Número de *grooming*  
**NICE**- *National Institute for Health and Care Excellence*  
**NIH**- *National Institute of Health*  
**NO**- Óxido Nítrico  
**NQ**- Número de Quedas  
**NR**- Número de *rearing*

**OECD-** *Organization for Economic Cooperation and Development*  
**OEEB-** Óleo Essencial de Erva Baleeira  
**OMS-** Organização Mundial de Saúde  
**PGE2-** Prostaglandinas E2  
**PICO-** P – população, I – intervenção, C – Controle, O – desfecho  
**PRISMA-** *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*  
**PTZ-** Pentilenetetrazol  
**RES-** Reserpina  
**RR-** *Rota Rod*  
**RS-** Revisão Sistemática  
**SL-** Salina  
**SNC-** Sistema Nervoso Central  
**TBARS-** Ácido tiobarbitúrico  
**TI-** Tempo de imobilidade  
**TM-** Transtornos Mentais  
**TNF $\alpha$ -** Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
**TNF-** Teste do Nado Forçado  
**TP-** Tempo de Permanência  
**TPBA-** Tempo de permanência nos braços abertos  
**TPBF-** Tempo de permanência nos braços fechados  
**URCA-** Universidade Regional do Cariri  
**v.o.-** via oral  
**VMAT-2-** Transportador vesicular de monoaminas

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Hipótese monoaminérgica da depressão.	7
<b>Figura 2.</b>	Representação estrutural do $\alpha$ -humuleno.	14

### Figuras – Artigo 1

<b>Figura 1.</b>	Parâmetros de pesquisa e resultados de seleção	18
<b>Figura 2.</b>	Gráfico expressando o percentual de artigos por categoria	19
<b>Figura 3.</b>	Gráfico expressando o percentual de artigos por ensaio utilizado nos estudos pré-clínicos ( <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e <i>ambos</i> ).	19
<b>Figura 4.</b>	Gráfico expressando a quantidade de artigos por ano de publicação.	20

### Figuras – Artigo 2

<b>Figura 1 (A-D).</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre os parâmetros comportamentais dos camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.	64
<b>Figura 2.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NC no teste do Campo Aberto.	67
<b>Figura 3.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NR no teste do Campo Aberto.	67
<b>Figura 4.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NG no teste do Campo Aberto.	68
<b>Figura 5 (A-B).</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre no teste do <i>Rota rod</i> .	70
<b>Figura 6.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno em camundongos submetidos ao teste do nado forçado – Latência para Imobilidade.	74
<b>Figura 7.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno em camundongos submetidos ao teste do nado forçado – Tempo de Imobilidade.	74
<b>Figura 8.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno em camundongos submetidos ao teste de AIR.	78
<b>Figura 9.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o TI no teste de Potencialização com Imipramina.	80
<b>Figura 10.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o TI no teste de Potencialização com Bupropiona.	82
<b>Figura 11</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o TI no teste de Potencialização com Fluoxetina.	83
<b>Figura 12.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o marcador TBARS de estresse oxidativo decorrente do TNF.	85
<b>Figura 13.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o marcador nitrito de estresse oxidativo decorrente do TNF.	86

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### Tabelas – Artigo 1

<b>Tabela 1.</b>	Bases utilizadas para busca dos artigos e associações de palavras-chave utilizadas para busca.	16-17
<b>Tabela 2.</b>	Descrição dos estudos realizados com $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a atividade antitumoral	28
<b>Tabela 3.</b>	Descrição dos estudos realizados com $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a atividade anti-inflamatória	35
<b>Tabela 4.</b>	Descrição dos estudos realizados com $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a atividade antimicrobiana	38
<b>Tabela 5.</b>	Descrição dos estudos realizados com $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a investigação de outras atividades farmacológicas	42
<b>Tabela 6.</b>	Descrição do estudo realizado com $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a investigação do potencial tóxico	44

### Tabelas – Artigo 2

<b>Tabela 1.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NEBA e NEBF no teste do LCE	65
<b>Tabela 2.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TPBA e TPBF no teste do LCE	65
<b>Tabela 3.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NC, NR e NG no teste do Campo Aberto	69
<b>Tabela 4.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o NQ no teste do <i>Rota rod</i>	71
<b>Tabela 5.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TPBG no teste do <i>Rota rod</i>	71
<b>Tabela 6.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre a LPI e TI no TNF	75
<b>Tabela 7.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NC no teste de AIR	78-79
<b>Tabela 8.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TI no teste de Potencialização com Imipramina	81
<b>Tabela 9.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TI no teste de Potencialização com Bupropiona	82
<b>Tabela 10.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TI no teste de Potencialização com Fluoxetina	84
<b>Tabela 11.</b>	Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre as concentrações de TBARS e Nitrito	86

## RESUMO

LACERDA-LEITE, Giovana Mendes. **DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO  $\alpha$ -HUMULENO EM CAMUNDONGOS**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Departamento de Química Biológica. Universidade Regional do Cariri, 158 p., 2020.

A depressão ocorre, geralmente, por uma falta de capacidade do indivíduo de se adaptar a situações de extremo estresse e apesar de responder bem a terapêutica medicamentosa, existem algumas desvantagens quanto ao uso dos antidepressivos. Os sesquiterpenos se caracterizam como promissores para utilização contra distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC). Nesta perspectiva, considerando a carência de pesquisas que busquem identificar as propriedades do  $\alpha$ -humuleno sobre distúrbios que acometem o SNC, mas especificamente a depressão, objetivou-se determinar o efeito antidepressivo-símile do  $\alpha$ -humuleno em camundongos. A fim de alcançar os objetivos deste trabalho, foram realizados protocolos experimentais que investigaram o perfil comportamental da substância: DL<sub>50</sub>, Labirinto em Cruz Elevada, Campo Aberto e o *Rota rod*; assim como, também, experimentos a fim de determinar a atividade antidepressiva-símile e seus potenciais mecanismos de ação: Teste do Nado Forçado, Acinesia induzida por Reserpina, Potencializações e determinação das concentrações de TBARS e Nitrito. O  $\alpha$ -humuleno não demonstrou sinais de toxicidade, quando estimada a DL<sub>50</sub>. Os dados obtidos no teste do labirinto em cruz elevada demonstraram que a substância teste (125, 250 e 500 mg/kg) não apresenta atividade do tipo ansiolítica. Referente ao campo aberto, o  $\alpha$ -humuleno nas doses de 125 e 250 mg/kg não alterou os parâmetros investigados, sugerindo que a substância não age como excitatória ou sedativa nestas doses; no entanto, quando avaliada a dose de 500 mg/kg foi possível observar resultados estatisticamente significativos que indicam sedação. De acordo com o protocolo do *rota rod*, a substância teste (125 e 250 mg/kg) é isento de efeito miorrelaxante. No teste do nado forçado o  $\alpha$ -humuleno (125, 250 e 500 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade em 67,99%, 65,72% e 60,48%, respectivamente; e aumentou significativamente a latência para imobilidade em 264,86%, 317,91% e 229,05%, respectivamente; em relação à salina. Relativo aos potenciais mecanismos de ação da atividade antidepressiva-símile, não foram obtidos resultados estatisticamente significativos que indiquem por qual via a substância possa estar agindo. No entanto, o  $\alpha$ -humuleno revelou-se interessante agente de redução do estresse oxidativo. Em síntese, o  $\alpha$ -humuleno caracteriza-se como agente com potencial atividade do tipo antidepressiva-símile, com uma vantagem de não alterar as funções motoras e exploratórias dos animais em suas menores doses, no entanto ainda existe a necessidade de desenvolvimento de mais estudos que possam elucidar de maneira mais clara os mecanismos pelos quais este composto possa estar agindo.

**Descritores:** Transtornos Mentais; Depressão; Sesquiterpenos;  $\alpha$ -humuleno; Atividade antidepressiva-símile; Teste do Nado Forçado.

## ABSTRACT

LACERDA-LEITE, Giovana Mendes. **DETERMINATION OF ANTIDEPRESSIVE-SIMILE EFFECT OF  $\alpha$ -HUMULENE IN MICE**. Dissertation (Graduate Program in Molecular Bioprospecting) - Center for Biological and Health Sciences. Department of Biological Chemistry. Cariri Regional University, 158 p., 2020.

Depression generally occurs due to the individual's lack of ability to adapt to situations of extreme stress and despite responding well to drug therapy, there are some disadvantages regarding the use of antidepressants. Sesquiterpenes are promising for use against disorders of the Central Nervous System (CNS). In this perspective, considering the lack of research that seeks to identify the properties of  $\alpha$ -humulene on CNS disorders, but specifically depression, the objective was to determine the antidepressant-simile effect of  $\alpha$ -humulene in mice. In order to achieve the objectives of this work, experimental protocols were carried out that investigated the behavioral profile of the substance: LD<sub>50</sub>, Labirinto in Cruz Elevada, Campo Aberto and the *Rota rod*; as well as, experiments in order to determine the antidepressant-like activity and its potential mechanisms of action: Forced Swimming Test, Reserpine-induced akinesia, Potentiation and determination of TBARS and Nitrite concentrations.  $\alpha$ -humulene showed no signs of toxicity when the LD<sub>50</sub> was estimated. The data obtained in the elevated plus-maze test showed that the test substance (125, 250 and 500 mg / kg) does not have anxiolytic activity. Regarding the open field,  $\alpha$ -humulene at doses of 125 and 250 mg / kg did not alter the investigated parameters, suggesting that the substance does not act as an excitatory or sedative at these doses; however, when the dose of 500 mg / kg was evaluated, it was possible to observe statistically significant results that indicate sedation. According to the *Rota Rod* protocol, the test substance (125 and 250 mg / kg) is free of a myorelaxant effect. In the forced swim test,  $\alpha$ -humulene (125, 250 and 500 mg / kg) reduced the immobility time by 67.99%, 65.72% and 60.48%, respectively; and significantly increased latency for immobility by 264.86%, 317.91% and 229.05%, respectively; in relation to saline. Regarding the potential mechanisms of action of antidepressant-like activity, no statistically significant results were obtained that indicate which way the substance may be acting. However,  $\alpha$ -humulene proved to be an interesting oxidative stress reducing agent. In summary,  $\alpha$ -humulene is characterized as an agent with potential antidepressant-like activity, with the advantage of not altering the motor and exploratory functions of animals at its lowest doses, however there is still a need for further studies. that can more clearly elucidate the mechanisms by which this compound may be acting.

**Keywords:** Mental Disorders; Depression; Sesquiterpenes;  $\alpha$ -humulene; Antidepressive-Simile Effect; Forced Swim Test.

## 1. INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais (TM) caracterizam-se como mudanças psicológicas capazes de prejudicar a funcionalidade do indivíduo. Elas configuram-se por alterações no modo de pensar e humor, podendo associar-se a sentimentos de intensa angústia (OMS, 1993; SANTOS & SIQUEIRA, 2010; TOLEDO, 2011). Algumas situações podem estar relacionadas a uma maior probabilidade do acometimento de pessoas com os transtornos mentais, a exemplo destacam-se a hereditariedade, bem como experiências traumáticas e utilização de substâncias que possam interferir no bom funcionamento psicológico, como o uso de álcool e outras drogas (TOLEDO, 2011).

Dentre os TM destacam-se problemas como a depressão, ansiedade, o transtorno afetivo bipolar, esquizofrenia, dentre outras psicoses. Nessa perspectiva, evidenciando o transtorno depressão, a Organização Mundial de Saúde (OMS) diz que, habitualmente, ele ocorre por uma falta de capacidade do indivíduo de se adaptar a situações de extremo estresse (BRASIL, 2018; OMS, 2002). O transtorno de depressão pode ser considerado como um distúrbio afetivo levando o indivíduo a demonstrar variações de humor; interferindo, também, na realização de atividades de vida diária devido a uma relativa diminuição de energia. É apresentado como um distúrbio frequente e que traz grande preocupação. A OMS estima que cerca de “300 milhões de pessoas sejam afetadas por essa condição”; sendo ela elencada como uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo (APA, 2014; 2017; BRASIL, 2014; 2018; NIH, 2018).

Como sintomatologia, a depressão pode ocasionar diversas variações emocionais, apresentando os seguintes sintomas: “tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima, sono e apetite alterados, cansaço e falta de concentração” (BRASIL, 2018). Seu tratamento compreende, a psicoterapia e o medicamentoso. A psicoterapia pode ser utilizada de forma isolada em casos mais leves, assim como em conjunto com a terapia medicamentosa. Considerando a farmacoterapia pode-se dizer que a depressão responde bem as medicações indicadas, com destaque para os antidepressivos como fármacos de escolha para este distúrbio (APA, 2017; NIH, 2018).

É importante destacar que a terapia medicamentosa, com o aparecimento dos antidepressivos por volta da década de 50, mostrou-se eficaz no controle da depressão, pois houve uma significativa evolução dos tratamentos direcionados a este transtorno (MORENO; MORENO; SOARES, 1999). Até a década 80 podia-se destacar duas classes de antidepressivos como importantes para o tratamento da depressão, os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os

inibidores da monoaminoxidase (IMAOs); no entanto eram medicamentos que apresentavam intensos efeitos colaterais decorrentes de seus mecanismos de ação inespecíficos. Desde então, outros fármacos foram desenvolvidos visando diminuir a ocorrência desses efeitos indesejáveis por meio de uma maior seletividade farmacológica (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Outros fatores como o potencial de letalidade em casos de superdosagem, o longo período de latência para início da atividade terapêutica e o início demorado da resposta clínica que é de 2 a 4 semanas, o fato de eles não mostrarem atividade significativa nos casos de depressão leve, levam, na atualidade, os pesquisadores a buscarem novas substâncias que apresentem maior seletividade, diminuindo assim o risco para o desenvolvimento de efeitos indesejáveis e toxicidade, e que também diminuam a latência para ação farmacológica (KATON et al., 1996; KESSEL & SIMPSON, 1995; KIRSCH et al., 2008; KELAFER et al., 2000; PAYKEL et al., 1988; STAHL, 1997).

Nesta perspectiva, a utilização de produtos naturais com fins medicinais apresenta-se a bastante tempo como um recurso válido para muitas sociedades. Existe uma construção história que acompanha a utilização de plantas para o tratamento de doenças, ou seja, através do conhecimento tradicional era despertado interesse em possíveis atividades farmacológicas das plantas, e a partir delas, compostos também eram isolados para uma determinação mais detalhada das atividades terapêuticas envolvidas (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Na literatura é evidenciado o uso de plantas com atividade sobre Sistema Nervoso Central (SNC). Considerando o transtorno depressivo, a espécie *Hypericum perforatum* Linnaeus (Erva de São João) pode ser destacada como um exemplo de produto natural que apresentou potencial atividade antidepressiva-símile de acordo com os trabalhos de Petzsch (2009) e Rodríguez-Landa e Contreras (2003).

Estas plantas possuem metabólitos que tem despertado o interesse de pesquisadores para busca de atividades farmacológicas. Os terpenos destacam-se por serem um dos principais grupos de metabólitos existentes nos óleos essenciais das plantas que além de serem amplamente utilizados na indústria cosmética e alimentícia, são, também, alvos de muitas pesquisas que buscam substâncias para fins curativos na medicina popular (CORREIA et al., 2008; FELIPE & BICAS, 2017; MAIA & ANDRADE, 2009).

Eles caracterizam-se como hidrocarbonetos insaturados que apresentam em sua estrutura química dupla ligação carbono-carbono. Possuem em sua composição blocos de cinco



carbonos chamados de unidades isoprenicas que os classificam de acordo com a quantidade dessas unidades que eles possuem (FELIPE & BICAS, 2017; MC MURRY, 2011). Por exemplo, os sesquiterpenos possuem em sua estrutura 15 carbonos, constituindo 3 unidades isoprenicas; dentro desta classe pode-se citar o bisabolol que está presente na essência de camomila (FELIPE & BICAS, 2017; KRIVORUCHKO & NIELSEN, 2015).

Referente as atividades farmacológicas dos sesquiterpenos sobre o SNC, alguns estudos apontam resultados favoráveis para esta classe; onde os compostos  $\beta$ -cariofileno, nerolidol e o bisabolol apresentaram efeitos do tipo anticonvulsivante, ansiolítico e sedativo, respectivamente (NOGUEIRA NETO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016; ROCHA et al., 2011). O  $\alpha$ -humuleno, sesquiterpeno abordado no presente estudo, é apresentado na literatura com atividades antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena (ALMEIDA et al., 2011), além de antinociceptiva e principalmente anti-inflamatória (ALVES, 2012; CHAVES et al., 2008; OLIVEIRA RN, 2016). Entretanto, não foram encontrados estudos que evidenciem sua atividade sobre o SNC.

Sobre o desenvolvimento da depressão, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de investigar a relação do estresse oxidativo e a depressão. Estes trabalhos sugerem que a depressão pode acontecer devido a vulnerabilidade do SNC aos danos ocasionados pelo estresse oxidativo (LIU et al., 2015; RODRIGUES; PETERSEN; PERRY, 2014). Para tanto, substâncias com potencial antioxidante podem agir de maneira positiva no combate a depressão.

Nesta perspectiva, considerando que alguns sesquiterpenos são metabólitos importantes com potencial para o tratamento de distúrbios que acometem o SNC e observando o relevante potencial deste grupo de compostos para atividade antioxidante, sob a perspectiva da influência do estresse oxidativo no desenvolvimento da depressão; observando, também, a carência de pesquisas que elucidem a atividade do  $\alpha$ -humuleno sobre o SNC; bem como a necessidade do desenvolvimento de novos produtos biológicos que apresentem menos efeitos colaterais quando utilizados para o tratamento dos transtornos mentais, em especial para depressão, devido as desvantagens que os antidepressivos possuem, e observando que quando se trata de depressão leve estes também não apresentam atividade significativa e que esses fatores comprometem a segurança e aceitação do tratamento pelos pacientes; é que objetivou-se com este trabalho investigar o efeito antidepressivo-símile do  $\alpha$ -humuleno em camundongos.

Como objetivos específicos deste trabalho elencamos: •Estimar a dose letal média (DL<sub>50</sub>) pela administração oral aguda do  $\alpha$ -humuleno; •Caracterizar o perfil da ação

farmacológica central pela administração oral aguda do  $\alpha$ -humuleno; •Verificar, por meio dos testes do campo aberto, *rota rod* e teste do labirinto em cruz elevada, os efeitos do  $\alpha$ -humuleno sobre a atividade locomotora, coordenação motora e possível atividade ansiolítica-símile, respectivamente; •Identificar, por meio do teste nado forçado, o possível efeito tipo antidepressivo-símile do  $\alpha$ -humuleno; •Investigar os possíveis mecanismos de ação do tipo antidepressiva-símile do  $\alpha$ -humuleno por meio dos testes de Acinesia induzida por reserpina e potencializações; e •Determinar as concentrações de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Transtornos mentais (TM)

A Classificação Internacional de Transtornos Mentais e de Comportamento define os transtornos mentais (TM) como uma patologia que envolve fenômenos psicológicos que podem prejudicar a funcionalidade de um indivíduo, podendo eles ser decorrentes de fatores biológicos, sociais, psicológicos, genéticos, físicos ou químicos. Eles são, ainda, considerados como alterações que podem interferir de maneira global na vida do indivíduo, ou seja, caracterizam-se por mudanças no modo de pensar e humor, com expressiva associação a sentimentos de profunda angústia, remetendo ainda a um mal funcionamento da função psíquica e tendo a capacidade de interferir nos relacionamentos, pensamentos, sentimentos, percepções e sensações (OMS, 1993; SANTOS & SIQUEIRA, 2010; TOLEDO, 2011).

Outros fatores que também podem estar associados a uma vulnerabilidade para ocorrência de TM englobam: a hereditariedade, experiências traumáticas e a utilização de substâncias que possam interferir no bom funcionamento psicológico, como, por exemplo, o uso de álcool e outras drogas (TOLEDO, 2011).

Estatisticamente; a OMS traz que cerca de 450 milhões de pessoas sofrem com transtornos mentais e que 25% da população mundial, bem como um em cada quatro indivíduos no mundo, sofrerá de algum transtorno mental em algum momento da vida (OMS, 2002; 2010; ROCHA et al., 2010); o *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) mostra que cerca de 15% da população poderá apresentar estes problemas em qualquer fase do desenvolvimento humano (NICE, 2011); e dados nacionais relatam uma prevalência de aproximadamente 30% do acometimento de brasileiros com TM em um período de um ano (LOPES, FOERSTEIN, CHOR, 2003; TUONO et al., 2007).

A *American Psychiatric Association* (APA) mostra que cerca de 50% dos casos de doença mental iniciam-se na faixa etária de 14 anos. Sendo importante ressaltar que na maioria dos casos os TM aparecem de forma gradativa, e não de maneira inesperada (APA, 2017). Neste sentido, eles são considerados distúrbios universais, pois não escolhem nacionalidade, idade, sexo ou condição social para acometer pessoas (OMS, 1993; SANTOS & SIQUEIRA, 2010).

Dentre os transtornos mentais podemos destacar a “depressão, a ansiedade, o transtorno afetivo bipolar, a esquizofrenia e outras psicoses, demência, deficiência intelectual e transtornos de desenvolvimento”. Quanto ao transtorno depressão, especificamente, a OMS traz que,

geralmente, ele acontece por uma não capacidade do indivíduo de se adaptar a situações de extremo estresse (BRASIL, 2018; OMS, 2002).

## **2.2. Depressão**

Pode-se caracterizar como depressão o transtorno mental que afeta de forma negativa o modo como a pessoa se sente, pensa ou age; ele é ainda considerado um distúrbio afetivo onde o indivíduo apresenta variações de humor, bem como alterações na realização de atividades de vida diária devido a uma relativa diminuição de energia. É um distúrbio bastante comum e preocupante, sendo elencando como uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, afetando de maneira significativa a capacidade funcional do indivíduo (APA, 2014, 2017; BRASIL, 2014; 2018; NIH, 2018).

Segundo a OMS estima-se que “globalmente, 300 milhões de pessoas sejam afetadas por essa condição”; sendo ela uma situação que acomete mais comumente o sexo feminino (BRASIL, 2014; 2018; SCHMIDT; DANTAS; MARZIALE, 2011). Um dado relevante é que, segunda a APA, “uma em cada seis pessoas” apresentaram quadro de depressão em algum momento da vida (APA, 2017; NIH, 2018). Ela pode ocasionar diversas variações emocionais com apresentação dos seguintes sintomas: “tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa ou baixa autoestima, sono e apetite alterados, cansaço e falta de concentração” (BRASIL, 2018).

Brasil (2018) traz que, “a depressão pode ser de longa duração ou recorrente, prejudicando substancialmente a capacidade das pessoas de serem funcionais no trabalho ou na escola, assim como a capacidade de lidar com a vida diária. Em seu estado mais grave, a depressão pode levar ao suicídio”. Quanto ao tratamento, é um distúrbio que responde bem a terapia medicamentosa, sendo os antidepressivos os fármacos de escolha para este distúrbio. Pode ser também utilizado a psicoterapia isoladamente, nos casos mais leves, ou em conjunto com a terapia medicamentosa (APA, 2017; NIH, 2018).

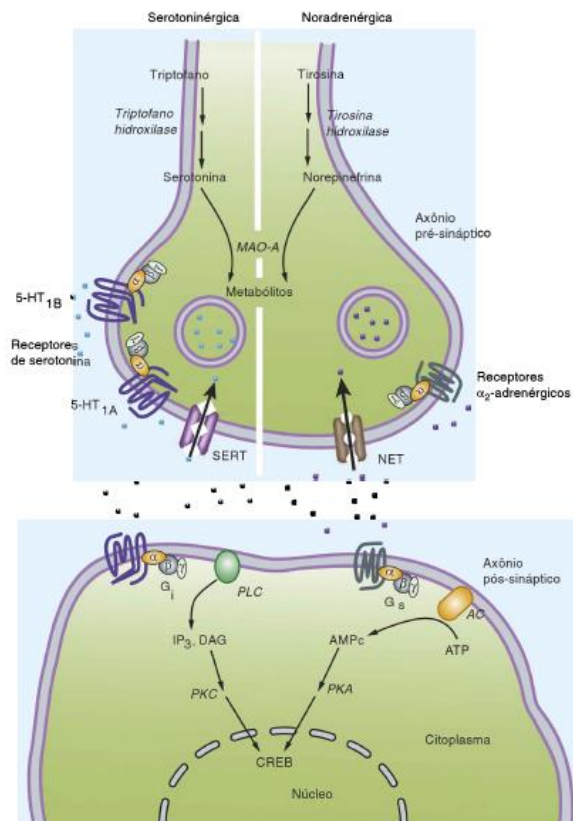
### *2.2.1. Causas Biológicas da Depressão*

Algumas teorias sustentam as principais causas da depressão, assim como, abrem caminhos para descoberta de novos compostos capazes de agir no tratamento destes distúrbios. Uma das mais antigas diz respeito aos neurotransmissores cerebrais, ou “hipótese monoaminérgica” (VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008); no entanto, alguns estudos

têm demonstrando um possível envolvimento do estresse oxidativo (EO) na origem da depressão (LIU et al., 2015; RODRIGUES; PETERSEN; PERRY, 2014).

### 2.2.1.1. Neurotransmissores cerebrais (hipótese monoaminérgica)

Durante décadas as explicações sobre as causas biológicas da depressão rodeavam a conhecida hipótese monoaminérgica, que diz que o transtorno depressivo é ocasionado devido a depleção sináptica de alguns neurotransmissores cerebrais, mais especificamente a 5-Hidroxitriptamina (5-HT/Serotonina), noradrenalina e a dopamina. A comprovação desta teoria veio com a descoberta dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase, uma vez que, a atividade destes medicamentos aumentava a biodisponibilidade das mononaminas na fenda sináptica, seja por inibição da recaptação dos neurotransmissores com os ATC, ou pelo bloqueio da enzima responsável por degradar as monoaminas (monoaminoxidase - IMAO) (NISHIDA., et al, 2002; STAHL, 1997; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).



**Figura 1.** Hipótese monoaminérgica da depressão.

Fonte: Katzung; Masters; Trevor, 12ª ed., p. 524, 2014.

Legenda: A Hipótese aminérgica da depressão maior. A depressão parece estar associada a alterações na sinalização da serotonina ou da norepinefrina no cérebro (ou ambas), com efeitos distais significativos. A maioria dos antidepressivos produz alterações na sinalização das aminas. AC, adeniliciclase; 5-HT, serotonina; CREB, (proteína) de ligação dos elementos de resposta do AMPc; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, trifosfato de inositol; MAO,

monoaminoxidase; NET, transportador de norepinefrina; PKC, proteinocinase C; PLC, fosfolipase C; SERT, transportador de serotonina.

Estes neurotransmissores possuem funcionalidades de extrema importância para o organismo, em especial para o SNC e, portanto, interferências sobre seus níveis influenciam diretamente nas alterações comportamentais. A serotonina é uma indolamina que resulta do processo de “hidroxilação e carboxilação do aminoácido L-triptofano”. Ela age de maneira excitatória ou inibitória do sistema GABA, controlando diversas funções cerebrais como: humor, atividade sexual, atividade motora, temperatura corporal, funções neuroendócrinas, sono, apetite, ritmo circadiano e funções cognitivas (SILVA & ANDRADE, 2008)

Este neurotransmissor age tanto a nível de receptores pré-sinápticos, quanto pós-sinápticos. Sua estimulação pós-sináptica pode estar relacionada ao aparecimento de efeitos colaterais de fármacos que agem aumentando sua biodisponibilidade na fenda sináptica, como alterações gastrointestinais. Os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs) são fármacos importantes para o controle de TM que envolvam a deficiência da serotonina, uma vez que não interferem em outros neurotransmissores. Seu potencial contra depressão está relacionado a inibição da recaptação de serotonina pelos neurônios pré-sinápticos, aumentando, portanto a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica (GOODMAN & GILMAN, 2012; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; SILVA & ANDRADE, 2008).

A dopamina e a noradrenalina são catecolaminas, aminas importantes para a transmissão adrenérgica. Elas compartilham da mesma via de biossíntese, sendo sintetizadas a partir do aminoácido tirosina. Inicialmente se origina a L-dopa por ação da enzima tirosina hidroxilase sobre a tirosina, por sua vez, a dopa passa por um processo de descarboxilação por influência de L-aminoácidos aromáticos descarboxilase para originar a dopamina, que segue seu processo de transformação dando origem a noradrenalina através da ação da dopamina  $\beta$ -hidroxilase (ESTEVINHO & FORTUNATO, 2003; GOODMAN & GILMAN, 2012).

A dopamina age de maneira importante sobre a atividade motora controlando-a, bem como sobre as funções endócrinas, mecanismos de compensação e cognição, além da regulação do humor. No cérebro ela está presente em 4 (quatro) regiões: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e túbero-infundibular. A região nigroestriatal compreende 80% da produção deste neurotransmissor, majoritariamente pela substância nigra. Posteriormente ele é encaminhado para o corpo estriado. Algumas doenças decorrem da diminuição dos níveis de dopamina, como

por exemplo a Doença de Parkinson e a Depressão, dentre outras (BARRETO et al., 2015; STANDAERT & GALANTER, 2009).

Quanto a noradrenalina, foi observado que fármacos capazes de interferir na síntese desta, de maneira inibitória, estimulavam uma retomada rápida de sintomas depressores. Bem como o tratamento com antidepressivos noradrenérgicos apresentavam uma resposta positiva no controle da depressão. Um exemplo de um antidepressivo que age a nível de noradrenalina, aumentando sua disponibilidade e melhorando os sintomas depressivos são os Inibidores seletivos da recaptação de serotonina-noradrenalina que se ligam ao transportador de noradrenalina impedindo sua ligação com o neurotransmissor e consequentemente aumentando os níveis deste na fenda sináptica (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

#### 2.2.1.2. *Participação do estresse oxidativo no desenvolvimento da Depressão*

Estudos buscando desvendar sobre os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento do transtorno depressivo vem ganhando destaque, todavia ainda não foram completamente esclarecidos. Uma das hipóteses para o desenvolvimento deste transtorno diz respeito a uma possível relação do estresse oxidativo (EO) com o aparecimento da depressão devido a potencial vulnerabilidade do SNC aos danos ocasionados pelo EO (LIU et al., 2015; RODRIGUES; PETERSEN; PERRY, 2014).

Este processo de estresse acontece devido um aumento da produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). De maneira fisiológica, no organismo, esses radicais são controlados por enzimas antioxidantes. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio nos mecanismos de defesa, os danos ocasionados pelos radicais livres se acumulam com o passar do tempo originando o EO, que podem predispor o organismo ao desenvolvimento da depressão (MELO, 2012; RODRIGUES; PETERSEN; PERRY, 2014).

Um aumento nos níveis de radicais livres, como o óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA), tem sido demonstrando em alguns estudos, tanto com seres humanos, em pacientes que apresentavam características deprimidas, como com animais em experimentos que desenvolviam um quadro mimético de depressão (CHENG et al., 2018; CHUNG et al., 2013; MAES et al., 2018).

Além disso, um estudo que trabalhou com pacientes que foram submetidos ao tratamento com antidepressivos, demonstrou redução dos níveis dos radicais livres MDA e NO (BALMUS et al., 2016). Estas descobertas criaram direcionamento para uma relação entre o

EO e a depressão, possibilitando o desenvolvimento de pesquisas que busquem investigar o potencial de agentes antioxidantes para o tratamento da depressão.

Para tanto, um isômero do  $\alpha$ -humuleno, o  $\beta$ -cariofileno, apresentou resultados significantes de atividade antioxidante agindo através da eliminação de radicais livres, possivelmente contra radicais hidroxila, ânions superóxido e peróxidos lipídicos (CALLEJA et al., 2013), além de diminuir o estresse oxidativo em áreas cerebrais envolvidas no desenvolvimento da depressão – hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado- por agir reduzindo os níveis de MDA e nitrito-nitrato (CARDOSO, 2018). Nesta perspectiva, mostra-se de extrema relevância investigar o  $\alpha$ -humuleno para tais fins.

### **2.3. Terapia farmacológica e a utilização de plantas com fins medicinais**

Os antidepressivos, principais medicamentos utilizados no tratamento do distúrbio de depressão, tiveram seu surgimento por volta da década de 50, onde se mostraram significantes para o controle da depressão. Até a década de 80 duas classes desses medicamentos eram destacadas como importantes para o tratamento: os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAOs). Entretanto os efeitos colaterais decorrentes de sua não seletividade farmacológica eram preocupantes, pois uma super-dosagem poderia ocasionar até mesmo a morte do indivíduo. Neste sentido, intensificou-se a busca pelo desenvolvimento de outros fármacos que fossem farmacologicamente mais seletivos, visando diminuir a ocorrência, principalmente, dos efeitos colaterais, ofertando maior segurança aos que necessitariam deste tratamento (KESSEL; SIMPSON, 1995; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; STAHL 1997).

Antigamente os antidepressivos eram classificados segundo sua estrutura cíclica (tipicamente anéis benzênicos), no entanto, na atualidade, devido os novos medicamentos não compartilharem semelhanças estruturais, eles são classificados de acordo com sua atividade farmacológica (NASH & NUTT, 2007).

Os medicamentos disponíveis para seu tratamento concentram-se nos que medeiam suas ações através da liberação de monoaminas, devido a hipótese monoaminérgica. Desta forma, a ação farmacológica dos antidepressivos consiste, preferencialmente, em ampliar a concentração dos neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica, e essa atividade pode acontecer pelos mecanismos de inibição do metabolismo, bloqueio da recaptura neuronal ou atuação em



autor-receptores pré-sinápticos (BEZCHLIBNYK-BUTLER & JEFFRIES, 1999; NASH & NUTT, 2007).

Nesta perspectiva, quatro categorias de antidepressivos são destacadas: os de primeira geração (Inibidores Não-Seletivos da Recaptação de Monoaminas ou ADT e os IMAOs); os de segunda geração (Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina) e os antidepressivos atípicos que são os mais recentes (inibidor seletivo da recaptação de serotonina e antagonista  $\alpha_2$ , inibidor da recaptação de catecolaminas e os inibidor seletivos da recaptação de noradrenalina) (ACCATTINI & PAPINE, 2007; BEZCHLIBNYK-BUTLER & JEFFRIES, 1999).

No entanto, alguns fatores levaram os pesquisadores a estarem em constante busca por substâncias alternativas que conseguissem diminuir as desvantagens que alguns antidepressivos possuem, como: o potencial para desenvolver efeitos colaterais, o potencial de letalidade em casos de superdosagem, o longo período de latência para início da atividade terapêutica, bem como o início demorado da resposta clínica que é de 2 a 4 semanas, além deles não mostrarem atividade significativa nos casos de depressão leve (KATON et al., 1996; KESSEL & SIMPSON, 1995; KIRSCH et al., 2008; KELAFER et al., 2000; PAYKEL et al., 1988; STAHL, 1997).

Para tanto, a farmacologia comportamental é uma área, consideravelmente nova, que envolve estudos que buscam explicações para processo comportamentais que são substancialmente alterados devido administração de substâncias. Esta área surgiu por volta da década de 50 no intuito de pesquisar substâncias eficazes em tratar específicos problemas psiquiátricos. Dentre as vertentes de investigação, na farmacologia comportamental, podemos citar: os transtornos psiquiátricos como a depressão e ansiedade; as doenças neurológicas Parkinson e Alzheimer; bem como para o controle da dor; e no caso do abuso de drogas, o controle da dependência (LAPA et al., 2008).

Nesta perspectiva, alguns trabalhos demonstraram atividades farmacológicas sobre o SNC de algumas plantas quando realizados protocolos experimentais com animais para doenças psiquiátricas. No que diz respeito aos distúrbios depressivos as espécies do gênero *Hypericum* (Hypericaceae) foram relatadas com atividade antidepressiva, especificamente a *H. perforatum* Linnaeus (Erva de São João) (BAHLS, 2001; PETZSCH, 2009; RODRÍGUEZ-LANDA; CONTRERAS, 2003). Ela é considerada um fitoterápico comumente utilizado no tratamento de casos de depressão leve a moderada (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005;

ANDREATINI, 2000). Outras plantas como, a *H. grandifolium* Choisy (SÁNCHEZ-MATEO; BONKANKA; RABANAL, 2009) *Bellis perennis* Linnaeus (MARQUES; MELO; FREITAS, 2012), *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore (SILVA, 2006), *Cecropia glaziovii* Sneath (ROCHA et al., 2007), e *Passiflora alata* Curtis (ROMANINI et al., 2008) também foram destacadas com perfil farmacológico para tratamento da depressão.

Neste sentido, a utilização de produtos naturais com fins medicinais apresenta-se a bastante tempo como um recurso válido para muitas sociedades, existindo uma construção história que acompanha a utilização dessas plantas para o tratamento de doenças; ou seja, através do conhecimento tradicional era despertado interesse em possíveis atividades farmacológicas das plantas, e a partir delas compostos também eram isolados para uma determinação mais detalhada das atividades terapêuticas envolvidas (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

#### **2.4. Terpenos**

Sobre metabólitos isolados de produtos naturais e que podem possuir atividade farmacológica, os terpenos são caracterizados como um dos principais compostos existente nos óleos essenciais de diversas plantas. Estes óleos além de serem amplamente utilizados na indústria cosmética e alimentícia, popularmente também são bastante empregados para fins curativos na medicina popular (CORREIA et al., 2008; FELIPE & BICAS, 2017; MAIA; ANDRADE, 2009).

Essa classe de compostos é, também, originada a fim de favorecer um mecanismo de defesa para as plantas a agentes externos. Além disso, podem ser produzidos por animais e micro-organismos, como bactérias e fungos; sendo eles produtos altamente voláteis (DVORA & KOFFAS, 2013; FELIPE & BICAS, 2017; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

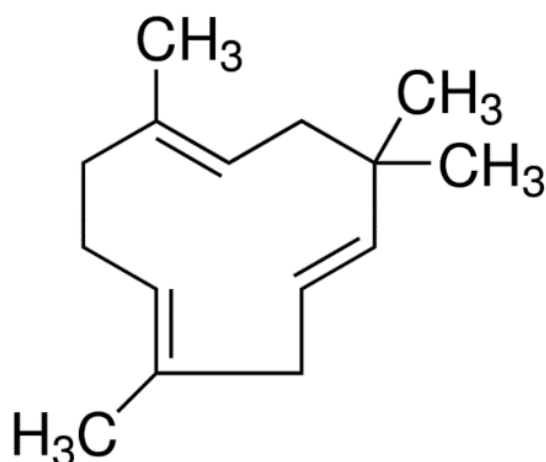
Felipe e Bicas (2017) dizem que, segundo Mc Murry (2011), “quimicamente, os terpenos podem ser definidos como alcenos naturais, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado” (p 120). Vale ressaltar que se o terpeno possui um oxigênio este passa a ser designado de terpenoide; entretanto independente das diferenças estruturais existentes entre eles, similarmente eles possuem em sua composição blocos de cinco carbonos chamados de unidades isoprenicas (FELIPE & BICAS, 2017).

Neste sentido, os terpenos são classificados conforme a quantidade de unidade isoprenicas que eles possuem. Os sesquiterpenos, um tipo de terpenoide, possuem em sua estrutura 15 carbonos, constituindo 3 unidades isoprenicas; a exemplo pode-se citar o bisabolol que está presente na essência de camomila (FELIPE & BICAS, 2017; KRIVORUCHKO & NIELSEN, 2015).

No que diz respeito as atividades farmacológicas dos sesquiterpenos sobre o SNC, alguns estudos apontam resultados favoráveis para esta classe, por exemplo: o  $\beta$ -cariofileno exibe atividade anticonvulsivante contra convulsões induzidas por Pentilenetetrazol (PTZ) em camundongos, sendo que neste mesmo trabalho o autor traz que ele ainda possui um efeito neuroprotetor (OLIVEIRA et al., 2016); já o nerolidol apresentou propriedades ansiolíticas (NOGUEIRA NETO et al., 2012); e um estudo sugeriu que bisabolol podia mediar seus mecanismos ansiolíticos e sedativos por meio do envolvimento dos receptores de GABA (ácido gama aminobutírico) (ROCHA et al., 2011).

#### 2.4.1. $\alpha$ -humuleno

O  $\alpha$ -humuleno é o principal composto encontrado no óleo essencial de erva baleeira - OEEB (*Cordia verbenacea*), sendo ele classificado como principal responsável pela atividade anti-inflamatória do OEEB. Ele caracteriza-se como um terpenoide da classe dos sesquiterpenos, por possuir três unidades de isopreno, com fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$  (Figura 2). De acordo com a nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é descrito como (1 E , 4 E , 8 E ) -2,6,6,9-tetrametilcicloundeca-1,4,8-trieno, mas, também, pode ser encontrado com os seguintes nomes (sinônimos), dentre outros: Humuleno e alfa-cariofileno (AZAMBUJA 2018; CHAVES et al., 2008; HMDB, 2020; NCBI, 2020).



Fonte: Sigma-Aldrich, 2020.

**Figura 2.** Representação estrutural do  $\alpha$ -humuleno.

Sua ação como anti-inflamatório se dá pelo bloqueio da enzima ciclo-oxigenase 2, levando assim a uma diminuição da produção de algumas prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Vale ressaltar que não houve efeitos colaterais destacados para este produto, e que a partir desse óleo foi desenvolvido o primeiro anti-inflamatório tópico que provinha de uma planta brasileira (AZAMBUJA 2018).

Na literatura ele é ainda apresentado com atividades do tipo antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena (ALMEIDA et al., 2011), além de antinociceptiva e anti-inflamatória (ALVES, 2012; CHAVES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2007; OLIVEIRA 2016). Entretanto, não foram encontrados estudos que evidenciem sua atividade sobre o SNC, especificamente sobre a depressão.

## 2.5. Artigo 1 – Revisão sistemática

**Artigo submetido a revista Current Pharmaceutical Design – B1 em Biodiversidade**



## Atividades farmacológicas e toxicológicas do $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros: uma revisão sistemática

**Resumo:** Os terpenos tem sido foco importante para investigação de atividades farmacológicas, atualmente. Neste sentido, considerando a diversidade dos sesquiterpenos, terpenos compostos de 3 unidades isoprênicas, e observando o potencial farmacológico do  $\alpha$ -humuleno; o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática (RS) a fim de identificar as atividades farmacológicas e toxicológicas do  $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros. Esta RS foi realizada de acordo com as diretrizes PRISMA. A pesquisa bibliográfica foi realizada usando as bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science. Os critérios de inclusão utilizados foram: artigos originais de estudos pré-clínicos e clínicos que investigassem as atividades farmacológicas e os efeitos toxicológicos do  $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros, que foram escritos em inglês, português e espanhol. A pesquisa inicial resultou em 5.165 artigos, dos quais 46 foram selecionados para análise final. Após agrupamento em categoriais por atividade apresentada, 41% dos artigos investigados relataram que o  $\alpha$ -humuleno e seus isômeros apresentavam atividade antitumoral, seguida pelas atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (20% para ambas), outras atividades farmacológicas (15%) e Potencial Tóxico (2%). Esta RS é o primeiro trabalho realizado a fim de agrupar os estudos sobre as atividades farmacológicas e toxicológicas deste grupo de compostos. Nesta perspectiva, conclui-se que o  $\alpha$ -humuleno, assim como seus isômeros, possuem diferentes atividades farmacológicas, elencando-os como importantes para formulação de novas terapias; no entanto, relativo a toxicologia destes compostos ainda existe necessidade de desenvolvimento de mais estudos, a fim de garantir a segurança para utilização destes.

### Introdução

Com ampla utilização na indústria cosmética e alimentícia, os terpenos definem-se como um dos principais grupos de metabólitos existentes nos óleos essenciais das plantas. Caracterizados como hidrocarbonetos e formados por unidades isoprenicas, atualmente constituem objetos importantes de estudos que buscam identificar substâncias com fins terapêuticos a partir da medicina tradicional [1-4].

Diversas atividades têm sido atribuídas as plantas que possuem compostos terpênicos, assim como aos próprios compostos quando isolados. Efeitos do tipo sedativo, anticonvulsivante, antinociceptivo e antidepressivo tem sido bastante destacado na literatura [5-8]. Outras atividades incluem: anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena [9-12].

Os terpenos diferenciam-se quanto a sua estrutura e forma. De acordo com a quantidade de unidades isoprenicas, compostas de 5 carbonos cada ( $C_5$ ), os terpenos dividem-se em classes. Uma delas, os sesquiterpenos, são formados por 15 carbonos e 3 unidades isoprenicas [13]. Considerando a diversidade de sesquiterpenos, essa revisão tem como foco o  $\alpha$ -humuleno

(C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>), cuja composição é definida por 3 unidades isoprenicas (C<sub>15</sub>) e moléculas de hidrogênio (H<sub>24</sub>). Trata-se do principal composto encontrado no óleo essencial da *Cordia verbenácea* e possui atividade anti-inflamatória já validada [11, 14-16].

Dessa forma, observando-se o potencial farmacológico do  $\alpha$ -humuleno, o presente estudo teve como objetivo identificar outras possíveis atividades farmacológicas e toxicológicas desse composto e de seus isômeros (substâncias que compartilham fórmulas químicas idênticas [17]).

## Método

### Estratégia de pesquisa escolhida

Essa revisão sistemática (RS) foi desenvolvida de acordo com a estratégia do PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), seguindo o checklist, que contém 27 itens e o diagrama de fluxo de orientação da busca e seleção dos trabalhos. De maneira geral, o PRISMA busca aperfeiçoar as revisões, garantindo uma maior qualidade e confiabilidade. A coleta das informações foi composta por 4 fases: identificação, seleção, elegibilidade e inclusão [18].

A questão norteadora tomada como base foi: quais são as propriedades farmacológicas e toxicológicas do  $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros? A busca dos artigos foi realizada no período de fevereiro a abril de 2020 nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science. Os descritores utilizados, bem como as combinações adotadas estão dispostos no Tabela 1. Foram incluídos artigos originais com texto completo disponível na íntegra, que envolvessem pesquisas pré-clínicas e/ou clínicas, sem período de publicação estimado e que estivessem escritos nos idiomas de português, inglês e espanhol. Trabalhos que consideraram outras atividades biológicas e outras revisões foram excluídos.

**Tabela 1.** Bases utilizadas para busca dos artigos e associações de palavras-chave utilizadas para busca.

Bases de dados	Associações
PubMed, Scopus e Web of Science	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and pharmacological effect”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and pharmacology effect”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and pharmacology”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and toxicology”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and toxicology effect”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and sesquiterpene and pharmacology effect”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and sesquiterpene and pharmacological effect”</i>

<b>Continuação</b>	
<b>PubMed, Scopus e Web of Science</b>	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and sesquiterpene and pharmacology”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and sesquiterpene and toxicology”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and sesquiterpene and toxicology effect”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and medicinal use”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and sesquiterpene and medicinal use”</i>
	<i>“<math>\alpha</math>-Humulene and isomers and pharmacology effect”</i>

### **Seleção dos estudos**

A busca e seleção dos estudos foi desenvolvida por dois pesquisadores independentes (G.M.L.L e M.O.B). Inicialmente foi realizada uma triagem dos artigos, com auxílio de uma ficha de avaliação com critérios de elegibilidade, a partir da leitura dos títulos e resumos diretamente nas bases de dados eletrônicas. Em seguida, os artigos selecionados para leitura com texto completo foram avaliados para confirmação dos critérios de inclusão. Eventuais divergências foram resolvidas por consenso entre os dois pesquisadores. Os trabalhos selecionados foram cuidadosamente revisados para identificação dos estudos que seriam incluídos na amostra final da RS.

### **Extração e análise dos dados**

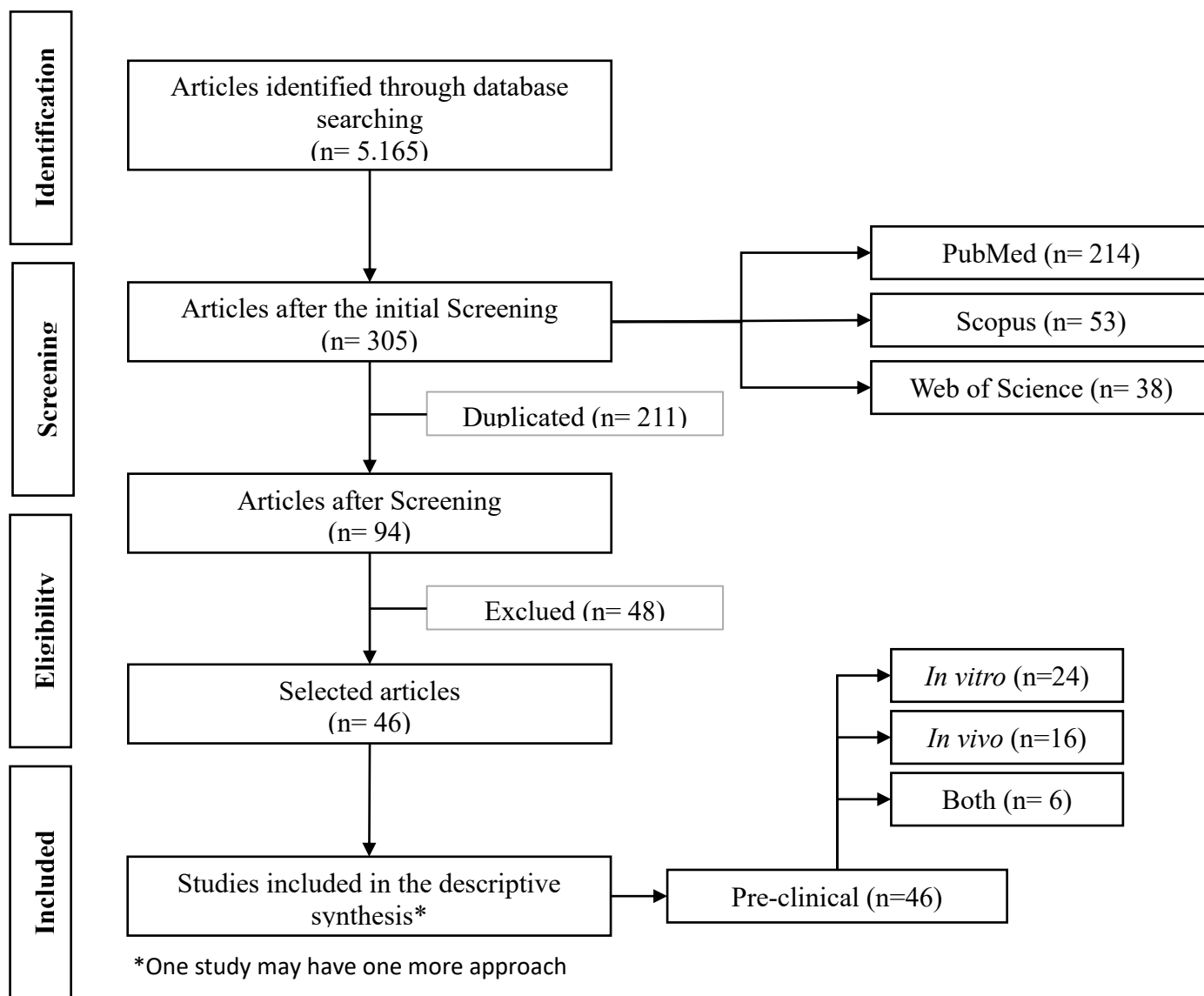
Os dados foram extraídos por um dos pesquisadores (G.M.L.L), objetivando responder à questão norteadora desta RS, e verificados pelo segundo pesquisador (M.O.B). Para a etapa de extração das informações e síntese descritiva dos dados, foi obedecido o formato do acrônimo PICO (P – população, I – intervenção, C – Controle, O – desfecho) <sup>[19]</sup>. Dessa forma, na descrição dos resultados foram consideradas as seguintes informações: composto encontrado, origem, objetivo do estudo, modelo de experimentação, espécie, cepa e/ou linhagem celular, dose/concentração, via de administração, principais resultados e conclusão.

### **Resultados e Discussão**

#### **Aspectos gerais**

A pesquisa inicial, com a utilização dos descritores associados com o auxílio do operador booleano “and”, resultou em 5.165 artigos encontrados, somando-se as três bases de dados utilizadas. Após a triagem inicial, 305 artigos foram selecionados para leitura na íntegra e identificação das atividades, sendo 214 na PubMed, 53 na Scopus e 38 na Web of Science. Vale destacar que, nessa etapa, também foram excluídos os artigos duplicados. Assim, 46

artigos foram incluídos na revisão (figura 1) e as informações destacadas de cada trabalho estão dispostas nas tabelas de 2 a 6.

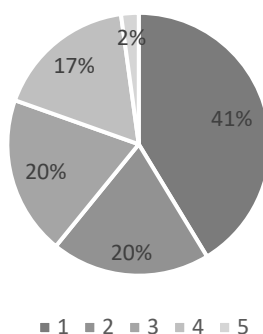


**Figura 1.** Parâmetros de pesquisa e resultados de seleção.

Os trabalhos foram organizados em categorias de acordo com as atividades apresentadas: 1- atividade antitumoral; 2- atividade antimicrobiana; 3- atividade anti-inflamatória; 4- outras atividades farmacológicas e; 5- potencial tóxico. A categoria com maior número de artigos foi a de atividade antitumoral, compreendendo 19 estudos (41%), seguida pelas atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (20%, n=9 para ambas). Outras atividades farmacológicas (15%, n=8) e potencial tóxico (2%, n=1) foram as que tiveram menos resultados (Figura 2).



## Categorização dos estudos

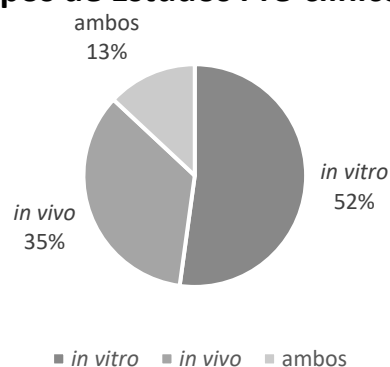


**Figura 2.** Gráfico expressando o percentual de artigos por categoria.

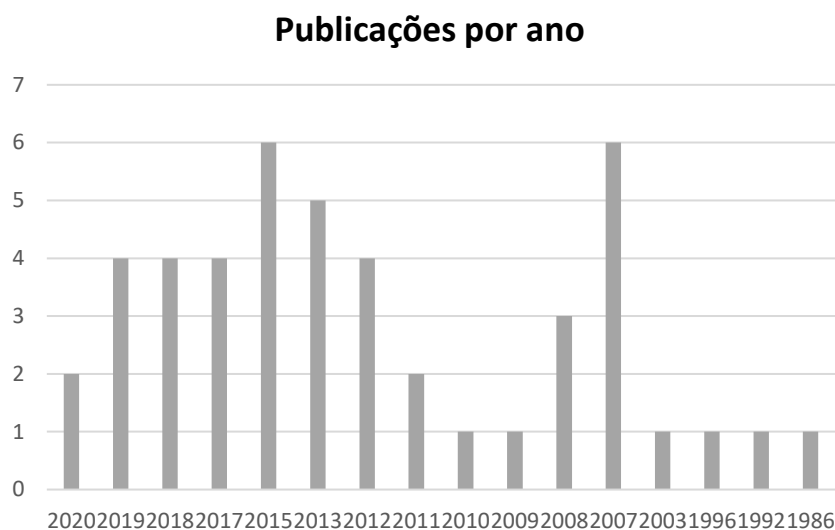
Cada número corresponde a uma categoria: (1) Atividade antitumoral; (2) Atividade antimicrobiana; (3) Atividade Anti-inflamatória; (4) Outras atividades farmacológicas; e (5) Potencial Tóxico.

Referente aos tipos de estudos, somente estudos pré-clínicos foram encontrados, com predominância para os ensaios *in vitro* (52%), seguidos dos ensaios *in vivo* (35%). Algumas pesquisas realizaram abordagem mista (*in vitro* e *in vivo* - 13%) (Figura 3). Já no que diz respeito aos anos de publicação, como mostrado na figura 4, o maior número de pesquisas envolvendo o  $\alpha$ -humuleno e seus isômeros esteve compreendido entre os anos de 2007 e 2015 (n=6 em cada ano). É importante destacar que as pesquisas envolvendo esse grupo de compostos são consideravelmente recentes, visto que a maioria dos estudos (n=32) se concentraram nos últimos 10 anos (2010-2020).

## Tipos de Estudos Pré-clínicos



**Figura 3.** Gráfico expressando o percentual de artigos por ensaio utilizado nos estudos pré-clínicos (*in vitro*, *in vivo* e ambos).



**Figura 4.** Gráfico expressando a quantidade de artigos por ano de publicação. Período compreendido entre 1986 e 2020.

Sobre as vias de administração utilizadas para os ensaios, a maioria (n=27) optou pela *in situ*, seguido pela via oral (n=13), intraperitoneal (n=5), aerossol (n=1), tópica (n=1) e por instilação intra-traqueal (n=1). É importante destacar que alguns estudos fizeram uso de mais de uma via.

## Propriedade Farmacológicas e toxicológicas

### *Atividade antitumoral*

Dos estudos apresentados, a maior parte (41%) se concentrou na avaliação da atividade antitumoral, anticancerígena e citotóxica de células carcinogênicas, do  $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros. Dos 19 artigos desta categoria, 13 trabalharam com o  $\alpha$ -humuleno, enquanto seus isômeros estavam presentes em 18 estudos; ressalta-se que a maioria investigou as atividades de mais de um sesquiterpeno,  $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (Tabela 2).

Sobre o potencial da substância  $\alpha$ -humuleno, foi possível observar que este se caracteriza como um importante composto no combate a células tumorais, uma vez que os estudos voltados para esta atividade têm sido desenvolvidos há bastante tempo. O primeiro indício desse potencial foi descrito no trabalho de Zheng, Kenney e Lam <sup>[20]</sup>, que buscavam investigar características biológicas do  $\alpha$ -humuleno e o isômero  $\beta$ -cariofileno, em um estudo *in vivo*.

Durante a pesquisa, alguns resultados evidenciaram que os dois compostos aumentavam a atividade de uma enzima, a Glutathione S-transferase, no fígado e na mucosa do intestino

delgado de camundongos [20]. Estes achados sugeriam que substâncias capazes de induzir um aumento na atividade dessa enzima, que é caracterizada como desintoxicante, além de ser um agente significante na proteção contra o estresse oxidativo [21-24], poderiam ser inibidores potenciais de carcinogênese.

Nos estudos *in vitro* diversas células tumorais foram utilizadas para investigação da atividade citotóxica e potencial antitumoral: células de carcinoma colorretal, de ovário e linfoblastos; de cólon humano, melanoma, glioblastomas, de útero, mama e cervical, pulmonar, próstata, e células de carcinoma hepatocelular (Tabela 2). A maioria dos estudos buscaram mensurar a capacidade tóxica dos sesquiterpenos contra células de carcinoma de mama [25-30].

Além do  $\alpha$ -humuleno, seus isômeros  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -zingibereno foram, também, bastante investigados para atividade antitumoral frente as células de câncer de mama. Venditti e colaboradores [30] chega a relacionar o potencial citotóxico do (*E*)-cariofileno (sinônimo do  $\beta$ -cariofileno) com sua significante atividade antioxidante. Assim como os outros trabalhos definem que a atividade antitumoral dos compostos, possivelmente seja decorrente de suas capacidades de citotoxicidade e de inibirem o crescimento celular, contra células cancerosas [26, 27].

O estudo de Legault e Pichette [29] que buscou avaliar o efeito potencializador de concentrações não citotóxicas do  $\beta$ -cariofileno na atividade anticâncer do  $\alpha$ -humuleno, isocariofileno e paclitaxel (agente antitumoral clinicamente utilizado no tratamento de câncer) contra células de câncer de mama e cólon, evidenciou que este composto aumentou significativamente o efeito citotóxico dos sesquiterpenos e do agente antitumoral. Quanto aos possíveis mecanismos pelos quais o  $\beta$ -cariofileno estaria agindo, acredita-se que, em parte, pode ser decorrente da alteração da permeabilidade da membrana proporcionada por ele, e no caso do agente antitumoral paclitaxel, por promover acúmulo intracelular dele [29].

Alguns mecanismos associados a atividade antitumoral do  $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros consistiam no acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) mitocondrial [28, 31], assim como na diminuição do potencial de membrana mitocondrial [32]. Quando há um aumento dos níveis de ERO dentro das mitocôndrias, um desequilíbrio pode ser desencadeado no potencial de membrana acarretando a liberação de cálcio para o meio citosólico, o que deflagra cascatas de desequilíbrio celular que decorrem de altos níveis de estresse oxidativo e podem levar a um processo de morte celular [33-35].

Outro mecanismo diz respeito ao potencial de alguns compostos em induzir uma atividade apoptótica por ativação de enzimas caspases 8 e 3, e estimulação do agrupamento de receptores DR4/DR5, receptores de superfície celular que mediam apoptose [36-38]. Os processos apoptóticos compreendem um campo de pesquisa extremamente importante na investigação de novos fármacos que sejam capazes de agir como antitumorais [39, 40]. Esse mecanismo pode envolver duas vias, a extrínseca e/ou a intrínseca, com significativa influência da ativação de caspases, proteínas responsáveis pela sinalização da cascata de morte [41, 42].

Diferentes caspases são ativadas em cada uma das vias [43-45]. Na via extrínseca observa-se um envolvimento da caspase 8, considerada iniciadora, que pode ser desencadeada pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF) e posteriormente deflagrar a ativação de outras caspases, as efetoras, que serão responsáveis pelo processo de morte celular. Já a caspase 3, considerada efetora, é desencadeada na via intrínseca, geralmente pelo acúmulo de ERO ou outros processos que interfiram na membrana mitocondrial, além da própria deflagração pela via extrínseca [46, 47].

Quando investigado o potencial destes sesquiterpenos em potencializar a ação de agentes clinicamente utilizados no tratamento do câncer, estudos recentes apontam que o  $\alpha$ -humuleno agiu de maneira sinérgica sobre o efeito citotóxico da doxorubicina [48], assim como o  $\beta$ -cariofileno [49]. É importante, também, destacar que algumas pesquisas demonstraram que as ações dos compostos eram significativamente seletivas para células tumorais, não apresentando atividade citotóxica em células normais [28, 31, 36, 37], resultado interessante dada a necessidade de descoberta de novos fármacos que apresentem menos toxicidade, pois a grande maioria dos quimioterápicos não são seletivos e acabam agredindo, também, células normais [50, 51].

#### *Atividade Anti-inflamatória*

O potencial anti-inflamatório foi, também, muito investigado nos estudos desta RS, provavelmente devido ao  $\alpha$ -humuleno ser um importante composto da *Cordia verbenaceae*, agente terapêutico com expressiva ação contra inflamação [52]. No trabalho de Passos e colaboradores [52] o  $\alpha$ -humuleno e o *trans*-cariofileno apresentaram atividade significativa na redução do edema de pata induzido por carragenina, um dos protocolos iniciais para triagem de substâncias anti-inflamatória potenciais (Tabela 3).

Medeiros e colaboradores [12] descreveram que a atividade anti-inflamatória do  $\alpha$ -humuleno e do *trans*-cariofileno provavelmente seria decorrente da inibição do Fator Nuclear

de transcrição Kappa B (NF- $\kappa$ B). Este, por sua vez, é de extrema importância para expressão de citocinas pró-inflamatórias, visto que controla a transcrição de genes da grande maioria dos fatores que são responsáveis pela inflamação [53-56], logo, ao inibir estes fatores os compostos estariam prevenindo a formação do processo inflamatório.

Outro trabalho bastante importante no delineamento do potencial anti-inflamatório do  $\alpha$ -humuleno e isômero (-)-*trans*-cariofileno foi escrito por Fernandes e colaboradores [57]. Esse estudo avaliou a atividade anti-inflamatória oral dos compostos em diversos protocolos experimentais e com variadas doses (5, 25, 50 e 100 mg/kg). Os resultados evidenciaram que seus efeitos provavelmente estariam relacionados a uma importante inibição da ativação ou liberação de diferentes mediadores inflamatórios, como: a bradicinina e a histamina, que são importantes vasodilatadores, além de causarem aumento da permeabilidade vascular; a interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), citocinas capazes de promover a adesão e quimiotaxia dos leucócitos e alterações sistêmicas, como a febre [58]; e as prostaglandinas E2 (PGE2) e enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), que são derivadas da cascata do ácido araquidônico e alvos importantes de muitos anti-inflamatórios, principalmente os não esteroidais [59, 60].

Além desses mecanismos ligados a inibição de fatores pró-inflamatórios [57, 61-63], outros estudos avaliaram novas vertentes para a ação dos sesquiterpenos em estudo nesta revisão, como a ativação seletiva dos receptores canabinoides CB<sub>2</sub>, que constituem estratégia terapêutica potencial para o tratamento de inflamação [61, 62, 64, 65]. O estudo pré-clínico *in vivo* recente de Varga e colaboradores [65], que investigou o  $\beta$ -cariofileno contra lesão hepática e inflamação induzida pela ingestão crônica de álcool em excesso em camundongos, mostrou que o sesquiterpeno apresentou atividade hepatoprotetora através da inibição da resposta inflamatória, que, de acordo com seus achados, poderia estar relacionado a mecanismos mediados pelos receptores CB<sub>2</sub>.

Esses receptores são do tipo acoplado a proteína G, em sua grande maioria a G inibitória [66], caracterizando alvos importantes de canabinoides, que são substâncias responsáveis por sua modulação fisiológica ou em processos patológicos [67, 68]. Agonistas destes receptores são amplamente estudados com potencial para diversas atividades farmacológicas: analgésico, antiemético, antitumoral e também anti-inflamatório [69-77]. Apresentando-se predominantemente na periferia [68, 78, 79], estudos demonstram que macrófagos tendem a

aumentar os níveis de receptores CB<sub>2</sub>, e que em processos inflamatórios estas células mostram-se mais sensíveis a substâncias consideradas como agonistas dos receptores canabinoides [80].

Diversos são os mecanismos pelos quais estes receptores podem agir a nível de atividade anti-inflamatória. Neste sentido, sua ação poder ser relacionada ao fato de que estes se apresentam majoritariamente na superfície de células do sistema imunológico, e, portanto, tem significativo envolvimento na modulação deste [81,82]; além de poderem agir impedindo a migração celular, através da inibição de quimiocinas, dentre outros mecanismos envolvidos na adesão e rolamento das células de defesa para o local da inflamação [83-85]; além de inibir mediadores pró-inflamatórios [86-89].

Esse direcionamento para o envolvimento destes receptores foi, também, bem destacado no trabalho de Gertsch e colaboradores [62], tendo em vista que em seus resultados eles demonstraram uma ligação seletiva do (*E*)- $\beta$ -cariofileno, considerando ele como agonista deste receptor pois ele foi capaz de reduzir fortemente a resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos do tipo selvagem, mas não em camundongos que não possuíam os receptores CB<sub>2</sub>.

#### *Atividade antimicrobiana*

A busca por substâncias alternativas aos tratamentos contra microrganismos tem crescido consideravelmente devido a frequente resistência que estes tem desenvolvido aos fármacos atualmente comercializados [90]. Nessa perspectiva, estudos são construídos a partir do pressuposto de conseguir maior eficácia no tratamento contra bactérias, fungos e parasitas [91]. Para tanto, os sesquiterpenos constituem classe importante na investigação para o potencial antimicrobiano de novos compostos [92].

Nos resultados desta RS, essa categoria incluiu os estudos que trabalharam as atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. Quanto aos microrganismos utilizados, foram bastante diversificados possibilitando conhecer um perfil amplo dos sesquiterpenos referente a sua ação antimicrobiana (Tabela 4).

Referente a atividade antibacteriana, os estudos que à investigaram, demonstraram que houve eficácia significativa contra: bactéria *Mycobacterium tuberculosis* [93]; os *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* [94];

*Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* <sup>[95]</sup>; contra uma bactéria marinha *Vibrio fischeri* <sup>[96]</sup>; e, mais recentemente, contra *Helicobacter pylori* <sup>[97]</sup>.

O trabalho de Azizan e colaboradores <sup>[94]</sup> evidenciou um efeito maior, do  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno e Germacreno D, contra bactérias Gram-negativas quando comparado a atividade contra Gram-positivas. Isto poderia fortalecer a atividade encontrada no trabalho de Woo e colaboradores <sup>[97]</sup> de inibição da *H. pylori*, uma bactéria também Gram-negativa; sendo destacado como potencial mecanismo de ação a capacidade do  $\beta$ -cariofileno de inibir a replicação celular bacteriana. E, também, fortalecer a explicação da fraca atividade encontrada contra *P. acnes* e *S. aureus*, bactérias Gram-positivas, no trabalho de Zhu e colaboradores <sup>[95]</sup>.

No entanto, o estudo de Perestrelo e colaboradores <sup>[96]</sup>, que investigou o potencial tóxico de terpenoides sobre a bactéria *V. fischeri*, Gram-negativa, demonstrou que a citotoxicidade do (+)-valenceno e do  $\beta$ -cariofileno foi baixa. Eles relacionaram esta baixa atividade a difícil solubilidade em água destes compostos hidrocarbonetos, limitando sua difusão no meio. Isto é importante, pois a membrana da camada externa das Gram-negativas é composta principalmente de lipopolissacarídeos, formando assim uma barreira de permeabilidade hidrofílica que fornece proteção contra os efeitos de compostos altamente hidrofóbicos <sup>[98]</sup>.

Por outro lado, Solórzano-Santos e Miranda-Novales <sup>[99]</sup> relacionam o potencial antibacteriano de óleos essenciais, justamente a sua característica hidrofóbica, o que favorece contato com os lipídios da membrana celular e mitocôndrias das bactérias, originando alterações que culminam em perda de moléculas essenciais para as bactérias, levando a morte destas. Portanto, é notória a necessidade de investigação dos reais mecanismos pelos quais os terpenoides estejam agindo.

Outra atividade investigada foi o potencial antiparasitário desses compostos. O estudo de Martínez-Díaz e colaboradores <sup>[100]</sup> descreveu importante ação do *trans*-cariofileno contra *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis*. Enquanto Soares e colaboradores <sup>[101]</sup>, assim como Carmo et al <sup>[102]</sup>, relataram atividade antileishmanial para o *trans*- $\beta$ -cariofileno contra Promastigotas de *Leishmania amazonenses*.

Quanto ao potencial antifúngico, esse foi investigado avaliando a ação do humuleno,  $\alpha$ -copaeno e do cariofileno contra *Peronophythora litchii*. O  $\alpha$ -copaeno e o cariofileno demonstraram significativa atividade antifúngica, apresentando forte inibição do crescimento micelial, esporulação, germinação de esporângios e do crescimento do tubo germinativo. No entanto, o humuleno demonstrou fraca atividade inibitória, mesmo em concentrações altas <sup>[103]</sup>.

Nesse sentido, enxerga-se a necessidade de mais estudos para compreender os mecanismos pelos quais este grupo de terpenoides possa está agindo, assim como os fatores que podem influenciar em sua atividade.

#### *Outras Atividades Farmacológicas*

O  $\alpha$ -humuleno e seu isômero,  $\beta$ -cariofileno, também apresentaram outras atividades farmacológicas, as quais foram agrupadas nesta categoria (Tabela 5). O potencial farmacológico para cicatrização foi evidenciado em um estudo recente que trabalhou com o  $\beta$ -carofileno, onde os resultados demonstraram significativa melhora da reepitelização e proliferação celular em modelos *in vivo* e *in vitro*. Outro objetivo do trabalho foi avaliar, também, o impacto do sistema olfativo na atividade do composto, no entanto os receptores olfativos não estavam envolvidos na cicatrização das feridas [104].

O processo de cicatrização é bastante complexo e envolve diversos fatores, que culminam na substituição do tecido que foi lesado reestabelecendo a homeostasia tecidual [105, 106]. A cicatrização é favorecida por inúmeros processos bioquímicos, e pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação, que não possuem limites bem definidos sendo consideradas sobrepostas [107, 108]. Nesta perspectiva, é amplo o caminho para o desenvolvimento de novos fármacos que supram as necessidades do campo da cicatrização, podendo agir por diversas vias, como exemplo peptídeos anti-microbianos podem compor o tratamento [109]. Portanto, é essencial que pesquisas sejam desenvolvidas a fim de investigar os possíveis mecanismos pelos quais o  $\alpha$ -humuleno e o  $\beta$ -cariofileno poderiam estar agindo para promover a cicatrização.

O  $\beta$ -carofileno também apresentou outras atividades farmacológicas, demonstrando ser um importante agente para proteção em lesão renal de isquemia-reperfusão, tendo sua atividade sido relacionada a seu potencial de atenuação significativa do aumento do nível de malondialdeído (MDA) no rim [110]. Esse, por sua vez, é um marcador importante para avaliação de estresse oxidativo, além de apresentar citotoxicidade e níveis elevados em patologias associadas ao estresse oxidativo [111-113]. Desta forma, ao interferir na quantificação do MDA, para menos, a substância torna-se protetora contra potenciais lesões por este.

Outra ação do  $\beta$ -carofileno foi a capacidade de preservar o metabolismo tecidual dos vasos, impedindo os resultados de uma oclusão bilateral da artéria carótida comum seguida de reperfusão, possivelmente por controlar o estresse oxidativo [114]. Além de demonstrar-se,



também, composto importante para prevenção de leucopenia <sup>[115]</sup>; ter apresentado efeitos antiespasmódicos no músculo liso traqueal de ratos, sob a perspectiva do envolvimento na inibição de canais de cálcio dependente da voltagem <sup>[116]</sup>; e significativa atividade na prevenção da fibrose hepática, relacionada a seu potencial antioxidante, por possível eliminação de radicais livres <sup>[117]</sup>.

Dois estudos que trabalharam com o  $\alpha$ -humuleno e com o  $\beta$ -cariofileno, evidenciaram que os dois compostos apresentaram significativa atividade gastroprotetora, em um modelo experimental de triagem <sup>[118]</sup>; e um impotente potencial antialérgico <sup>[119]</sup>. As úlceras gástricas podem ser ocasionadas por diversos fatores que percorrem desde hábitos, como o tabagismo e ingestão de álcool, até condições de estresse e agentes infecciosos <sup>[120]</sup>; para tanto, é importante destacar que o  $\alpha$ -humuleno está presente em uma espécie que apresentou potencial gastroprotetor <sup>[121]</sup>, no entanto ainda existe necessidade de desenvolvimento de mais estudos que possam elucidar os prováveis mecanismos pelos quais ele possa estar agindo.

#### *Potencial Tóxico*

Somente um trabalho desta revisão, objetivou investigar a toxicidade do  $\alpha$ -humuleno e de seu isômero  $\beta$ -cariofileno. Desenvolvido por LaVoie e colaboradores <sup>[122]</sup>, o estudo que buscaram avaliar a possível toxicidade da fumaça dos principais constituintes do cravo-da-índia no pulmão de ratos, demonstrou que o  $\beta$ -cariofileno não causou sinais de toxicidade, no entanto quando avaliado o  $\alpha$ -humuleno foi possível observar evidências de hemorragias nos pulmões, porém sendo considerado um efeito tóxico pouco pronunciado quando comparado a outro composto, o eugenol, que causou significativo congestionamento nos pulmões dos ratos com indícios de hemorragias intersticiais (Tabela 6).

Os estudos toxicológicos são importantes ferramentas na avaliação da segurança da administração de substâncias. A classe dos terpenos destaca-se por ser um grupo de metabólitos com importante finalidade de favorecer mecanismos de defesa para plantas a agentes externos, evidenciando seu relativo potencial tóxico <sup>[2, 123, 124]</sup>. Nesta perspectiva, observa-se a necessidade de uma investigação maior referente ao potencial toxicológico do  $\alpha$ -humuleno e de seus isômeros, tendo em vista a escassez de estudos nesta área.

**Tabela 2** - Descrição dos estudos realizados com *α-humuleno* e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a atividade antitumoral.

<i>α</i> -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)	Origem do composto*	Objetivo	Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular	Dose/concentração	V.a.	Resultados e conclusão	Referência
<i>β</i> -cariofileno	Sigma Aldrich Co.	Investigar a potencialização dos efeitos de DOX + CAR em células cancerígenas do fígado.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagem celular: – Hepatoma humano: HepG2.</li> </ul>	<i>β</i> -cariofileno: 2,5-375 $\mu$ M (correspondente a 0,5-75 $\mu$ g/mL); 50 $\mu$ M de <i>β</i> -cariofileno + 20 $\mu$ M de DOX	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR exibiu citotoxicidade semelhante em todas as condições experimentais;</li> <li>• Potencializou o efeito citotóxico da DOX (possivelmente por aumentar o acúmulo de DOX intracelular; e por afetar as bombas de efluxo nas células HepG2).</li> </ul>	Sotto et al. (2020)
<i>α</i> -humuleno e valenceno	Sigma-Aldrich - USA	Avaliar os efeitos dos sesquiterpenos, no potencial da membrana mitocondrial, e sua influência na eficácia de 5-fluorouracil e oxaliplatin (1,2-diaminociclohexaneoxalato-platinum) em adenocarcinoma do cólon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: – Células humanas epiteliais de adenocarcinoma colorretal: CaCo-2 e SW-620.</li> </ul>	50, 100 e 150 $\mu$ mol L <sup>-1</sup>	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observou-se atividade antiproliferativa do HUM + OxPt e + FU (provavelmente devido a diminuição do potencial da membrana mitocondrial)</li> <li>• O VAL agiu de maneira antagonista para a eficácia de FU, em concentrações mais baixas.</li> </ul>	Ambrož et al. (2019)
<i>α</i> -humuleno	N.r.	Investigar a propriedade anticâncer em HCC.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i></li> <li>• Linhagens HCC humana: – Células Huh7 – SMMC-7721 – HepG2 – Hep3B</li> <li>• Linhagem celular hepática normal: – Células L-02</li> <li>• Camundongos nus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>: – Concentração inicial de 50 mg/mL: 1,25–50 <math>\mu</math>g/mL</li> <li>• <i>In vivo</i>: – 10 e 20 mg/kg</li> </ul>	<i>In situ</i> i.p.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O HUM inibiu a proliferação de células HCC</li> <li>• Induziu citotoxicidade em HCC através da indução de vias apoptóticas intrínsecas, tanto <i>in vitro</i> quanto <i>in vivo</i>.</li> </ul>	Chen et al. (2019)
<i>α</i> -humuleno e valenceno	Sigma-Aldrich	1- Testar e comparar os efeitos de sesquiterpenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares:</li> </ul>	20, 40, 100 e 200 $\mu$ g/mL	<i>in situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sesquiterpenos isolados:</li> </ul>	Ambrož et al. (2017)

$\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)	Origem do composto*	Objetivo	Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular	Dose/concentração	V.a.	Resultados e conclusão	Referência
		na proliferação celular e eficácia de DOX em células cancerígenas de ovário e linfoblastos. 2- Avaliar a capacidade desses sesquiterpenos para aumentar a concentração de DOX nas células e inibir transportadores de efluxo.	– Câncer de ovário: A2780 e SKOV3 – Células de câncer – linfoblastos: CCRF/CEM e CEM/ADR			– Exibiram atividade antiproliferativa da linhagem celular de câncer de ovário (A2780) e das células cancerígenas linfoblásticas (CCRF/CEM) – Somente o VAL apresentou eficácia frente a linhagem de células de câncer de ovário (SKOV3), com uma sensibilidade reduzida ao DOX; • Em associação com DOX: – Sinergismo pelo HUM na linhagem ovariana sensível a DOX (A2780) e em linhagem de células do câncer de ovário (SKOV3) – Nas células CEM/ADR de linfoblastos resistentes a DOX, o HUM aumentou o acúmulo de DOX 5x mais. • Inibição do efluxo de rodamina por todos os sesquiterpenos testados.	
$\beta$ -elemeno	Shijiazhuang Pharmaceutical Group Co., Hebei, China	Investigar o papel do composto (bELE) na proliferação e tumorigênese de Células-tronco do glioma (GSLCs)	• <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> • Linhagens celulares de glioblastomas (GBM): – U87 – U373 – SHG-44 – SKMG-4 – U138 – T98G.	• <i>In vitro</i> : – Concentração inicial de 20 mg/ml): 0, 2,5, 5, 10, 20 e 40 $\mu$ g/ml; – Em combinação com Temozolomida (TMZ): 2,5 $\mu$ g/ml • <i>In vivo</i> : – 50 mg/kg	<i>In situ</i> i.p.	• Atividade antitumoral por inibição da proliferação de GSLCs seletivamente pelo bELE (possivelmente por conta da inibição da sinalização de Notch) • Inibição sinérgica por bELE em conjunto com TMZ, da proliferação de GSLCs • Inibição de origem de tumores <i>in vivo</i>	Feng et al. (2017)

<b><i>α</i>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
<i>α</i> -humuleno, <i>β</i> -cariofileno e valenceno	Sigma-Aldrich	1- Avaliar os efeitos dos sesquiterpenos sobre a eficácia do DOX em células cancerígenas e não- cancerígenas 2-Elucidar os possíveis mecanismos de ação dos sesquiterpenos e seus efeitos sobre o estresse oxidativo mediado por DOX e o acúmulo de DOX nas células.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Camundongos nus</li> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma de cólon: CaCo-2</li> <li>– Hepatócitos de ratos (células não cancerígenas).</li> </ul> </li> </ul>	0 a 50 µg/mL	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolados, exibiram: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Atividade antiproliferativa de células cancerígenas (HUM e VAL)</li> <li>– Efeitos pró-oxidativos (VAL).</li> </ul> </li> <li>• Em associação a DOX: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Sinergismo/ potencialização (VAL e HUM) frente a células cancerígenas (possivelmente pela capacidade de aumentar seletivamente o acúmulo de DOX e por aumentarem a formação de ERO, nessas células)</li> </ul> </li> <li>• Nos hepatócitos: isolados, os sesquiterpenos, não alteraram viabilidade</li> <li>• Quando combinados, diminuíram a formação de ERO, em comparação com DOX isolado.</li> </ul>	Ambrož et al. (2015)
<i>α</i> -humuleno e <i>trans</i> -cariofileno	Sigma-Aldrich	Investigar a composição química e o potencial antitumoral do óleo essencial de folhas de <i>Zornia brasiliensis</i> e de seus compostos majoritários.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Tumores B16-F10 (melanoma de camundongo)</li> <li>– Carcinoma hepatocelular humano: HepG2</li> <li>– Células K562 (leucemia mielocítica crônica humana)</li> <li>– Células HL-60 (leucemia)</li> </ul> </li> </ul>	0,19–25 µg/mL	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade antitumoral sem significância de todos os compostos isolados (valores &gt; 4 µg/mL) em células tumorais.</li> </ul>	Costa et al. (2015)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
			promielocítica humana).				
$\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno	Fluka Co. – Milwaukee, USA	Avaliar os componentes responsáveis por a atividade anticancerígena de <i>Dyospyros discolor</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Câncer de cólon humano: HT-29</li> <li>– Carcinoma hepatocelular humano: J5)</li> <li>– Adenocarcinoma pulmonar humano: A549</li> </ul> </li> </ul>	N.r.	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O HUM e o CAR exibiram citotoxicidade significativa contra as linhagens de células HT-29, J5 e A549 (considerados, portanto, componentes importantes para atividade anticancerígena de <i>D. discolor</i>)</li> </ul>	Su et al. (2015)
$\alpha$ -zingibereno	Purificado a partir do óleo essencial	Investigar a possível ação citotóxica do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i> , e do $\alpha$ -zingibereno e seus derivados hidrogenados, contra várias linhas de células tumorais.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens de células: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Melanoma murinho: B16F10</li> <li>– Subline melanótica: B16F10-Nex2</li> <li>– Melanoma humano: A2058</li> <li>– Glioblastoma: U87</li> <li>– Leucemia: HL-60</li> <li>– Carcinoma do útero: Siha</li> <li>– Carcinoma de mama: MCF-7</li> <li>– Carcinoma cervical humano: HeLa</li> </ul> </li> </ul>	10 mg/mL	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exibiu atividade antitumoral contra células HeLa, U87, Siha, HL-60 e B16F10-Nex2.</li> </ul>	Bou et al. (2013)
( <i>E</i> )-cariofileno	Sigma–Aldrich	Avaliar a atividade antiproliferativa sobre células tumorais	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Carcinoma de cólon humano: HCT116</li> </ul> </li> </ul>	0,78–200 $\mu$ g/ml	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresentou atividade antiproliferativa de células tumorais</li> </ul>	Venditti et al. (2013)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma humano da mama: MDA-MB 231</li> <li>– Melanoma maligno humano: A375</li> </ul>				
$\beta$ -cariofileno	Sigma–Aldrich	Descrever o efeito antiproliferativo e pró-apoptótico do óleo essencial derivado de <i>Commiphora gileadensis</i> e do CAR.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Células de tumor humano (MoFir) e de camundongo (BS24-1)</li> </ul> </li> </ul>	2.4 – 4 $\mu$ M	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade antiproliferativa dose dependente de células cancerígenas (por morte celular de ambas as linhagens celulares, possivelmente por ativação da atividade enzimática da caspase-3)</li> <li>• O CAR é o composto ativo do óleo essencial de <i>C. gileadensis</i> e que age de maneira seletiva em células tumorais.</li> </ul>	Amiel et al. (2012)
$\gamma$ -humuleno	Sigma Chemicals Co. - St. Louis, MO, USA	Investigar o mecanismo da indução de apoptose pelo $\gamma$ -humuleno nas células HT29.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagem celular do câncer colorretal humano: HT29.</li> </ul>	0, 25, 50, 75 e 100 $\mu$ M	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O <math>\gamma</math>-humuleno apresentou atividade anticâncer (por redução da viabilidade celular e indução da inibição do crescimento nas células HT29; estimulação do agrupamento DR4/DR5; desencadear a morte celular apoptótica nessas células, possivelmente por ativar a caspase-8 e a caspase-3).</li> </ul>	Lan et al. (2011)
$\alpha$ -humulene e <i>trans</i> -carofileno	Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha	Investigar potencial citotóxico dos compostos presentes em <i>Salvia officinalis</i> , em células tumorais animais e humanas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma colorretal humano: HCT-116</li> <li>– Câncer de mama: MCF-7)</li> </ul> </li> </ul>	1,56 a 100 $\mu$ g/ml	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresentaram citotoxicidade, pela capacidade de inibirem o crescimento das células cancerosas:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>trans</i>-cariofileno contra HCT-116 e RAW264.7 (maior atividade); e</li> <li>– HUM contra celulares HCT-116, MCF-7 e RAW264.7</li> </ul> </li> </ul>	el Hadri et al. (2010)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
			– Macrófagos murinos: RAW264				
$\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich Chemical Co.	Avaliar a atividade citotóxica de <i>Platyclus orientalis</i> , <i>Prangos asperula</i> e <i>Cupressus sempervirens</i> ssp., óleos essenciais <i>pyramidalis</i> , e identificar componentes ativos envolvidos na inibição do crescimento populacional de linhagens celulares de câncer humano.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Melanoma amelanótico humano: C32)</li> <li>– Adenocarcinoma de células renais: ACHN.</li> </ul> </li> </ul>	100 $\mu$ L/poço (concentrações finais de até 100 $\mu$ g/mL)	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR pode estar envolvidos na citotoxicidade dos óleos essenciais, uma vez que, após ser testado quanto a citotoxicidade <i>in vitro</i> em células tumorais humanas, diminuiu a viabilidade dessas células em mais de 50%.</li> </ul>	Loizzo et al. (2008)
$\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno	Sigma - CO St. Louis, MO	Avaliar citotoxicidade do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i> e dos sesquiterpenos contra células tumorais.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Carcinoma cervical humano</li> <li>– Carcinoma pulmonar humano: A-549</li> <li>– Adenocarcinoma do cólon humano: HT-29</li> </ul> </li> <li>• Vero (rim de macaco)</li> </ul>	0,2 – 200 $2 \mu$ g/ml <sup>-1</sup>	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HUM e CAR apresentaram citotoxicidade significativa contra todas as células testadas.</li> </ul>	Silva et al. (2008)
$\alpha$ -humuleno, $\alpha$ -copaeno e $\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich	Descrever a composição química e a atividade citotóxica do óleo essencial de folhas de <i>Eugenia zuchowskiae</i> de Monteverde, Costa Rica.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma mamário: MCF-7 e MDA-MB-468</li> <li>– Melanoma maligno humano: UACC-257.</li> </ul> </li> </ul>	N.r.	N.r.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade antitumoral por possível citotoxicidade em relação as células cancerígenas (MCF-7), desencadeada pelos principais componentes de <i>E. zuchowskiae</i> (<math>\alpha</math>-copaeno, CAR e HUM).</li> </ul>	Cole et al. (2007)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
$\alpha$ -humuleno, isocariofileno e $\beta$ -cariofileno	N.r	Avaliar o efeito potencializador do CAR na atividade anticâncer do HUM, isocariofileno e paclitaxel contra as linhagens celulares tumorais humanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma de câncer de mama humano: MCF-7</li> <li>– Adenocarcinoma de cólon DLD-1: ATCC # CCL-221</li> <li>– Fibroblastos murinos L-929: ATCC # CCL-1.</li> </ul> </li> </ul>	Para $\alpha$ -humuleno, isocariofileno: 16-64 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ; para $\beta$ -cariofileno: 2.5 ou 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentrações não citotóxicas do CAR aumentaram significativamente a citotoxicidade do HUM, isocariofileno e paclitaxel</li> <li>• O efeito potenciador do CAR pode ser devido, em parte, a alteração da permeabilidade da membrana</li> <li>• No caso do paclitaxel, os resultados sugeriram que o CAR promove o acúmulo intracelular desse agente.</li> </ul>	Legault & Pichette (2007)
$\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich-Fluka	Investigar a atividade antitumoral do óleo de abeto de bálsamo e seus constituintes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma de câncer de mama humano: MCF-7</li> <li>– Adenocarcinoma prostático: PC-3</li> <li>– Carcinoma de pulmão: A-549</li> <li>– Adenocarcinoma de cólon juntamente com fibroblastos: DLD-1 e L-929</li> </ul> </li> </ul>	50 ou 200 $\mu\text{M}$	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HUM apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens celulares testadas (possivelmente age por acúmulo de EROs a um nível citotóxico)</li> <li>• Ele é, ainda, significativamente menos citotóxico contra fibroblastos normais humanos do que contra linhas de células tumorais</li> <li>• Esses resultados sugerem que o HUM é o constituinte responsável pela atividade antitumoral do óleo de abeto de bálsamo.</li> </ul>	Legault et al. (2003)
$\beta$ -cariofileno e $\alpha$ -humuleno	Berje Chemical Co. - Bloomfield, NJ	Relatar isolamento, identificação e características biológicas de compostos de <i>Eugenia caryophyllata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Camundongos A/J</li> </ul>	20 mg	v.o	CAR e HUM apresentaram potencial ação inibitória da carcinogênese (possivelmente por aumentarem a atividade da enzima Glutathione S-transferase – GST, no fígado e na mucosa do	Zheng; Kenney; Lam (1992)



<i>α</i> -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)	Origem do composto*	Objetivo	Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular	Dose/concentração	V.a.	Resultados e conclusão	Referência
						intestino delgado dos camundongos).	

\*Conforme descrito pelo estudo encontrado

CAR- *β*-cariofileno, DOX- doxorubicina, ERO- espécies reativas de oxigênio, HCC- Carcinoma hepatocelular, HUM- *α*-humuleno, i.p- intraperitoneal, N.r- Não reportado, v.o- via oral, VAL- valenceno.

**Tabela 3** - Descrição dos estudos realizados com *α*-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a atividade anti-inflamatória.

<i>α</i> -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)	Origem do composto*	Objetivo	Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular	Dose/concentração	V.a.	Resultados e conclusão	Referência
<i>β</i> -cariofileno	Flka	Investigar efeitos do CAR contra lesão hepática e inflamação induzida pela ingestão crônica de álcool em excesso em camundongos e se esses efeitos foram mediados por receptores CB <sub>2</sub> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>– Camundongos: C57BL/6J</li> <li>– Camundongos: CB<sub>2</sub> -/-</li> <li>– Controles do tipo selvagem: CB<sub>2</sub> +/-</li> </ul>	10 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Foi observada ação hepatoprotetora (atenuando a resposta pró-inflamatória mediada por células de Kupffer, estresse oxidativo/nitrativo mediado por neutrófilos/inflamação, inflamação vascular e desregulação metabólica hepática).</li> <li>• Esses efeitos protetores podem envolver, pelo menos em parte, mecanismos mediados pelos receptores CB<sub>2</sub>.</li> </ul>	Varga et al. (2018)
<i>β</i> -cariofileno e metil- <i>β</i> -ciclodextrina	N.r	Avaliar a atividade anti-inflamatória e de proteção gástrica do complexo de inclusão formado por CAR e M $\beta$ CD.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>– Camundongos Swiss.</li> </ul>	CAR: 50 mg/kg; CAR/M $\beta$ CD: 50 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As atividades anti-inflamatórias de proteção gástrica e antioxidante do CAR foram confirmadas</li> <li>• O complexação promoveu uma melhoria das atividades anti-inflamatória, de proteção gástrica e antioxidante em relação ao CAR puro (modelos de edema de pata, e peritonite, induzido por carragenina; e danos gástricos induzidos por etanol)</li> </ul>	Santos et al. (2017)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
<i>(E)</i> - $\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich	Pesquisar o possível efeito terapêutico do <i>(E)</i> - $\beta$ -cariofileno em um modelo de nefropatia induzida por cisplatina; bem como examinar o possível envolvimento dos receptores CB <sub>2</sub> nas ações do <i>(E)</i> - $\beta$ -cariofileno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>– Camundongos: C57Bl/6J</li> <li>– Camundongos knockout: para CB<sub>2</sub></li> </ul>	1,3 e 10 mg/kg	i.p.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR atenuou a lesão renal induzida por cisplatina (por diminuir inflamação, diminuindo infiltração de células inflamatórias e a resposta pró-inflamatória; além de atenuar o aumento do estresse oxidativo e nitrativo) de maneira dependente do receptor de CB<sub>2</sub>.</li> </ul>	Horváth et al. (2012)
$\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich	Investigar o efeito anti-inflamatório do CAR na colite induzida por DSS e analisar se esse efeito foi mediado por CB <sub>2</sub> e PPAR $\gamma$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo e n vitro</i></li> <li>• Camundongos <i>CD1</i>.</li> <li>• Linfonodos mesentéricos</li> <li>• Macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i>: – 12,5, 25 50mg/kg</li> <li>• <i>In vitro</i>: – 10 <math>\mu</math>mol / L</li> </ul>	v.o <i>in situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR exibiu efeitos preventivos e terapêuticos na colite induzida por DSS em camundongos. Os mecanismos foram associados à ativação dos receptores CB<sub>2</sub> e PPAR<math>\gamma</math>, levando à inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, CXCL1 / KC e IFN-<math>\gamma</math>) e influxo celular inflamatório. Todos estes efeitos também se associaram com a inibição de fatores nucleares.</li> </ul>	Bento et al. (2011)
$\alpha$ -humuleno e <i>trans</i> -cariofileno	Sigma Aldrich - St. Louis, MO, EUA	Avaliar os efeitos dos compostos em um modelo experimental de inflamação alérgica das V.A.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Camundongos: BALB/c</li> </ul>	HUM e <i>trans</i> -cariofileno: 50 mg/kg <sup>-1</sup> ; HUM: 1 mg/mL <sup>-1</sup>	v.o aerossol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O HUM apresentou importante atividade anti-inflamatória, com potencial para o tratamento da asma e doenças inflamatórias e alérgicas relacionadas (possivelmente suas ações ocorrem através de mecanismos associados à modulação do equilíbrio Th1/Th2, diminuição da produção de muco, inibição dos níveis de IL-5, CCL11 e LTB 4 e expressão da P-selectina, provavelmente inibindo a ativação de os fatores de transcrição, NF-<math>\kappa</math>B e AP-1</li> </ul>	Bento et al. (2011)

$\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)	Origem do composto*	Objetivo	Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular	Dose/concentração	V.a.	Resultados e conclusão	Referência
						<ul style="list-style-type: none"> <li>• O tratamento com <i>trans</i>-cariofileno não apresentou resultados significativos.</li> </ul>	
<i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno	Fluka	Relatar a seletividade do volátil generalizado ( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno ao receptor CB2 e seu potencial agonista funcional do CB2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i></li> <li>• Linhagens celulares:</li> <li>• Células HL60 (positivas) que expressam CB2 de leucemia promielocítica humana</li> <li>• Clone HL60 do receptor CB2 negativo</li> <li>• Células CHO-K1 que expressam CB2 humanase.</li> <li>• Animais: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Camundongos do tipo selvagens: Cnr2/</li> <li>– Ratos deficientes no receptor CB2: Cnr2/</li> </ul> </li> </ul>	5 e 10 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exibiu atividade anti-inflamatória que pode estar relacionada a ação agonista sobre CB<sub>2</sub></li> <li>• Sua possível atividade anti-inflamatória oral pode estar relacionada a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e atenuação da fosforilação de Erk1/2 e JNK1/2.</li> <li>• A dose de 5 mg/kg reduziu fortemente a resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos do tipo selvagem, mas não em camundongos sem receptores CB<sub>2</sub>.</li> </ul>	Gertsch et al. (2008)
$\alpha$ -humuleno e (-) - <i>trans</i> -cariofileno	Isolados do óleo essencial de <i>Cordia verbenácea</i>	Avaliar as propriedades anti-inflamatórias orais dos sesquiterpenos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Camundongos Swiss</li> <li>• Ratos Wistar.</li> </ul>	5, 25, 50 e 100 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os sesquiterpenos exibiram atividade anti-inflamatória oral pronunciada (atividade provavelmente relacionada a uma importante inibição da ativação e/ou liberação de diferentes mediadores inflamatórios, como bradicinina, fator ativador de plaquetas, histamina, IL-1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math> e PGE 2).</li> </ul>	Fernandes et al. (2007)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
						<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os efeitos parecem estar associados à sua capacidade de inibir a regulação positiva das enzimas COX-2 e iNOS.</li> </ul>	
$\alpha$ -humuleno e <i>trans</i> -cariofileno	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA	Investigar os efeitos dos sesquiterpenos nas respostas inflamatórias agudas desencadeadas pelo LPS.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Ratos Wistar.</li> </ul>	50 mg/kg <sup>-1</sup>	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os resultados sugeriram que HUM e o <i>trans</i>-cariofileno podem prevenir a inflamação induzida por LPS através da inibição de NF-<math>\kappa</math>B.</li> <li>• A atividade do HUM pode estar relacionada ao controle dos receptores B1 de cininas e atividade do <i>trans</i>-cariofileno ainda necessita de estudos mais aprofundados.</li> </ul>	Medeiros et al. (2007)
$\alpha$ -humuleno e <i>trans</i> -cariofileno	Isolado a partir do óleo essencial de <i>Cordia verbenácea</i>	Verificar as atividades anti-inflamatórias e antialérgicas do óleo essencial de <i>C. verbenácea</i> e seus princípios ativos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Camundongos Swiss</li> <li>• Ratos Wistar.</li> </ul>	50 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HUM e <i>trans</i>-cariofileno reduziram significativamente o edema de pata, o que permitiu inferir que eles podem ser os responsáveis pela ação farmacológica da espécie <i>C. verbenácea</i>.</li> </ul>	Passos et al. (2007)

\*Conforme descrito pelo estudo encontrado

CB2- receptor canabinoide tipo 2, COX- ciclooxigenase, DSS- dextrano sulfato de sódio, i.p.- intraperitoneal, IFN- $\gamma$ - interferon-gama, IL- interleucina, iNOS- óxido nítrico sintase induzível, LPS- lipopolissacarídeo, LTB- leucotrieno, M $\beta$ CD- metil- $\beta$ -ciclodextrina, N.r.- não reportado, NF-Kb- fator nuclear kappa B, PGE2- prostaglandina E2, PPAR $\gamma$ - receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral, V.A- vias aéreas, v.o.- via oral.

**Tabela 4** - Descrição dos estudos realizados com  $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a atividade antimicrobiana.

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
$\beta$ -cariofileno	SFC BIO Co., Ltd	Investigar s efeitos do $\beta$ -cariofileno no combate a <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i></li> <li>• Linhagem bacteriana: –Cepas de <i>H. pylori</i></li> <li>• Linhagem celular:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>: – 7,81–4000 <math>\mu</math>g/mL</li> <li>• <i>In vivo</i>: – 100 e 500 <math>\mu</math>g/g</li> </ul>	<i>In situ</i> v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CAR apresentou atividade antimicrobiana significativa e efeito protetor contra infecção por <i>H. pylori</i>.</li> </ul>	Woo HJ, Yang JY, Lee MH, et al (2020)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>– Adenocarcinoma gástrico.</li> <li>• Animal:</li> <li>– Esquilo-da-Mongólia.</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possivelmente o mecanismo de ação está ligado a capacidade de inibir a replicação bacteriana.</li> </ul>	
$\beta$ -cariofileno e (+)-valencene	Fluka (Buchs, Switzerland)	Avaliar a toxicidade de terpenoides sobre <i>V. fischeri</i> por ensaio de inibição da bioluminescência	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagem bacteriana: – <i>Vibrio fischeri</i> (ATCC 49387).</li> </ul>	1, 10, 50 e 100 $\mu$ M	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CAR e (+)-valenceno apresentaram baixa toxicidade contra <i>V. fischeri</i>.</li> <li>• Esse efeito pode estar relacionado a baixa solubilidade em água que limita a difusão no meio.</li> <li>• A baixa sensibilidade de <i>V. fischeri</i> ao efeito citotóxico dos terpenos de hidrocarbonetos pode ser explicado pelo fato de que a membrana da camada externa Gram-negativa é composta, principalmente, por moléculas de LPS, que formam uma barreira de permeabilidade hidrofílica, fornecendo proteção contra os efeitos de compostos.</li> </ul>	Perestrelo et al. (2019)
humuleno, $\alpha$ -copaeno e Cariofileno	Sigma–Aldrich	Avaliar a atividade antifúngica de voláteis de <i>Streptomyces fimicarius</i> (BWL-H1) em <i>Peronophythora litchii</i> Chen e identificar os componentes eficazes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagem fúngica: – <i>Peronophythora litchii</i></li> </ul>	2 $\mu$ L/L - 1000 $\mu$ L/L	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>-copaeno e Cariofileno apresentaram atividade antifúngica significativa (devido a capacidade inibirem o crescimento micelial, esporulação, germinação de esporângios e desenvolvimento do tubo germinativo).</li> <li>• O humuleno não apresentou resultados significativos</li> </ul>	Xing et al. (2018)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
$\alpha$ -Humuleno, trans-cariofileno e germacreno D	ChromaDex, Irvine, CA, EUA	Avaliar as propriedades antibacterianas e definir os perfis bioativos dos óleos essenciais de <i>Orthosiphon stamineus</i> e <i>Ficus deltoidea</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens bacterianas: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ A.F. Gram-positivas orais: <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Enterococcus faecalis</i>;</li> <li>– <i>Streptococcus mutans</i>;</li> <li>– <i>S. mitis</i>; e</li> <li>– <i>S. salivarius</i>.</li> </ul> </li> <li>○ A. O. Gram-negativos: <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i></li> <li>– <i>Porphyromonas gingivalis</i></li> <li>– <i>Fusobacterium nucleatum</i>.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	0,08-10 mg/mL	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os compostos testados apresentaram atividade antibacteriana mais significativa para as cepas Gram-negativas, em comparação com as Gram-positivas.</li> </ul>	Azizan et al. (2017)
trans-cariofileno	Sigma-Aldrich EUA	Discutir os efeitos antiparasitários do óleo essencial de <i>Artemisia absinthium</i> , juntamente com a composição química das frações ativas e testar citotoxicidade seletiva.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens parasitárias: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i></li> <li>– Cepas de <i>Trichomonas vaginalis</i>.</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CI: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 10mg/mL</li> </ul> </li> <li>• Frações e compostos- <i>T. cruzi</i>: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 100, 10 e 1 <math>\mu</math>g mL</li> </ul> </li> <li>• Frações e compostos- <i>T. vaginalis</i>: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 500, 250, 100, 75, 37,5 e 18,75 <math>\mu</math>g/mL</li> </ul> </li> </ul>	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O trans-cariofileno mostrou uma atividade antiparasitária significativa contra as duas linhagens testadas.</li> </ul>	Martínez-Díaz et al. (2015)
trans- $\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich	Investigar a atividade antileishmanial.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagem parasitária:</li> <li>• Promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>.</li> </ul>	50 $\mu$ g/ml	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os resultados evidenciaram atividade antileishmanial significativa por parte do trans-<math>\beta</math>-cariofileno</li> </ul>	Soares et al. (2013)
$\beta$ -elemeno	Instituto Nacional para o	Avaliar atividades antimicrobianas dos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> </ul>	62.5 - 1000 $\mu$ g/mL	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os resultados evidenciaram atividade antimicrobiana, com o</li> </ul>	Zhu J et al. (2013)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
	Controle de Produtos Farmacêuticos e Biológicos, Pequim. Shanghai Shunbo Biotech Co., Ltd., Shanghai, China	três óleos essenciais de <i>Curcuma wenyujin</i> e dos seis principais compostos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linhagens bacterianas: <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Propionibacterium acnes</i>; e</li> <li>– <i>Staphylococcus aureus</i>.</li> </ul> </li> <li>• Linhagem de fungos: <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Malassezia furfur</i></li> </ul> </li> </ul>			$\beta$ -elemeno apresentando efeitos inibitórios leves ou fracos (Inhibition zone diameter entre 10 e 17 mm e MIC de 125 $\mu$ g/mL).	
<i>trans</i> -cariofileno	Chemical Co e Fluka	Investigar a atividade antileishmanial de óleos essenciais de espécies de <i>Piper</i> e identificar os principais compostos envolvidos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens parasitárias: <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>L. amazonenses</i></li> <li>– <i>L. guyanensis</i>.</li> </ul> </li> </ul>	60, 30, 15 e 7,5 $\mu$ g/mL	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O <i>trans</i>-cariofileno demonstrou melhores resultados na atividade antileishmanial do que o óleo essencial e o (-) limoneno), contra formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i>.</li> </ul>	Carmo et al. (2012)
$\alpha$ -humuleno	N.r.	Isolar, caracterizar e investigar a bioatividade de compostos das raízes de <i>Polyalthia cerasoides</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i></li> <li>• Linhagens bacterianas: <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Mycobacterium tuberculosis</i></li> <li>– <i>Plasmodium falciparum</i></li> </ul> </li> <li>• Linhagens de células cancerígenas: <ul style="list-style-type: none"> <li>– KB, BC1 e NCI-H187.</li> </ul> </li> </ul>	N.r.	N.r.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O HUM mostrou atividade antibacteriana significativa apenas contra <i>M. tuberculosis</i>.</li> <li>• Não apresentou citotoxicidade quando avaliado em relação as células cancerígenas.</li> </ul>	Kanokmedhaku ; Kanokmedhaku I; Lekphrom (2007)

\*Conforme descrito pelo estudo encontrado

A.F.- anaeróbios facultativos, A.O.- anaeróbios facultativos, CAR-  $\beta$ -cariofileno, HUM-  $\alpha$ -humuleno, LPS- lipopolissacarídeo, N.r.- não reportado, MIC - Minimum inhibitory concentration.

**Tabela 5** - Descrição dos estudos realizados com  $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a investigação de outras atividades farmacológicas

$\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)	Origem do composto*	Objetivo	Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular	Dose/concentração	V.a.	Resultados e conclusão	Referência
$\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO	Examinar o potencial de cicatrização e possível envolvimento do sistema olfativo no impacto.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i></li> <li>• Linhagens celulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Fibroblastos e queratinócitos obtidos a partir de camundongos.</li> </ul> </li> <li>• Animais: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Camundongos fêmeas C57BL/6J</li> </ul> </li> </ul>	50mg/kg	Tópica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR agiu melhorando a reepitelização e proliferação celular nos camundongos.</li> <li>• Receptores olfativos não estão envolvidos na cicatrização de feridas.</li> </ul>	Koyama et al. (2019)
$\beta$ -cariofileno	N.r.	Investigar o efeito nas funções hemodinâmicas, tubulares renais e nos marcadores de estresse oxidativo e biomarcadores da inflamação.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Animais: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Ratos Wistar</li> </ul> </li> </ul>	50 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CAR apresentou efeito protetor diante das alterações renais induzidas pela lesão renal de isquemia-reperfusão (possivelmente por atenuação significativa do aumento do nível de MDA no rim)</li> <li>• Não afetou significativamente os parâmetros funcionais da hemodinâmica ou tubular renais.</li> </ul>	Hammad et al. (2018)
$\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EUA	Avaliar o potencial inibidor das alterações moleculares induzidas pela BCCAO/R.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Animais: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Ratos Wistar</li> </ul> </li> </ul>	40 mg/rato - correspondente a 180 mg/kg	N.r.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR foi capaz de preservar o metabolismo tecidual, impedindo os resultados da BCCAO/R.</li> <li>• Possivelmente o efeito está relacionado a característica do CAR de controlar o estresse oxidativo, agindo de maneira benéfica na ativação do SE e da lipoperoxidação.</li> </ul>	Poddighe et al. (2018)



<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
<i>trans</i> -cariofileno	N.r.	Avaliar o potencial imunomodulador sistêmico contra a leucopenia secundária.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Animais: – Ratos Wistar</li> </ul>	50 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os resultados evidenciaram o potencial do <i>trans</i>-cariofileno na prevenção da leucopenia.</li> </ul>	Campos et al. (2015)
$\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno	N.r.	Avaliar o potencial gastroprotetora das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> e seus principais compostos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i></li> <li>• Animais: – Camundongos Swiss.</li> </ul>	30 mg/kg	v.o.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os dois sesquiterpenos apresentaram significativa atividades gastroprotetora (no modelo de úlcera induzida por etanol/HCl).</li> </ul>	Lemos M et al. (2015)
$\beta$ -cariofileno	Sigma-Aldrich Química S.A.	Investigar a atividade antioxidante, o efeito protetor na fibrose hepática e a capacidade inibitória na ativação das HSC.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo e in vivo</i></li> <li>• Animais: – Ratos Wistar</li> <li>• Linhagem celular: – Células estreladas hepáticas CFSC-2G</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i>: – 2, 20 e 200mg/kg</li> <li>• <i>In vitro</i>: – 1 e 10 <math>\mu</math>M</li> </ul>	i.p. e <i>in situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O CAR apresentou atividade antioxidante (provavelmente devido à sua atividade de eliminação de radicais livres, contra radicais hidroxila, ânions superóxido e peróxidos lipídicos).</li> <li>• Apresentou potencial de prevenção da fibrose hepática (possivelmente ocorre pela capacidade antioxidante).</li> </ul>	Calleja et al. (2013)
<i>trans</i> -cariofileno	Sigma Chemical Company	Investigar a atividade antiespasmódica do no músculo liso da traqueia.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo e in vivo</i></li> <li>• Animais: – Ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)</li> </ul>	0,0005-50 mM	<i>In situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O <i>trans</i>-cariofileno apresentou efeito antiespasmódico no músculo liso traqueal, sob a hipótese de que ele provoca relaxamento da musculatura lisa traqueal a partir da inibição de canais de <math>Ca^{2+}</math> dependente da voltagem.</li> </ul>	Pinho-da-Silva et al. (2012)
$\alpha$ -humuleno e $\beta$ -cariofileno	Chemical Industry Co., Japan	Examinar as atividades antialérgicas do extrato aquoso de Zyumi-Haidoku-San-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i>:</li> <li>• Animais: – Ratos Sprague-Dawley – Camundongos ddY – Camundongos BALB.</li> </ul>	20, 40 e 80 mg/kg	i.p.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primeiro relatório demonstrando a atividade antialérgica do HUM e CAR.</li> </ul>	Tanaka et al. (1996)

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
		Ka-Rengyo (ZSR) e seu princípio ativo.					

\*Conforme descrito pelo estudo encontrado

BCCAO/R- oclusão bilateral transitória da artéria carótida seguida de reperfusão, CAR-  $\beta$ -cariofileno, HSC- células estreladas hepáticas, i.p.- intraperitoneal, MDA- malondialdeído, N.r.- não reportado, SE- sistema endocanabinóide, v.o- via oral.

**Tabela 6** – Descrição do estudo realizado com  $\alpha$ -humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s) considerando a investigação do potencial tóxico.

<b><math>\alpha</math>-humuleno e/ou isômero (s) geométrico (s)</b>	<b>Origem do composto*</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Modelo (s) de experimentação/ Espécie, cepa e/ou linhagem celular</b>	<b>Dose/concentração</b>	<b>V.a.</b>	<b>Resultados e conclusão</b>	<b>Referência</b>
<i><math>\alpha</math>-humuleno e <math>\beta</math>-cariofileno</i>	Fluka Chemical, Corp. Hauppauge, NY, EUA	Avaliar o efeito tóxico da fumaça nos pulmões de ratos, desencadeado pelos principais constituintes do cravo.	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vivo:</i> – Ratos Fischer (344).</li> </ul>	12, 24 e 48 mg/kg	v.iq.– por instilação	<ul style="list-style-type: none"> <li>O e CAR não ocasionou sinais de toxicidade nos pulmões dos ratos.</li> <li>Evidências de hemorragias nos pulmões foram observadas em animais que receberam o HUM (efeitos tóxicos pouco pronunciados, se comparado ao eugenol que provocou congestionamento nos pulmões dos ratos com indícios de hemorragias intersticiais).</li> </ul>	LaVoie et al. (1986)

\*Conforme descrito pelo estudo encontrado

CAR-  $\beta$ -cariofileno, HUM-  $\alpha$ -humuleno, v.iq. - Via intra-traqueal.

## Conclusão

A partir desta RS foi possível evidenciar um crescente número de pesquisas experimentais com  $\alpha$ -humuleno e isômeros, uma vez que apresentam relevante potencial para a elaboração de novos fármacos. Destacam-se como substâncias com resultados significativos contra o câncer, por possuírem expressiva ação antitumoral e citotoxicidade contra células cancerígenas, sendo essa atividade a mais investigada.

Outras atividades promissoras para esse grupo de compostos foram antimicrobianas e anti-inflamatórias. O  $\alpha$ -humuleno e seus isômeros se mostraram eficazes contra uma ampla quantidade de microorganismos, além de agirem como anti-inflamatórios por ativação ou inativação de muitos fatores envolvidos no processo inflamatório.

Sobre as demais atividades investigadas, foi possível observar que esses caracterizam-se substâncias com grande potencial gastroprotetor, cicatrizante, analgésico e antioxidante. É importante ressaltar que muitas dessas atividades podem ter grande influência a partir de processos inflamatórios. Logo, substâncias com promissora atividade anti-inflamatória podem ser elementos interessantes para estudos mais aprofundados nesse campo.

No entanto, ainda existe uma carência quanto a estudos que avaliem a segurança da administração dessas substâncias, uma vez que somente um trabalho que avaliou toxicidade foi encontrado durante a pesquisa. Portanto, expressa-se a necessidade do desenvolvimento de trabalhos nesta vertente.

## Referências

- [1] Correia SJ, David JM, Silva EP, *et al.* Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. *Química Nova* 2008; 31(8): 2056-59.
- [2] Felipe LO, Bicas JL. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola* 2017; 39(2): 120-30.
- [3] Maia JGS, Andrade EHA. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Química Nova* 2009; 32(3): 595-622.
- [4] Mc Murry J. *Química Orgânica*. 7ª ed. São Paulo: Cengage Learning 2011.
- [5] Pergentino de Souza D, Farias Nóbrega FF, Almeida RN. Influence of the chirality of (*R*)-(-)- and (*S*)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. *Chirality* 2007; 19: 264-8.
- [6] Sousa DP, Nóbrega FFF, Claudino FS, *et al.* Pharmacological effects of the monoterpene  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2007; 17: 170-5.

- [7] Perazzo FF, Carvalho JCT, Rodrigues M, *et al.* Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2007; 17: 521-8.
- [8] Perazzo FF, Lima LM, Maistro EL, *et al.* Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008; 18: 686-9.
- [9] Almeida MFO, Melo ACR, Pinheiro MLB, *et al.* Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova* 2011; 34(7): 1182-7.
- [10] Alves SF, Ed. Study chemical composition, biological activity and microencapsulation of essential oil of the fruits from *Pterodon emarginatus* Vogel - Fabaceae ("sucupira"). [Dissertação on the internet] Goiás: Universidade Federal de Goiás 2012 [cited 2020 jun 9]. Available from: (<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/2112>).
- [11] Chaves JS, Leal PC, Pianowsky L, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene alpha-humulene in mice. *Planta Medica* 2008; 74(14): 1678-83.
- [12] Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, *et al.* Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology* 2007; 151: 618-27.
- [13] Krivoruchko A, Nielsen J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Biotechnology* 2015; 35: 7-15.
- [14] Leosessenciais [homepage on the Internet]. Azambuja W: Óleo Essencial de Erva Baleeira - Óleos Essenciais. O Guia do Brasil. [cited 2020 aug 14]. Available from: (<http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-erva-baleeira/#>).
- [15] HMDB [homepage on the Internet]. The Metabolomics Innovation Centre. Showing metabocard for alpha-Humulene (HMDB0036467). [cited 2020 aug 14]. Available from: (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0036467#references>).
- [16] NCBI [homepage on the Internet]. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. alpha-Humulene, CID=6508206. [cited 2020 aug 14]. Available from: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Humulene>).
- [17] Petrucci RH, Harwood WS, Herring FG. *Química geral: princípios e aplicações modernas*. 8ª ed. Rio Saddle superior, NJ: Prentice Hall 2002.
- [18] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, *et al.* Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of Internal Medicine* 2009; 151: 264-9.
- [19] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2012.
- [20] Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products* 1992; 55(1): 999-1003.
- [21] Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology* 1997; 10: 2-18.

- [22] Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1988; 23: 283-337.
- [23] Torres MCL, Soares NFF, Pereira JAM. Extraction of glutathione s-transferase from bovine liver. *Ciência e Agrotecnologia* 2006; 30(2): 302-7.
- [24] Tuerlinckx SM, Delfim DH, Huber ACK. Evaluation of glutathione-s-transferase enzyme activity of the earthworm *Eisenia foetida* exposed to ivermectin. *Acta Toxicológica Argentina* 2018; 26(2): 71-82.
- [25] Bou DD, Lago JHG, Figueiredo CR, *et al.* Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound  $\alpha$ -Zingiberene and derivatives. *Molecules* 2013; 18: 9477-87.
- [26] Cole RA, Bansal A, Moriarity DM, *et al.* Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Natural Medicines* 2007; 61: 414-7.
- [27] el Hadri A, del Río MAG, Sanz J, *et al.* Cytotoxic activity of  $\alpha$ -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2010; 76 (3): 343-56.
- [28] Legault J, Dahl W, Debiton E, *et al.* Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica* 2003; 69: 402-7.
- [29] Legault J, Pichette A. Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticâncer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007; 59: 1643-7.
- [30] Venditti A, Bianco A, Nicoletti M, *et al.* Phytochemical analysis, biological evaluation and micromorphological study of *Stachys alopecuros* (L.) Benth. subsp. *divulsa* (Ten.) Grande endemic to central Apennines, Italy. *Fitoterapia* 2013; 90: 94-103.
- [31] Ambrož M, Boušová I, Skarka A, *et al.* The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of Doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* 2015; 20: 15343-58.
- [32] Ambrož M, Šmatová M, Šadibolová M, *et al.* Sesquiterpenes  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. *Acta Pharmaceutica* 2019; 69: 121-8.
- [33] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003; 8(2): 115-28.
- [34] Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics* 2009; 43(1): 95-118.
- [35] Zeeshan H, Lee GH, Kim HR, *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17(327): 1-20.
- [36] Amiel E, Ofir R, Dudai N, *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of gilead (*Commiphora gileadensis*), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; 2012: 1-8.

- [37] Chen H, Yuan J, Hao J, *et al.*  $\alpha$ -Humulene inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces apoptosis through the inhibition of Akt signaling. *Food and Chemical Toxicology* 2019; 134: 1-11.
- [38] Yu-Hsuan L, Yang-Chang W, Kai-Wei W, *et al.* Death receptor 5-mediated TNFR family signaling pathways modulate  $\gamma$ -humulene-induced apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells. *Oncology Reports* 2011; 25: 419-24.
- [39] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research* 2000; 256(1): 42-9.
- [40] Reed JC. Apoptosis-based Therapies. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002; 1(2): 111-21.
- [41] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25(34): 4798–811.
- [42] Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005; 106(2): 408-18.
- [43] Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008; 19(3–4). 325-31.
- [44] Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16(7): 935-8.
- [45] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004; 5(11): 897–907.
- [46] Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19(1): 87-95.
- [47] Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology* 2013; 23(12): 620-33.
- [48] Ambrož M, Matoušková P, Skarka A, *et al.* The effects of selected sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil on the efficacy of Doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules* 2017; 22: 1-10.
- [49] Sotto A, Irannejad H, Eufemi M, *et al.* Potentiation of Low-Dose Doxorubicin Cytotoxicity by Affecting P-Glycoprotein through Caryophyllane Sesquiterpenes in HepG2 Cells: An In Vitro and In Silico Study. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21: 1-28.
- [50] Friberg LE, Henningsson A, Maas H, *et al.* Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(24): 4713-21.
- [51] Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury- Mechanisms of induction and implication for therapy. *Current cancer therapy reviews* 2006; 2(3): 271-9.
- [52] Passos GF, Fernandes ES, Cunha FM, *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea*. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 110: 323-33.

- [53] Baldwin ASJ. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 1996; 14:649-83.
- [54] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* 1997; 336:1066-71.
- [55] Camargo RG Ed. Papel da Via de sinalização do NF- $\kappa$ B na inflamação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com caquexia associada ao câncer. [Dissertation on the internet] São Paulo: Universidade de São Paulo 2012 [cited 2020 aug 14]. Available from: **(doi:10.11606/D.42.2012.tde-17042013-114031)**.
- [56] Glezer I, Marcourakisa T, Avellar MCW, *et al.* O fator de transcrição NF- $\kappa$ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2000; 22(1): 26-30.
- [57] Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* 2007; 569: 228-36.
- [58] Cruvinel WM, Mesquita Jr D, Araújo JAP, *et al.* Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010; 50(4): 434-61.
- [59] Lucas GNC, Leitão ACC, Alencar RL, *et al.* Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Brazilian Journal of Nephrology* 2018; 41(1): 124-30.
- [60] Pountos I, Georgouli T, Bird H, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 2011; 3: 19-27.
- [61] Bento AF, Marcon R, Dutra RC, *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR $\gamma$  Pathway. *The American Journal of Pathology* 2011; 178(3): 1153-66.
- [62] Gertsch J, Leonti M, Raduner S, *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(26): 9099-104.
- [63] Rogerio AP, Andrade EL, Leite DFP, *et al.* Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene  $\alpha$ -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology* 2009; 15: 1074-87.
- [64] Horváth B, Mukhopadhyay P, Kechrid M, *et al.*  $\beta$ -caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52(8): 1325-33.
- [65] Varga ZV, Matyas C, Erdelyi K, *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. *British Journal of Pharmacology* 2018; 175: 320-34.
- [66] Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005; 168:53-79.

- [67] Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005; 168:1-51.
- [68] Howlett AC, Barth F, Bonner TI, *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews* 2002; 54(2):161-202.
- [69] Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget* 2014; 5(15): 5852-72.
- [70] Fine PG, Rosenfeld MJ. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Medical Journal* 2013; 4(4): 1-15.
- [71] Fukuda S, Kohsaka H, Takayasu A, *et al.* Cannabinoid receptor 2 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2014; 15(275): 1-20.
- [72] Immenschuh S. Endocannabinoid signalling as an anti-inflammatory therapeutic target in atherosclerosis: does it work? *Cardiovascular Research* 2009; 84(3): 341-2.
- [73] Lehmann C, Kianian M, Zhou J, *et al.* Cannabinoid receptor 2 activation reduces intestinal leukocyte recruitment and systemic inflammatory mediator release in acute experimental sepsis. *Critical Care* 2012; 16(2): 1-11.
- [74] Mimura T, Oka S, Koshimoto H, *et al.* Involvement of the endogenous cannabinoid 2 ligand 2-arachidonyl glycerol in allergic inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology* 2012; 159(2): 149-56.
- [75] Rossi S, Bernardi G, Centonze D. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* 2010; 224(1): 92-102.
- [76] Schwartz RH, Beveridge RA. Marijuana as an antiemetic drug: how useful is it today? Opinions from clinical oncologists. *Journal of Addictive Diseases* 1994; 13(1): 53-65.
- [77] Silva MA Ed. Efeito de agonistas do receptor canabinoide 2 na resposta inflamatória induzida por *Mycobacterium bovis* BCG. [Thesis on the internet] Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz 2016 [cited 2020 Aug 14]. Available from: (<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/23134>).
- [78] Galiègue S, Mary S, Marchand J, *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry* 1995; 232(1): 54-61.
- [79] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365(6441): 61-5.
- [80] Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, *et al.* Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *International Immunopharmacology* 2002; 2(1): 69-82.
- [81] Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5(5): 400-11.
- [82] Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, *et al.* Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Medicinal Chemistry* 2009; 1(7): 1333-49.



- [83] Montecucco F, Burger F, Mach F, *et al.* CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology* 2008; 294(3): 1145-55.
- [84] Ramirez SH, Haskó J, Skuba A, *et al.* Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *The Journal of Neuroscience* 2012; 32(12): 4004-16.
- [85] Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Dykstra H, *et al.* Selective activation of cannabinoid receptor 2 in leukocytes suppresses their engagement of the brain endothelium and protects the blood-brain barrier. *The American Journal of Pathology* 2013; 183(5): 1548-58.
- [86] Correa F, Mestre L, Docagne F, *et al.* Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *British Journal of Pharmacology* 2005; 145(4): 441-8.
- [87] Correa F, Docagne F, Mestre L, *et al.* A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. *Biochemical Pharmacology* 2009; 77(1): 86-100.
- [88] Singh UP, Singh NP, Singh B, *et al.* Cannabinoid receptor-2 (CB2) agonist ameliorates colitis in IL-10(-/-) mice by attenuating the activation of T cells and promoting their apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012; 258(2): 256-67.
- [89] Toguri JT, Lehmann C, Laprairie RB, *et al.* Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB(2) receptor activation in endotoxin-induced uveitis. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171(6): 1448-61.
- [90] Monteiro ARP. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. [Dissertation on the internet] Porto: Universidade Fernando Pessoa 2015 [cited 2020 aug 14]. Available from: ([https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5327/1/PPG\\_23518.pdf](https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5327/1/PPG_23518.pdf)).
- [91] Bezerra RV, Oliveira HMBF, Lima CMBL, *et al.* Antimicrobial activity of (R)-(+)-Citronellal, (S)-(-)-Citronellal and 7-Hydroxycitronellal monoterpenes against *Bacillus subtilis* Strain. *Revista UNINGÁ* 2019; 56(2): 62-9.
- [92] Bakkali F, Averbecka S, Averbecka D, *et al.* Biological effects of essential oils –A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 446-475.
- [93] Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Lekphrom R. Bioactive Constituents of the Roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 1536–8.
- [94] Azizan N, Said SM, Abidin ZZ, *et al.* Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Orthosiphon stamineus* Benth and *Ficus deltoidea* Jack against pathogenic oral bacteria. *Molecules* 2017; 22(2135): 1-18.
- [95] Zhu J, Lower-Nedza AD, Hong M, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of three essential oils from *Curcuma wenyujin*. *Natural Product Communications* 2013; 8(4): 523-6.
- [96] Perestrelo R, Silva C, Fernandes MX, *et al.* Prediction of Terpenoid Toxicity Based on a Quantitative Structure–Activity Relationship Model. *Foods* 2019; 8(628): 1-16.

- [97] Woo HJ, Yang JY, Lee MH, *et al.* Inhibitory Effects of  $\beta$ -Caryophyllene on *Helicobacter pylori* Infection In Vitro and In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(1008): 1-14.
- [98] Mann CM, Cox SD, Markham SL. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology* 2000; 30(2): 294-7.
- [99] Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 2012; 23(2): 136- 41.
- [100] Martínez-Díaz RA, Ibáñez-Escribano A, Burillo J, *et al.* Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2015; 110(5): 693-9.
- [101] Soares DC, Portella NA, Ramos MFS, *et al.* Trans- $\beta$ -Caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial Copaiba oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; 2013: 1-13.
- [102] Carmo DFM, Amaral ACF, Machado GMC, *et al.* Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. *Molecules* 2012; 17: 1819-29.
- [103] Xing M, Zheng L, Deng Y, *et al.* Antifungal activity of natural volatile organic compounds against litchi downy blight pathogen *Peronophythora litchii*. *Molecules* 2018; 23(358): 1-15.
- [104] Koyama S, Purk A, Kaur M, *et al.* Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. *PLoS ONE* 2019; 14(12): 1-32.
- [105] Cavalcante LC, Moreira MC, Mota OML, *et al.* Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. *Brazilian Journal of Periodontology* 2012; 22(1): 69-73.
- [106] Panobianco MS, Sampaio BAL, Caetano EA, *et al.* Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste* 2012; 11: 15-22.
- [107] Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and mole-cular events. *Dermatologic Surgery* 2005; 31: 674-86.
- [108] Paganella JC, Ribas LM, Santos CA, *et al.* Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2009; 104(569-572): 13-18.
- [109] Laureano A, Rodrigues AM. Cicatrização de feridas. *Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia* 2011; 69(3): 355-67.
- [110] Hammad FT, Ojha S, Azimullah S, *et al.* Does  $\beta$ -caryophyllene protect against renal dysfunction following ischemia-reperfusion injury in the rat?. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 2018; 10(6): 163-71.
- [111] Bagis S, Tamer L, Bilgin GSR, *et al.* Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology International* 2005; 25(3): 188-90.

- [112] Pilz J, Meineke I, Gleiter C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B* 2000; 742: 315-25.
- [113] Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, *et al.* Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as na internal standard. *Journal of Chromatography B* 2003; 785: 337-44.
- [114] Poddighe L, Carta G, Serra MP, *et al.* Acute administration of beta-caryophyllene prevents endocannabinoid system activation during transient common carotid artery occlusion and reperfusion. *Lipids in Health and Disease* 2018; 17(23): 1-14.
- [115] Campos MIC, Vieira WDA, Campos CN, *et al.* Atorvastatin and *trans*-caryophyllene for the prevention of leukopenia in an experimental chemotherapy model in Wistar rats. *Molecular and Clinical Oncology* 2015; 3: 825-8.
- [116] Pinho-da-Silva L, Mendes-Maia PV, Teófilo TMNG, *et al.* *trans*-Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Causes Tracheal Smooth Muscle Relaxation through Blockade of Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channels. *Molecules* 2012; 17: 11965-77.
- [117] Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, *et al.* The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition* 2013; 109: 394–401.
- [118] Lemos M, Santin JR, Mizuno CS, *et al.* *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2015; 25: 238-45.
- [119] Tanaka S, Akimoto M, Tambe Y, *et al.* Volatile Antiallergic Principles from a Traditional Herbal Prescription of Kampo Medicine. *Phytotherapy Research* 1996; 10: 238-41.
- [120] Silva MS, Alves de Almeida AC, Faria FM, *et al.* *Abarema cochliacarpus*: Gastroprotective and ulcer-healing activities. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 132(1): 134-42.
- [121] Esteves I, Souza IR, Rodrigues M, *et al.* Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101: 191-6.
- [122] LaVoie EJ, Adams JD, Reinhardt J, *et al.* Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD<sub>50</sub> of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters. *Archives of Toxicology* 1986; 59: 78-81.
- [123] Dvora H, Koffas MAG. Microbial production of flavonoids and terpenoids. In: McNeil B, Archer D, Giavasis I, *et al.* *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. 1<sup>a</sup> Ed. Cambridge: Elsevier 2013; 10: 234-261.
- [124] Veigas Jr C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova* 2003; 26(3): 390-400.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

#### 3.1. Artigo 2

#### DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO $\alpha$ -HUMULENO EM CAMUNDONGOS

##### 1. Introdução

A depressão é ocasionada devido a uma falta de capacidade do organismo de se adaptar a eventos que o expõe a um extremo estresse [1, 2]. Ele é caracterizado como um distúrbio afetivo que predispõe o indivíduo a variações de humor, além de interferir na realização de atividades de vida diária por relativa diminuição de energia [1, 3-6].

Os primeiros fármacos utilizados na terapia medicamentosa da depressão, os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs), apresentam a desvantagem de desenvolver intensos efeitos colaterais que ocorrem devido inespecíficos mecanismos de ação. Para tanto, a fim de diminuir o desenvolvimento dos efeitos indesejáveis, outros fármacos foram criados, estes por sua vez agem com uma maior seletividade, agindo sobre receptores específicos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina [7].

No entanto, ainda existe a necessidade de estudos que busquem descobrir compostos com potencial contra depressão, uma vez que a terapia farmacológica existente ainda apresenta significativas desvantagens. Neste sentido, os terpenos, uma das principais classes de compostos existentes nos óleos essenciais de plantas, tem sido amplamente utilizado na indústria cosmética e alimentícia [8-10].

Os sesquiterpenos, terpenos compostos por 3 unidades isoprênicas, são apresentados em estudos com potenciais atividades sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Como exemplo, o  $\beta$ -cariofileno demonstrou potencial anticonvulsivante e neuroprotetor [11], o nerolidol foi destacado com potencial atividade ansiolítica [12], e o bisabolol foi ressaltado em um trabalho com significativa atividade ansiolítica e sedativa devido ao envolvimento com receptores de GABA (ácido gama aminobutírico) [13].

Para tanto, o  $\alpha$ -humuleno, principal sesquiterpeno encontrado no óleo essencial de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) é classificado como responsável por a atividade anti-inflamatória do óleo [14, 15]. Além disto, apresentou significantes atividades em outros estudos como, antinociceptiva, antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena [15-19], porém, estudo que investigassem sua atividade sobre o SNC não foram encontrados, especificamente sobre a depressão.

A respeito do aparecimento do quadro de depressão, estudos têm sido realizados sob a perspectiva de investigar a relação do estresse oxidativo com a origem da depressão. Estes trabalhos destacam que o transtorno depressivo pode surgir devido a vulnerabilidade do SNC aos danos ocasionados pelo estresse oxidativo [20, 21].

Nesta perspectiva, considerando que alguns sesquiterpenos são metabólitos potenciais para o tratamento de distúrbios que acometem o SNC, além de serem potenciais antioxidantes; e observando o possível envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento da depressão; objetivou-se com este trabalho investigar o possível efeito antidepressivo (símile) do  $\alpha$ -humuleno em camundongos.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Fármacos e Reagentes

Os fármacos e reagentes utilizados neste estudo foram os seguintes:  $\alpha$ -humuleno, Tween 80, Ácido tiobarbitúrico, Ácido tricloracético, Cloreto de potássio, Nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), Reagente de Griess modificado, Solução padrão malonilaldeído e Tampão Tris HCl (Sigma-Aldrich, EUA); imipramina, bupropiona e fluoxetina (Cristália Farma, Brasil); diazepam (União Química, Brasil); Solução Fisiológica 0,9% (Farmace, Brasil); e a Água destilada (Laboratório de Biofisiologia da FMJ, Brasil).

### 2.2. Animais

Para realização dos protocolos experimentais foram usados camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas ou machos com três meses de idade e peso variando entre  $30 \pm 5$  g, monitorados no Biotério Experimental da Universidade Regional do Cariri (URCA). Os animais receberam água e ração (Purina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e acondicionados a uma temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A presente pesquisa foi conduzida em estrita obediência com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos humanos (Resolução N° 196/1996 e 301/2000 do Conselho Nacional de Saúde – CNS), animais não-humanos (*Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - *National Institute of Health*-EUA, 1996; Lei Federal N° 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal – COBEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998) [22-25].

Todas as técnicas utilizadas foram estabelecidas de acordo com o decreto nº. 24.645 de 10 de julho de 1934 que assegura os direitos dos animais, estabelecendo medidas de proteção aos mesmos, e de acordo com a lei nº. 6.638 de 8 de maio de 1979, que normatiza as práticas didático científicas da vivisseção de animais [26, 27]. A Lei 6.638 de 8 de maio de 1979 dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, mediante a regulamentação da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais.

Portanto, o projeto foi submetido para avaliação da Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri, sendo aprovado sob o parecer de número 00248/2018.2 (ANEXO A).

### 2.3. Protocolos experimentais

A manipulação dos animais obedeceu aos princípios éticos para a experimentação animal dispostos pelo COBEA [28]. Todos os testes comportamentais foram realizados sempre no mesmo horário (12:00 às 17:00 horas), em sala devidamente isolada com temperatura constante ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e iluminação de pouca intensidade (lâmpada vermelha de 90 15V), onde os animais foram previamente acondicionados (24h antes).

Para cada protocolo experimental, os animais foram divididos em grupos de 10 animais e tratados, via oral (v.o.), com salina (solução fisiológica 0,9%), droga padrão (controle positivo – variando em função do teste) e  $\alpha$ -humuleno (com doses variando em função do teste). Quanto ao volume administrado, o mesmo não excedeu 0,1 mL/10 g de peso corporal e, a fim de manter o volume constante, as concentrações da solução foram ajustadas de acordo com a dose e peso dos animais. As drogas foram diluídas em solução salina; o Tween 80 a 0,5% foi usado como emulsificante para drogas insolúveis em água. Os animais foram submetidos ao jejum de 4 horas antes da administração. Procedidos uma hora (para substâncias administradas por v.o.) e trinta minutos (para substâncias administradas por via intraperitoneal – i.p.) após cada tratamento, os camundongos foram submetidos aos experimentos descritos a seguir.

Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração a -20° C, até que haja o recolhimento e descarte pela empresa responsável por materiais biológicos.

### 2.3.1. Estimativa da DL<sub>50</sub> e *Screening* Hipocrático

A toxicidade aguda do  $\alpha$ -humuleno foi avaliada a partir da estimativa da DL<sub>50</sub>; que serviu também para definir as doses que foram utilizadas nesta pesquisa (2,5, 5, e 10% do valor da DL<sub>50</sub>). Em conjunto com a DL<sub>50</sub> foi realizado o *screening hipocrático* com o objetivo de definir o perfil farmacológico do extrato sobre os sistemas biológicos, em especial sobre o Sistema Nervoso Central [29].

A avaliação da toxicidade aguda da administração oral do  $\alpha$ -humuleno seguiu a diretriz n.º 425 da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), publicada em 2008, para o teste de método de classe tóxica aguda (*Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure* (UDP) da OECD) [30].

Os animais foram organizados em grupos contendo três animais cada; os grupos foram tratados via oral (v.o.) com o  $\alpha$ -humuleno na dose 5.000 mg/Kg e salina 0,9% (0,1 mL/10g). Após o tratamento os animais foram observados em intervalos regulares após a administração (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos) e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Todos os sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, intensidade, duração e progressão dos mesmos foram registrados. Esses sinais consistiam em: agressividade, contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, orelha (cianótica, hiperemiada ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorréia, tremor da cauda, lacrimejamento, e sudorese, além de morte. Observações comportamentais sistemáticas através do *screening* hipocrático também foram realizadas. As intensidades dos efeitos foram tabuladas conforme os seguintes símbolos: A – Ausente; N – Normal; P – Presente; + - Baixa intensidade; ++ - Média intensidade; +++ - Alta intensidade; ↑ - Aumento e ↓ - Diminuição. As alterações encontradas na observação comportamental e exame clínico sistemático dos animais foram registrados em protocolo impresso com a lista de sinais a serem investigados. Esta lista e a pesquisa de sinais foram baseadas no modelo proposto por Malone [29].

### 2.3.2. Labirinto em Cruz Elevada (LCE)

O LCE para camundongos [31] consiste em um aparelho formado por dois braços abertos (34,5 x 3,25 cm) e dois braços fechados (34,5 x 3,25 cm), conectados entre si por uma plataforma central (10 x 10 cm), formando uma cruz, a qual se encontra-se elevada a 72 cm do solo.

Este modelo é bastante utilizado e validado do ponto de vista bioquímico, farmacológico e comportamental, com o objetivo de verificar o possível efeito ansiolítico de substâncias. O mesmo foi desenvolvido por Handley e Mithani [32], posteriormente modificado [33] e adaptado para camundongos [34].

Para realização deste teste, foram utilizados grupos (n=10) de camundongos que foram pré-tratados com veículo (salina + Tween 0,5%) v.o.; diazepam na dose de 1 mg/Kg (i.p.) como droga padrão; e  $\alpha$ -humuleno v.o. (125, 250 e 500 mg/kg). Após 1 hora, para animais tratados por v.o.; e 30 minutos, para os tratados i.p., cada animal foi levado individualmente ao centro do equipamento e observado por um período de cinco minutos. Durante esse tempo, o número de entradas (NEBA e NEBF) e o tempo total de permanência (TPBA e TPBF) nos braços aberto e fechado foram registrados.

### 2.3.3. Campo Aberto (CA)

O CA caracteriza-se como um dos aparelhos que é mais utilizado para a avaliação do efeito de drogas sobre a atividade locomotora. Este consiste em uma arena confeccionada de vidro transparente e piso preto (30 x 30 x 15 cm), dividida em nove quadrantes iguais [35].

Desta forma, para realização deste protocolo, grupos de animais (n=10) receberam salina (solução fisiológica 0,9% – 0,1 mL/10g + Tween 0,5%) v.o., diazepam (2 mg/kg) i.p., imipramina (30 mg/kg – antidepressivo tricíclico inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina) i.p., e o  $\alpha$ -humuleno (nas doses 125, 250 e 500 mg/kg + Tween 0,5%) v.o. Após 1 hora do tratamento (para os animais tratados por v.o.) e 30 minutos para os tratados i.p., cada animal foi colocado no centro do campo aberto e observado por 5 minutos. Os parâmetros comportamentais analisados foram: número de cruzamentos (NC – exploração horizontal, contando os quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontrar com as quatro patas dentro do mesmo quadrante), número de rearing (NR – exploração vertical, postura na qual o animal fica apoiado somente pelas patas traseiras), e número de grooming (NG – ação de autolimpeza).

Logo após os mesmos animais foram imediatamente observados no teste do rota rod.



#### 2.3.4. Rota rod (RR)

Com a realização do teste do RR é possível avaliar o efeito do relaxamento muscular ou perda da coordenação motora produzidas por drogas em animais [36]. Para esta avaliação, os camundongos foram selecionados em uma sessão de treino, 24 horas antes do experimento. Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso. Desta forma, os camundongos capazes de permanecer na barra giratória (16 rpm) por 180 segundos foram selecionados como aptos à realização do experimento.

Os animais selecionados foram tratados com salina (v.o.), imipramina (30 mg/kg) i.p., e o  $\alpha$ -humuleno (125, 250 e 500 mg/kg) v.o.; após 1 hora, para animais tratados por v.o. e 30 minutos para os tratados via i.p., os animais foram testados no aparelho; um grupo adicional (diazepam 5 mg/kg, i.p.) foi o controle positivo deste teste. Os parâmetros registrados foram: o número de quedas (NQ) sofridas (sendo o limite máximo de 3 quedas para cada animal) e o tempo de permanência (TP – em segundos) durante um minuto [37].

Logo após os mesmos animais foram imediatamente observados no teste do Labirinto em Cruz Elevada.

#### 2.3.5. Teste do Nado Forçado (TNF)

O teste do nado forçado foi realizado utilizando cilindros de acrílico transparente, medindo 18 cm de altura e 14 cm de diâmetro, com volume total de 2 L, contendo 1,5 L de água a 27° C.

Para este teste, os animais foram divididos em grupos (n=10) e receberam via oral salina (solução fisiológica 0,9% – 0,1 mL/10g + Tween 0,5%), imipramina (30 mg/kg) i.p., bupropiona (20 mg/kg) i.p., fluoxetina (10 mg/kg) i.p., e o  $\alpha$ -humuleno (nas doses 125, 250 e 500 mg/kg + Tween 0,5%) v.o. Após o intervalo aproximado de 1 hora, para os animais tratados via oral, e 30 minutos (para os tratados pela via i.p.); cada animal foi colocado para nadar individualmente no cilindro por 5 minutos, tempo durante o qual foi observado a latência para imobilidade (tempo em segundos que o animal precisou para ficar imóvel) e o tempo de imobilidade (em segundos), parâmetros utilizados para avaliar o efeito da droga neste teste experimental [38].

#### 2.3.6. Acinesia Induzida por Reserpina

Este protocolo consistiu no tratamento prévio dos animais com a reserpina (10 mg/kg, i.p.), 20 horas antes da administração das substâncias [39]. Após decorrido as primeiras 20 horas pós tratamento com a reserpina os animais foram divididos em grupos distintos (n=10), onde cada um recebeu um tratamento diferente: salina (solução fisiológica 0,9% – 0,1 mL/10 g + Tween 0,5%, v.o.), imipramina (30 mg/kg, i.p.), bupropiona (20 mg/kg, i.p.), fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) e  $\alpha$ -humuleno (nas doses 125, 250 e 500 mg/kg + Tween 0,5%, v.o.); um grupo distinto, sem reserpina, recebeu apenas salina. Meia hora depois para os tratados i.p. e 1 hora depois para os tratados por v.o., cada animal foi colocado no aparelho do campo aberto a fim de avaliar a atividade locomotora (durante 5 minutos) a partir da observação do número de cruzamentos.

### 2.3.7. Teste de Potencialização

A fim de traçar um possível mecanismo de ação para a atividade do tipo antidepressiva-símile do  $\alpha$ -humuleno, foi realizado o teste de potencialização. Neste protocolo, os animais foram divididos em grupos independentes (n=10) que receberam salina (solução fisiológica 0,9% – 0,1 mL/10 g + Tween 0,5%, v.o.), imipramina (0,3 e 30 mg/kg, i.p.), bupropiona (0,2 e 20 mg/kg, i.p.), fluoxetina (0,1 e 10 mg/kg, i.p.),  $\alpha$ -humuleno (1,25 e 125 mg/kg, v.o.) e grupos com associações da menor dose do  $\alpha$ -humuleno (1,25 mg/kg, v.o.) com as menores doses de cada antidepressivo: imipramina (0,3 mg/kg, i.p.), bupropiona (0,2 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (0,1 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos, para os tratados i.p., e 1 hora para os tratados por v.o., cada animal foi submetido ao TNF para avaliação do TI durante 5 minutos [38].

### 2.3.8. Participação da atividade antioxidante – Determinação da Concentração de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito

Para caracterização da participação atividade antioxidante na atividade antidepressiva (símile) do  $\alpha$ -humuleno, os animais foram divididos em três grupos (n=10), de maneira que dois grupos passariam pela situação de estresse (TNF), enquanto um seria o controle que não sofreu influência do TNF. Para tanto, o primeiro grupo recebeu o tratamento com salina (solução fisiológica 0,9% – 0,1 mL/10 g + Tween 0,5%, v.o.), no entanto não foi submetido ao TNF; o segundo grupo recebeu o tratamento com salina (solução fisiológica 0,9% – 0,1 mL/10 g + Tween 0,5%, v.o.) e o terceiro grupo recebeu o tratamento com  $\alpha$ -humuleno (125 mg/kg + Tween 0,5%, v.o.), estes dois últimos grupos foram submetidos ao TNF. Após 1 h do

tratamento, os animais do primeiro grupo foram eutanasiados e, imediatamente, o encéfalo foi removido e colocado sobre o gelo para retirada do hipocampo (HC) com auxílio de uma pinça reta de microdissecação. Os dois grupos seguintes, após 1 hora do tratamento foram submetidos ao TNF durante 5 minutos e, logo após, foram eutanasiados a fim de remover o encéfalo para retirado do HC, também.

Em seguida homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) foram preparados em solução tampão de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Para dosagem de TBARS, foram retirados 50 µL do homogeneizado e colocados um tubo de ensaio, os quais foram misturados com 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e 200 µL de solução de ácido tricloroacético a 10%. Em seguida, esta mistura foi agitada e mantida por 15 min em banho-maria (temperatura entre 95-100 °C). Decorrido este tempo, a solução foi resfriada em gelo (até atingir a temperatura ambiente) e centrifugada a 4.000 rpm durante 5 min. Para medir a absorbância, alíquotas de 100 µL foram retiradas, colocadas nos poços de placas de Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) e medidas com um comprimento de onda de 540 nm. A concentração de MDA foi determinada a partir de uma curva padrão, sendo os resultados expressos em µmol de MDA/g de tecidos.

A partir da mensuração dos níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARs), seguindo o método de Draper & Hadley [40], foi possível quantificar o grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais. Inicialmente uma curva-padrão de malonilaldeído (MDA) foi realizada. Com base na solução padrão de MDA (1 mg/mL) foi preparado 4mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de MDA foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Ainda, a cada tubo foi adicionado 0,1 mL de DTNB 0,01 M (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico) e feita a leitura da absorbância a 532 nm após 1 min da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de MDA.

Após a retirada do HC, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) em solução tampão de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Para dosagem de Nitrito, o homogeneizado foi centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min. Decorrido este tempo, foram coletados 100 µL do sobrenadante, os quais foram acrescidos a 100 µL do reagente de Griess modificado (0,04 g/mL) a temperatura ambiente por 10 min. Para medir a absorbância, alíquotas de 100 µL foram retiradas, colocadas nos poços de placas de Elisa e medidas com um

comprimento de onda de 570 nm. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub>, sendo os resultados expressos em µmol/g de tecidos.

A fim de realizar a dosagem dos níveis de nitrito no HC, inicialmente foi realizada uma curva padrão da seguinte forma: uma solução mãe (10 mM) foi preparada com 6,9 mg de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e dissolvidos em 10 mL de água destilada. Em seguida, foram feitas as diluições em série, ficando em: 1 - 1.000 µM, 2 - 100 µM, 3 - 50 µM, 4 - 25 µM, 5 - 12,5 µM, 6 - 6,25 µM, 7 - 3,12 µM e 8 - 1,56 µM. Após esse processo, foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações [41].

#### 2.4. Análise estatística

Os dados que apresentaram uma distribuição paramétrica foram analisados pelo teste ANOVA (análise de variância) de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (post hoc). Os dados que não apresentaram uma distribuição paramétrica foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Em todos os testes estatísticos (paramétricos e não paramétricos) o nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5 %). Valores de prova (p) ≤0,05 foram considerados significativos. Para todas as análises foi utilizado o software GraphPad Prism 6.0.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Estimativa da DL<sub>50</sub> e *Screening* Hipocrático

A busca por plantas medicinais que possuam atividade farmacológica tem crescido consideravelmente, com os avanços das ciências farmacêuticas e tecnologias de produção de fármacos. Em certos casos, o uso destes recursos é feito de maneira indiscriminada, justificada, principalmente, pela crença de que não fazem mal à saúde por serem naturais, gerando uma preocupação em torno do seu consumo, o que incentiva a realização de estudos voltados a avaliar a toxicidade, bem como o perfil farmacológico dessas substâncias sobre os sistemas biológicos, em especial sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) [42, 43]. Além de, a partir de uma revisão da literatura (dados não mostrados), ter sido evidenciado a carência de estudos que investigassem o potencial tóxico do composto  $\alpha$ -humuleno, uma vez que apenas um trabalho [44] foi encontrado.

Neste contexto, a toxicidade oral do  $\alpha$ -humuleno foi avaliada por meio da estimativa da DL<sub>50</sub>, e o perfil farmacológico do composto sobre os sistemas biológicos, por meio do

*Screening* Hipocrático proposto por Malone [29]. Os animais tratados com o  $\alpha$ -humuleno, via oral (v.o.), na dose de 5000 mg/kg nas primeiras quatro horas de avaliação, após o tratamento, não apresentaram alterações sugestivas de efeito depressor ou excitatório a nível de SNC. Nos demais dias de análises (até o 14º), não houveram alterações significativas na massa corporal, nem ocorrência de mortes, tanto no grupo salina, quanto no da substância testada. A avaliação macroscópica dos órgãos (cérebro, coração, pulmões, fígado, baços e rins) não revelaram nenhuma anormalidade. Podendo ser o  $\alpha$ -humuleno considerado seguro para o uso oral, com DL<sub>50</sub> superior a 5000 mg/kg.

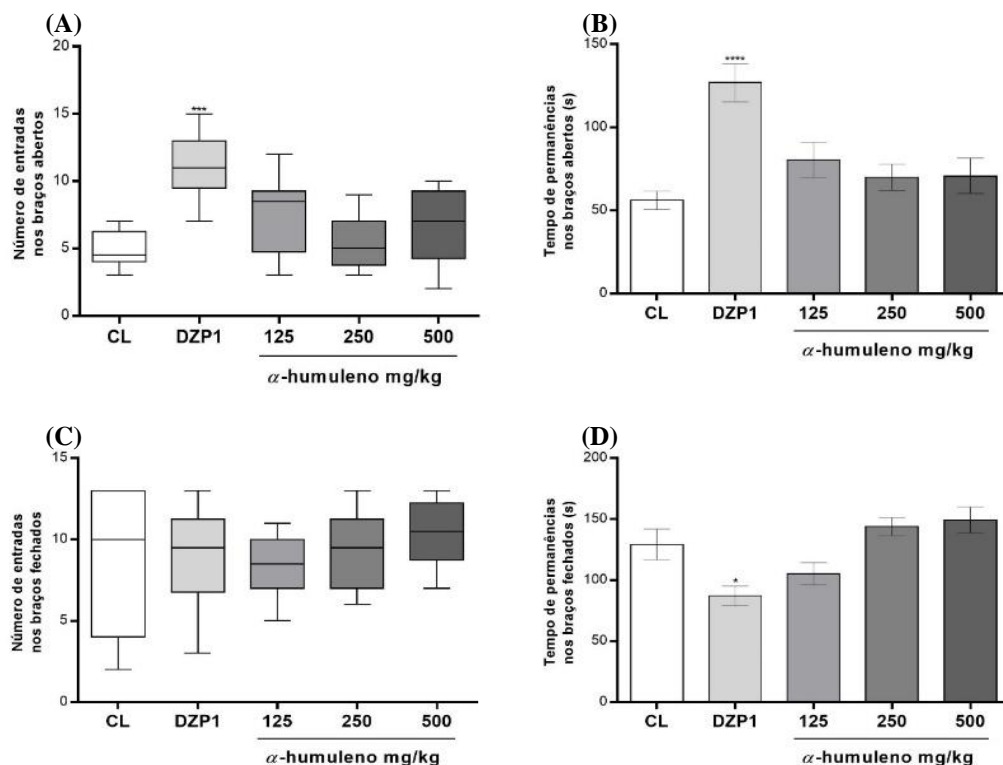
### 3.2. Protocolos experimentais

#### 3.2.1. Labirinto em Cruz Elevada

O teste de LCE é utilizado como protocolo inicial com a finalidade de identificar possíveis substâncias com atividade ansiolítica através da observação da movimentação exploratória dos animais. Este experimento sugere, também, um possível envolvimento da neurotransmissão GABAérgica, especificamente a relação com o receptor GABAA [45, 46].

Segundo o protocolo, ao serem colocados no labirinto, os animais naturalmente tendem a preferir os braços fechados, pois de forma fisiológica quando expostos a situações estressantes, sendo estas comparadas a um quadro de ansiedade, eles procuram locais fechados que lhe conferem segurança [33]; e substâncias consideradas ansiolíticas aumentam a preferência dos animais pelos braços abertos, aumentando o número de entrada neles, assim como o tempo de permanência nestes; em contrapartida, substâncias ansiogênicas diminuem o número de entrada nesses braços [46, 47].

Após realização deste protocolo, os resultados mostraram que não houve alterações estatisticamente significativas nos parâmetros observados (número de entrada nos braços abertos, tempo de permanência nos braços abertos, número de entrada nos braços fechados e tempo de permanência nos braços fechados) para os animais tratados com o  $\alpha$ -humuleno nas doses de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg e 500 mg/Kg quando comparados ao controle (figuras 1A a 1D). Já o grupo tratado com diazepam 1 mg/Kg apresentou a atividade ansiolítica, aumentando o NEBA em 128,57%, assim como o tempo de permanência nele em 126,61%, em comparação ao grupo salina (figuras 1A e 1B) (Tabelas 1 e 2).



**Figura 1.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre os parâmetros comportamentais dos camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

Os valores de (A) e (C) são expressos em mediana, mínimo e máximo. Os valores de (B) e (D) são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados de (A) e (C) foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Os dados de (B) e (D) foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Em todos os testes estatísticos, paramétricos e não paramétricos, o nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP1 = Diazepam (1 mg/kg, i.p.).

Como observado, o  $\alpha$ -humuleno não apresentou resultados estatisticamente significativos que o atribuíssem uma atividade do tipo ansiolítica-símile. Alguns estudos envolvendo compostos pertencentes a mesma classe do  $\alpha$ -humuleno evidenciaram que essas substâncias apresentavam potencial para tal atividade contra os transtornos de ansiedade; a exemplo pode-se destacar o (-)- $\alpha$ -bisabolol, o nerolidol, o bilobalide e o  $\beta$ -cariofileno, todos administrando por via intraperitoneal [48-52].

É importante ressaltar que a via de administração se caracteriza como influenciador direto para obtenção da ação da substância, comprometendo tanto o tempo de absorção quanto sua biodisponibilidade [53]. Um estudo realizado por Chaves e colaboradores [15], com o objetivo de avaliar a biodisponibilidade do sesquiterpeno alfa-humuleno após sua administração oral, mostrou que este apresentava seu pico de ação aos 15 minutos após

administração, com concentração plasmática quase que indetectável após 12 horas. Evidenciando uma meia vida muito curta de 16,8 minutos e biodisponibilidade de apenas 18%.

Este fator pode justificar a ausência da atividade ansiolítica-símile para substância utilizada em nosso estudo, visto que a administração aconteceu por via oral. E comparando com os outros compostos discutidos anteriormente, os quais tiveram sua administração por via intraperitoneal, subtende-se que eles não sofreram ação do mecanismo de primeira passagem, podendo isto, ter aumentado sua biodisponibilidade, bem como seu potencial efeito [48-54].

**Tabela 1.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o NEBA e NEBF no teste do LCE. (Coluna estatística - Apêndices 1 e 5; *Analyze* – Apêndices: 2 e 6).

GRUPOS (n=10)	Valores expressos em:	NEBA	NEBF
CL	Mediana	4,5	10
	Mínimo	3	2
	Máximo	7	13
DZP1	Mediana	11	9,5
	Mínimo	7	3
	Máximo	15	13
$\alpha$ -HUM 125	Mediana	8,5	8,5
	Mínimo	3	5
	Máximo	12	11
$\alpha$ -HUM 250	Mediana	5	9,5
	Mínimo	3	6
	Máximo	9	13
$\alpha$ -HUM 500	Mediana	7	10,5
	Mínimo	2	7
	Máximo	10	13

Os valores do NEBA e NEBF são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Em todos os testes estatísticos, paramétricos e não paramétricos, o nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP1 = Diazepam (1 mg/kg, i.p.).

**Tabela 2.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TPBA e TPBF no teste do LCE. (Coluna estatística - Apêndices 3 e 7; *Analyze* – Apêndices: 4 e 8).

GRUPOS (n=10)	TPBA	TPBF
CL	56 ± 5,6	129,3 ± 12,6
DZP1	126,9 ± 11,4	87,1 ± 8,1
$\alpha$ -HUM 125	80,4 ± 10,6	105,2 ± 9,1
$\alpha$ -HUM 250	70,1 ± 7,8	144 ± 7,5
$\alpha$ -HUM 500	70,8 ± 10,6	149,3 ± 10,6

Os valores do TPBA e TPBF são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnett*. Em todos os testes estatísticos, paramétricos e não paramétricos, o nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP1 = Diazepam (1 mg/kg, i.p.).

### 3.2.2. Campo Aberto

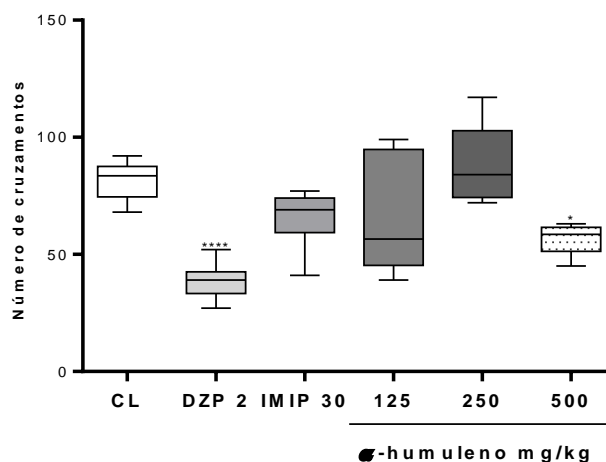
O protocolo do CA caracteriza-se por um experimento que tem por objetivo observar o comportamento exploratório do animal [35, 47]. Foi proposto inicialmente por Hall em 1934 [55] sob a perspectiva de avaliar padrões emocionais de animais (em grande maioria roedores) frente a uma situação de exposição a um ambiente desconhecido sem que haja possibilidade de fuga [56, 57].

Consiste em um método de fácil aplicação, utilizado frequentemente com a perspectiva de realizar uma triagem de substâncias para atividades sobre o SNC, pois possibilita uma visão geral dos possíveis efeitos farmacológicos desta. Pode também ser empregado, em menor quantidade, para investigar potencial atividade ansiolítica de alguns produtos [57, 58].

Durante a realização do experimento, além da atividade locomotora que é avaliada por meio do parâmetro número de cruzamentos (NC); também são observados o número de rearing (NR), mecanismo de se levantar do animal que demonstra a capacidade exploratória; e o número do de grooming (NG), ou autolimpeza. Este último pode auxiliar na determinação de respostas depressoras ou excitatórias, podendo sugerir substâncias do tipo ansiolíticas ou sedativas [57, 59, 60].

Após administração oral das substâncias utilizadas no experimento (Salina,  $\alpha$ -humuleno, diazepam 2 mg/kg e imipramina 30 mg/kg), ao avaliar o NC (figura 2), foi possível observar que as doses de 125 e 250 mg/kg da substância teste não apresentaram alterações estatisticamente significativas na locomoção do animal quando comparado ao controle salina. Já a dose de 500 mg/kg diminuiu em 30,92% o NC quando comparado ao controle. O diazepam 2 mg/kg, agiu diminuindo em 52,76% o NC, quando comparado ao controle salina (Tabela 3).

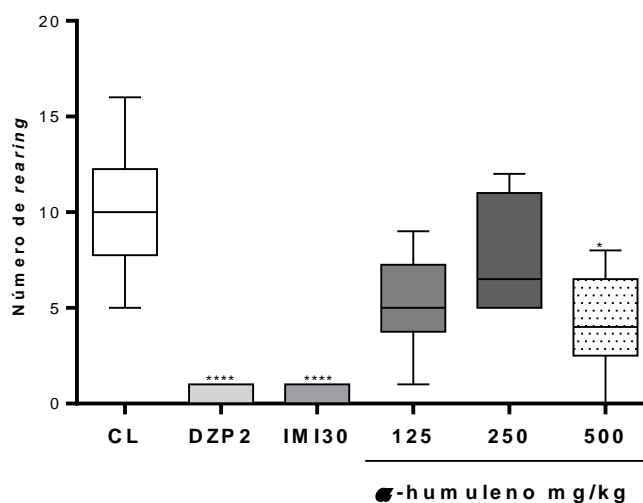




**Figura 2.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o NC no teste do Campo Aberto.

Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*.. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina, \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP 2 = Diazepam 2 mg/kg (i.p.), IMIP 30 = imipramina 30 mg/kg (i.p.).

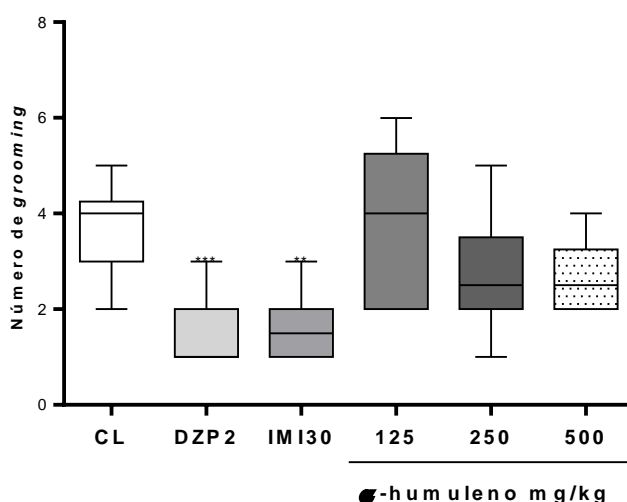
Se tratando do NR (figura 3) os resultados mostraram que não houve alterações estatisticamente significativas para determinar se o  $\alpha$ -humuleno é caracterizado como uma substância estimulante ou sedativa no protocolo do CA com administração por via oral, quando comparado ao controle salina, nas doses de 125 mg/kg e 250 mg/kg. No entanto a dose maior da substância teste, 500 mg/kg, apresentou uma diminuição de 58% desse parâmetro, em comparação ao controle salina, semelhante ao que ocorreu a variável NC, mostrando que o  $\alpha$ -humuleno pode apresentar características sedativas a maneira que a dose aumenta. Quanto ao diazepam 2 mg/kg, ele reduzindo em 97% o NR, e a imipramina diminuiu este parâmetro em 96%, quando comparado ao controle.



### Figura 3. Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NR no teste do Campo Aberto.

Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*.. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina, \* =  $p < 0,05$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP2 = Diazepam 2 mg/kg (i.p.), IMIP 30 = imipramina 30 mg/kg (i.p.).

Sobre o NG (figura 4), foi possível observar que o  $\alpha$ -humuleno em todas as doses testadas (125, 250 e 500 mg/kg) não apresentou resultados estatisticamente significativos quando comparados ao controle salina. Os grupos diazepam 2 mg/kg e imipramina 30 mg/kg reduziram esse comportamento em 62,16% e 56,76%, respectivamente, em relação ao grupo salina.



### Figura 4. Efeito do $\alpha$ -humuleno sobre o NG no teste do Campo Aberto.

Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*.. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP2 = Diazepam 2 mg/kg (i.p.), IMIP 30 = imipramina 30 mg/kg (i.p.).

Substâncias estimulantes tendem a aumentar a locomoção geral (NC), bem como a exploração vertical (NR), e substâncias sedativas agem diminuindo estas características. Alterações dos três parâmetros avaliados (NC; NR e NG) podem sugerir se a substância pesquisada tende a ser excitatória ou sedativa [57, 61].

Como observado, o  $\alpha$ -humuleno não foi capaz de produzir alterações comportamentais que sugerissem ele como uma substância com potencial ansiolítico-símile ou sedativo nas doses de 125 e 250 mg/kg. No entanto, ao avaliar o número de cruzamento e de *rearing* dos animais

tratados com a maior dose (500 mg/kg) destaca-se a possibilidade de que à medida que a dose aumenta, o  $\alpha$ -humuleno pode apresentar características do tipo sedativa.

Outras substâncias pertencentes a mesma classe do  $\alpha$ -humuleno (sesquiterpenos), quando estudados no teste do CA apresentaram as mais diversas atividades, desde substâncias com características depressoras [52], até aquelas que agiam como ansiolíticas [48-51]. Bahi e colaboradores [48], ainda destaca que ao trabalhar com o  $\beta$ -cariofileno, este apresentou potencial ansiolítico, no entanto sem alterar a atividade locomotora dos animais. No presente estudo, apesar de não ser apresentada atividade do tipo ansiolítica-símile, o composto  $\alpha$ -humuleno agiu de maneira semelhante ao  $\beta$ -cariofileno, não provocando, também, alterações comportamentais, em suas menores doses (125 e 250 mg/kg), nos animais.

**Tabela 3.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o NC, NR e NG no teste do Campo Aberto. (Coluna estatística - Apêndices 9, 11 e 13; *Analyze* – Apêndices: 10, 12 e 14).

GRUPOS (n=10)		Valores expressos em:		
		NC	NR	NG
<b>CL</b>	Mediana	83,5	10	4
	Mínimo	68	5	2
	Máximo	92	16	5
<b>DZP2</b>	Mediana	39	0	1
	Mínimo	27	0	1
	Máximo	52	1	3
<b>IMIP30</b>	Mediana	69	0	1,5
	Mínimo	41	0	1
	Máximo	77	1	3
<b><math>\alpha</math>-HUM 125</b>	Mediana	56,5	5	4
	Mínimo	39	1	2
	Máximo	99	9	6
<b><math>\alpha</math>-HUM 250</b>	Mediana	84	6,5	2,5
	Mínimo	72	5	1
	Máximo	117	12	5
<b><math>\alpha</math>-HUM 500</b>	Mediana	58,5	4	2,5
	Mínimo	45	0	2
	Máximo	63	8	4

Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*.. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP2 = Diazepam 2 mg/kg (i.p.), IMIP 30 = imipramina 30 mg/kg (i.p.).

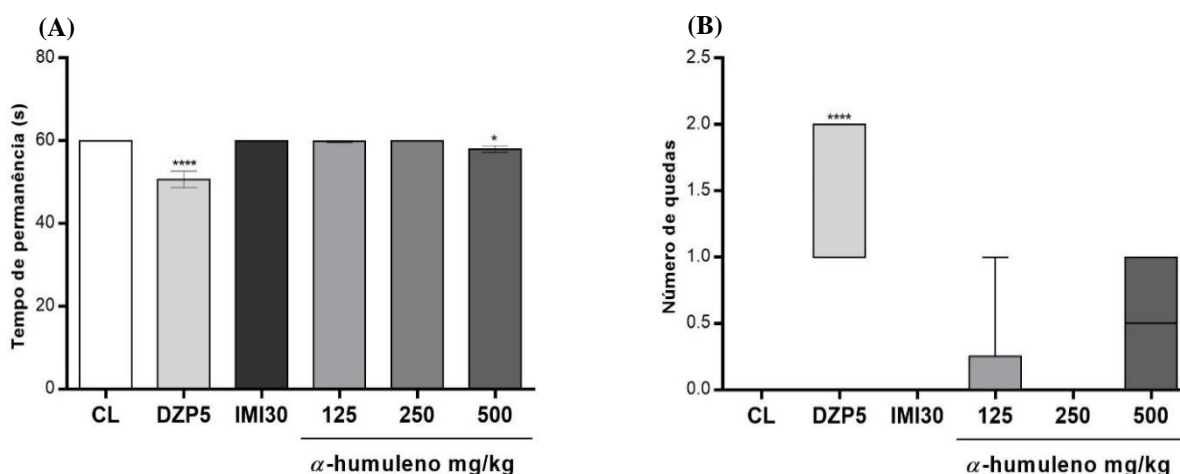
Esta característica é importante do ponto de vista deste composto ter apresentado potencial antidepressivo-símile no TNF (dados mostrados posteriormente). Uma vez que, observando o comportamento dos fármacos utilizados como controles positivos (diazepam e

imipramina), principalmente a imipramina 30 mg/kg, ressalta-se que a resposta dessa substância reduzindo os parâmetros observados no CA é devido a suas propriedades farmacológicas; mais especificamente a sua ligação aos receptores histaminérgicos do tipo 1 de modo a bloqueá-los, causando sedação, característica de seus efeitos colaterais [62]. E para tanto, o  $\alpha$ -humuleno, por não alterar a capacidade locomotora e exploratório do animal nas doses de 125 e 250 mg/kg, apresenta-se como substância importante sob a óptica da busca por novas alternativas, que apresentem menos efeitos colaterais, contra a depressão.

### 3.2.3. Rota Rod

O teste *rota rod* é amplamente utilizado para avaliar a coordenação motora, efeito miorelaxante ou equilíbrio dos animais submetidos a um tratamento. Nas fases iniciais dos estudos pré-clínicos ele é bastante difundido com a finalidade de identificar possíveis efeitos adversos motores das substâncias testadas nos experimentos [36, 62-67].

Os resultados do nosso experimento (figura 5) mostraram que o  $\alpha$ -humuleno, em duas doses testadas no experimento do RR (125, 250 mg/kg), não produziram alterações estatisticamente significativas nos dois parâmetros observados (Tempo de permanência - Figura 5A; e número de quedas - Figura 5B), quando comparado ao grupo controle tratado com salina. A dose de 500 mg/kg da substância teste, no parâmetro do tempo de permanência, apresentou diminuição desse parâmetro (3,33%) quando comparado ao grupo salina, mas não apresentou resultados estatisticamente significantes para o número de quedas (Tabelas 4 e 5).



**Figura. 5.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre no teste do *Rota rod*.

Os valores do tempo de permanência (TI) (7A) são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Os valores do número de quedas (NQ) (7B) são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados de (NQ) foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo

teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Os dados de (TP) foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina. CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP 5 = Diazepam 5 mg/kg (i.p.), IMP30 = Imipramina 30 mg/kg.

**Tabela 4.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o NQ no teste do *Rota rod*. (Coluna estatística - Apêndice 15; *Analyze* – Apêndices: 16).

GRUPOS (n=10)		Valores expressos em:	NQ
CL	Mediana		0
	Mínimo		0
	Máximo		0
DZP5	Mediana		1
	Mínimo		1
	Máximo		2
IMIP30	Mediana		0
	Mínimo		0
	Máximo		0
$\alpha$ -HUM 125	Mediana		0
	Mínimo		0
	Máximo		1
$\alpha$ -HUM 250	Mediana		0
	Mínimo		0
	Máximo		0
$\alpha$ -HUM 500	Mediana		0,5
	Mínimo		0
	Máximo		1

Os valores do número de quedas (NQ) (7B) são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados de (NQ) foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina. CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP 5 = Diazepam 5 mg/kg (i.p.), IMP30 = Imipramina 30 mg/kg.

**Tabela 5.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TPBG no teste do *Rota*. (Coluna estatística - Apêndice 17; *Analyze* – Apêndice: 18).

GRUPOS (n=10)	TPBG
CL	60 ± 0
DZP5	50,7 ± 1,9
IMIP30	6 ± 0
$\alpha$ -HUM 125	59,8 ± 0,2
$\alpha$ -HUM 250	60 ± 0
$\alpha$ -HUM 500	58 ± 0,8

Os valores do tempo de permanência (TI) (7A) são expressos em média ± E.P.M. (erro padrão da média). Os dados de (TP) foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de

0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina. CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), DZP 5 = Diazepam 5 mg/kg (i.p.), IMP30 = Imipramina 30 mg/kg.

Na literatura, não foram encontrados estudos que justificassem os resultados expressos nesse teste. No entanto, os dados obtidos a partir deste protocolo nos levam a crer que o  $\alpha$ -humuleno não compromete a função motora do animal. Relacionado a alteração apresentada por sua maior dose (500 mg/kg), esta pode ser decorrente do possível efeito sedativo evidenciado no CA, visto que no momento que a dose aumentou os animais demonstravam características de sedação.

Estes dados, para tanto, em conjunto com os obtidos a partir do campo aberto trouxeram segurança para realização do protocolo do nado forçado, pois considerando que este teste baseia-se em uma resposta motora do animal (mecanismo de natação), substâncias que comprometem esta função podem estar agindo mascarando os resultados, assim como compostos estimulantes podem sugerir resultados falso-positivos [68, 69].

#### 3.2.4. Teste do Nado Forçado

A depressão é considerada um transtorno de grande prevalência em todo mundo. Não se trata apenas de uma denominação para o sentimento de tristeza, conforme, erroneamente, costuma ser utilizado. Ela vai muito além de simples flutuações corriqueiras de humor, bem como de respostas emocionais a fatores e momentos estressantes de curta duração; sendo definida como um desarranjo mental marcado por uma tristeza que não é passageira e que pode levar a incapacidades. A OMS estima que mais de 300 milhões de pessoas no mundo sofrem com este grave problema de saúde [70-73].

Os modelos animais são amplamente utilizados na área da psiquiatria tanto para pesquisas pré-clínicas, na busca de tratamentos alternativos na área da psicofarmacologia, quanto para pesquisas clínicas; mostrando-se de grande importância tendo em vista a possibilidade de uma melhor compreensão dos transtornos psiquiátricos [74-77].

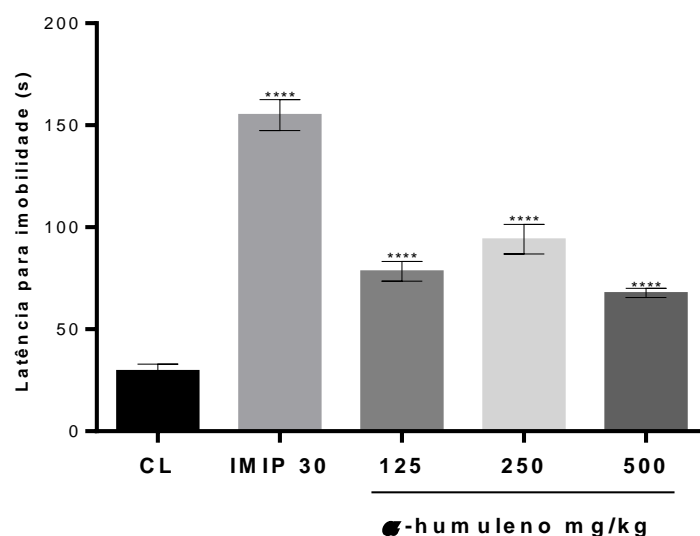
Esses modelos objetivam mimetizar quadros psicopatológicos e a partir disto aumentar o entendimento sobre a fisiopatologia dos transtornos mentais, bem como o desenvolvimento de novos caminhos para o tratamento destes problemas de saúde. No entanto, os receios existentes quanto sua aplicabilidade e eficácia frente a doenças em seres humanos, ainda é bastante frequente, pois o desenvolvimento de um modelo que simule completamente um quadro específico ainda não é possível, principalmente quando se trata de transtornos como

manifestações tão subjetivas. No entanto, vale ressaltar que eles apresentam validade científica, uma vez que os perfis de resposta terapêutica desses seres vivos possuem semelhanças com o humano [77, 78].

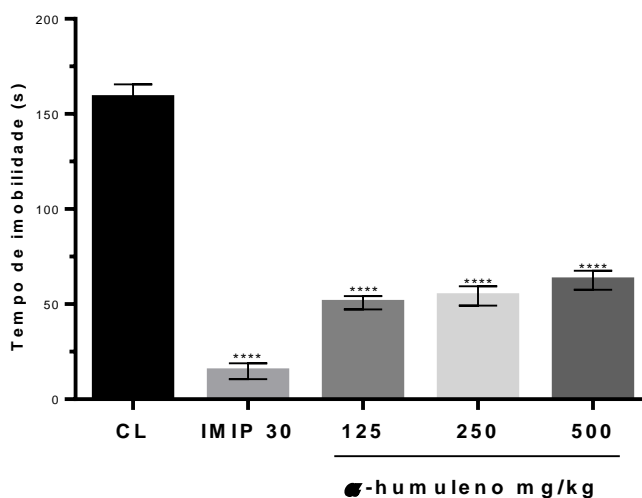
Dessa forma, os protocolos experimentais para depressão com animais, compreendem processos agudos ou crônicos aos quais os animais são expostos, a fim de ocasionar a sintomatologia do transtorno. O mais utilizado, teste do nado forçado, permite identificar a atividade dos antidepressivos tricíclicos e certa eficácia, mesmo, ainda, necessitando de aperfeiçoamento para identificação dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina [76, 77, 79].

Ele foi descrito inicialmente por Porsolt, LePichon e Jalfre [79], e consiste na observação de ratos ou camundongos em cilindros transparentes, preenchido com água, que não permitem a fuga destes animais. Durante o experimento, após um período de tentativa de fuga, os animais tendem a ficar imóveis; comportamento retratado como desamparo aprendido, pois sugere-se que o animal literalmente aprenda que nenhum comportamento que ele expresse irá alterar ou controlar as mudanças no ambiente [80, 81]. No geral, os antidepressivos tendem a aumentar o tempo de tentativa de fuga, ou nado, desses animais, diminuindo o tempo de imobilidade; sendo assim, substâncias que possuam esta atividade podem insinuar uma possível atividade antidepressiva [79, 82].

A figura 6 mostra o efeito das diferentes doses do  $\alpha$ -humuleno no teste do Nado Forçado quanto a latência para a imobilidade (LPI). A análise estatística mostrou que nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg o  $\alpha$ -humuleno demonstrou um aumento estatisticamente significativo da LPI em 264,86%, 317,91% e 229,05%, respectivamente, quando comparado ao controle salina. Quando observado o efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o parâmetro de tempo de imobilidade (TI) do animal (figura 7), os resultados evidenciaram valores, também, estatisticamente significativos, visto que o  $\alpha$ -humuleno em todas as suas doses (125, 250 e 500 mg/kg) apresentou uma redução de 67,99%, 65,72% e 60,48%, respectivamente, demonstrando um possível efeito antidepressivo-símile. O tratamento com a imipramina (30 mg/kg) foi eficaz, tanto na LPI como no TI, pois aumentou a LPI em 523,65%, e reduziu em 90,72% o TI do animal durante o experimento, quando comparado com os animais tratados com o controle salina (Tabela 6).



**Figura 6.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno em camundongos submetidos ao teste do nado forçado. Os valores são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), IMIP 30 = Imipramina 30 mg/kg (i.p.).



**Figura 7.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno em camundongos submetidos ao teste do nado forçado. Os valores são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), IMIP 30 = Imipramina 30 mg/kg (i.p.).



**Tabela 6.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre a LPI e TI no TNF. (Coluna estatística - Apêndices 19 e 21; *Analyze* – Apêndices: 20 e 22).

GRUPOS (n=10)	LPI	TI
CL	29,6 ± 3,3	158,4 ± 7,1
IMIP30	155 ± 7,5	14,7 ± 4,2
$\alpha$ -HUM 125	78,4 ± 4,8	50,7 ± 3,5
$\alpha$ -HUM 250	94,1 ± 7,3	54,3 ± 5,1
$\alpha$ -HUM 500	67,8 ± 2,3	62,6 ± 5,1

Os valores são expressos em média ± E.P.M. (erro padrão da média). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA (análise de variância) de uma via pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , CL = Controle (salina - solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), IMIP 30 = Imipramina 30 mg/kg (i.p.).

O composto  $\alpha$ -humuleno, utilizado no presente estudo, caracteriza-se como um terpenoide da classe dos sesquiterpenos, por possuir três unidades de isopreno, com fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$  [15, 83, 84]. Os compostos terpênicos, ou terpenoides, são constituintes químicos importantes de diversos produtos naturais por possuírem significativa atividade de defesa direta para as plantas contra herbívoros [85-89]. Ainda sobre os potenciais efeitos medicinais dos terpenoides, vale destacar que plantas que possuem esses compostos têm tido grande utilização na medicina tradicional para o tratamento de condições que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) [11, 90-93]. Caracterizando, portanto, eles como um importante grupo de metabólitos com potencial ação sobre o SNC, com destaque para ações do tipo sedativa [94], anticonvulsivante [95, 96] e antidepressiva [11, 96-98].

Destacando especificamente a classe dos sesquiterpenos, é importante ressaltar que este grupo compreende uma importante classe de substâncias por possuírem diversas atividades biológicas, das quais podem-se destacar: atividade citoprotetora gástrica [99]; ação no tratamento de doenças cardiovasculares [100]; citotoxicidade contra células cancerígenas [101-103]; atividade antifúngica [104]; atividade ansiolítica [50]; anticonvulsivante [105]; e atividade antidepressiva [48].

A respeito das atividades previamente estudadas do  $\alpha$ -humuleno, sesquiterpeno utilizado neste estudo, evidencia-se que este composto tem se mostrado uma substância promissora para finalidades medicinais. Estudos demonstraram resultados significantes para o  $\alpha$ -humuleno concernente a efeitos do tipo anticancerígeno [106-108]; anti-inflamatório [18, 109, 110]; antibacteriano [111, 112]; atividade gastroprotetora [113]; atividade antifúngica [114]; e potencial cicatrizante [115].

No que concerne as ações sobre o SNC, a nível de classe, alguns estudos demonstraram um importante potencial antidepressor para o grupo dos sesquiterpenos [19, 48]. Uma pesquisa envolvendo o  $\beta$ -cariofileno (isômero do  $\alpha$ -humuleno) demonstrou que o composto possuía uma possível ação antidepressiva, quando comparado ao controle salina utilizado no experimento, pois ele conseguiu reduzir o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado nas doses de 50, 70 e 100 mg/kg [116]. Estes dados corroboram com os achados no presente estudo, onde o  $\alpha$ -humuleno também reduziu o tempo de imobilidade no TNF de forma significativa.

Destacando outro parâmetro observado no TNF, referente a latência para imobilidade, semelhante ao estudo de Oliveira [116] em certo momento, a medida que as doses vão aumentando a resposta tende a diminuir, como observado com a dose de 140 mg/kg utilizada no estudo deste pesquisador, não mostrando assim diferença significativa quando comparado ao controle. De maneira similar, ocorreu no presente estudo onde a resposta da dose de 500 mg/kg (figura 8) foi menor, comparada as outras; no entanto ainda apresentou um resultado estatisticamente significativo em comparação ao controle salina.

A psicofarmacologia com antidepressivos, a partir da década de 50, trouxe grandes avanços para terapia do transtorno depressivo tornando viável o tratamento deste problema; bem como o entendimento dos possíveis mecanismos da fisiopatologia da depressão. A primeira classe desenvolvida foram os antidepressivos tricíclicos (ADT), seguidos dos inibidores da monoaminoxidase (IMAOs), no entanto, por falta de seletividade referente aos receptores pelos quais agiam, apesar de serem medicamentos bastante eficazes, possuíam efeitos colaterais extremamente indesejáveis [7].

Posteriormente foram desenvolvidas outras classes objetivando diminuir os efeitos colaterais, porém ainda trata-se de um campo difícil para meios específicos visto que, além de se tratar de um área com explicações incompletas quanto ao mecanismo da fisiopatologia, consiste também em tratamentos que demandam certo tempo (de 2 a 4 semanas) para entregar uma resposta clínica [7].

A imipramina, utilizada como controle positivo neste estudo, pertence a classe dos ADT, mais especificamente do grupo das aminas terciárias. Esta classe de medicamentos age impedindo a recaptação pré-sináptica das monoaminas de maneira não seletiva, este mecanismo é responsável por seu efeito terapêutico sobre a depressão. No entanto, este medicamento, bem como sua classe, também age com atividade pós-sináptica (bloqueando receptores muscarínicos, histaminérgicos,  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos) característica que pode ser responsável por

seus efeitos colaterais. O bloqueio dos receptores histaminérgicos pode estar relacionado aos efeitos colaterais do tipo sonolência e sedação [7].

### 3.2.5. Acinesia Induzida por Reserpina (AIR)

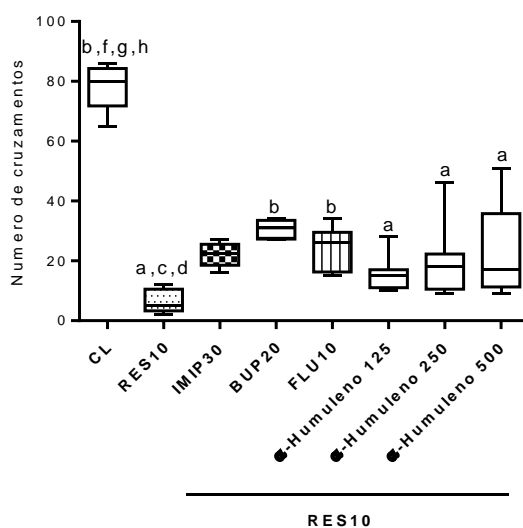
A reserpina, um alcaloide isolado da espécie *Rauwolfia serpentina*, caracteriza-se como uma substância capaz de causar depressão e hipotensão, sendo inicialmente utilizada na indústria farmacêutica como anti-hipertensivo e antipsicótico. Ela age de maneira inibitória do transporte vesicular de monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina) no sistema nervoso central, se ligando com alta afinidade ao transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2) e impedindo o armazenamento destas nas vesículas e posterior liberação na fenda sináptica; diminuindo assim seus níveis no SNC [117-121].

Devido a este mecanismo, nos pacientes que à utilizavam para o tratamento da hipertensão foram observadas características letárgicas e depressoras, fazendo então relação do envolvimento do sistema monoaminérgico com a origem dos distúrbios afetivos [119, 122].

Na atualidade, seu uso foi descontinuado devido seus efeitos colaterais: hipolocomoção (acinesia), rigidez muscular transitória e discinesias (movimentos involuntários) [123, 124]. No entanto, após comprovado seu potencial a nível de monoaminas, seu uso tem sido bastante difundido dentro de modelos animais com fins experimentais voltados a investigar potenciais substâncias para depressão, levando em consideração a teoria monoaminérgica do transtorno depressivo [117, 125-128].

Na figura 8 é possível observar uma redução de 91,81% do número de cruzamentos no que recebeu Reserpina (10 mg/kg), em comparação com o grupo salina. Essa atividade da Reserpina foi revertida com a administração da imipramina em 28,2%, com a bupropiona em 39,1% e com a fluoxetina em 30,7%. Relativo as doses do  $\alpha$ -humuleno (125, 250 e 500 mg/kg), a substância não apresentou resultados estatisticamente significativos de reversão da atividade da Reserpina com o protocolo de tratamento agudo (Tabela 7).

### Acinesia induzida por Reserpina



**Figura 8.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno em camundongos submetidos ao teste de AIR.

Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*.. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), RES10 = Reserpina 10 mg/kg (i.p.), IMIP30 = imipramina 30 mg/kg (i.p.), BUP20 = Bupropiona 20 mg/kg (i.p.), FLU10 = Fluoxetina 10 mg/kg (i.p.).

**Tabela 7.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o NC no teste de AIR.  
(Coluna estatística – Apêndice 23; *Analyze* – Apêndice 24).

GRUPOS (n=10)	Valores expressos em:	NC
CL	Mediana	80
	Mínimo	65
	Máximo	86
RES10	Mediana	5
	Mínimo	2
	Máximo	12
IMIP30	Mediana	22,5
	Mínimo	16
	Máximo	27
BUP20	Mediana	31
	Mínimo	27
	Máximo	34
FLU10	Mediana	26
	Mínimo	15
	Máximo	34
$\alpha$ -HUM 125	Mediana	15
	Mínimo	10

<b><math>\alpha</math>-HUM 250</b>	Máximo	28
	Mediana	18
	Mínimo	9
	Máximo	46
<b><math>\alpha</math>-HUM 500</b>	Mediana	17
	Mínimo	9
	Máximo	51

Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*.. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05 (5%). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos quando comparados ao grupo controle salina, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%; 0,1 mL/10 g, v.o.), RES10 = Reserpina 10 mg/kg (i.p.), IMIP30 = imipramina 30 mg/kg (i.p.), BUP20 = Bupropiona 20 mg/kg (i.p.), FLU10 = Fluoxetina 10 mg/kg (i.p.).

A reserpina consegue mimetizar padrões comportamentais que sugerem um quadro de depressão através da diminuição das reservas de monoaminas [129-133]. Este mecanismo causa sintomas, como a ptose palpebral, hipotermia e rigidez muscular [134, 135] que são consideravelmente revertidos por antidepressivos tricíclicos e inibidores da MAO [136]. No presente trabalho foi ressaltado esta definição, uma vez que os efeitos da reserpina foram revertidos após administração dos antidepressivos imipramina, bupropiona e fluoxetina.

Neste sentido, este protocolo foi realizado sob a perspectiva de investigar o possível envolvimento do sistema monoaminérgico na potencial atividade antidepressiva (símile) do  $\alpha$ -humuleno. No entanto, apesar de existir ligeira reversão dos efeitos da reserpina pelo do  $\alpha$ -humuleno, estatisticamente não houve significância quando realizada a comparação entre ele e os demais antidepressivos utilizados no experimento, o que expressa a necessidade do desenvolvimento de mais protocolos a fim de definir o real mecanismo pelo qual o composto possa estar agindo

Quanto as doses do sesquiterpeno, também não houve diferença estatística entre elas. Portanto, para os protocolos subsequentes foi utilizada a menor dose (125 mg/kg) sob o pressuposto da necessidade do desenvolvimento de substâncias que em baixas doses evidenciem atividades significantes, a fim de desenvolver menos efeitos colaterais [137, 138].

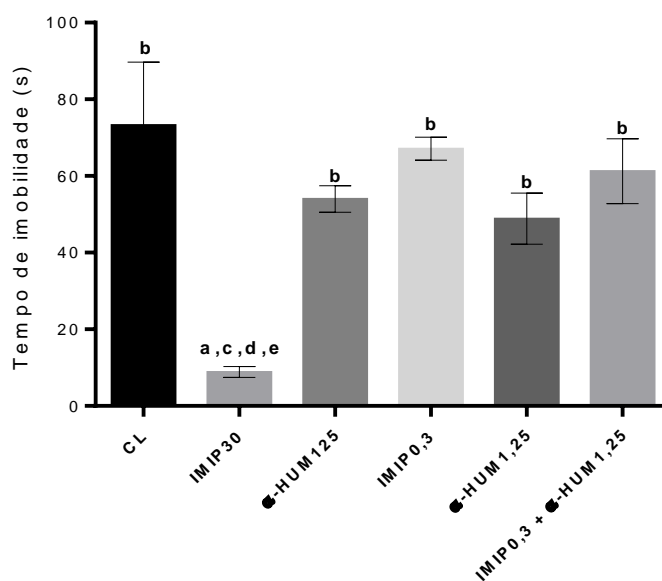
### 3.2.6. Teste de Potencialização

Com o objetivo de elucidar os potenciais mecanismos da atividade (símile) antidepressiva apresentada pelo  $\alpha$ -humuleno no Teste do Nado Forçado, foi realizado o teste de potencialização. Neste, uma dose subativa (1,25 mg/kg, v.o.) do composto foi administrada nos camundongos em associação com doses subterapêuticas (dez vezes menor que a dose utilizada como padrão para o experimento) de antidepressivos (0,3 mg/kg, 0,2 mg/kg e 0,1 mg/kg, para

imipramina, fluoxetina e bupropiona, respectivamente, i.p.). Após tratamento, foi avaliado no teste do nado forçado o parâmetro de TI.

Justifica-se a utilização dos antidepressivos imipramina, fluoxetina e bupropiona por estes agirem por vias diferentes que influenciam na disponibilidade de neurotransmissores. Logo, seria possível identificar se o  $\alpha$ -humuleno estaria agindo a nível de monoaminas, por qual via, e até mesmo se este poderia agir com mais de um mecanismo.

Ao analisar o TI no TNF (Figura 9) evidencia-se que a imipramina (30 mg/kg) e o  $\alpha$ -humuleno (125 mg/kg) reduziram este parâmetro em 87,9% e 26,3%, respectivamente quando comparados ao controle salina. E suas doses subterapêuticas reduziram em 8,4% para imipramina (0,3 mg/kg) e 33,3% para o  $\alpha$ -humuleno (1,25 mg/kg), quando comparado ao controle salina. No entanto, não foi obtido resultados estatisticamente significativos com a combinação entre o  $\alpha$ -humuleno e a imipramina (Tabela 8).



**Figura 9.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o TI no teste de Potencialização com Imipramina.

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d” e “e” vs CL, IMIP30,  $\alpha$ -HUM125, IMIP0,3 e  $\alpha$ -HUM1,25, respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), IMIP30 = Imipramina 30 mg/Kg,  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg, IMIP0,3 = Imipramina 0,3 mg/Kg;  $\alpha$ -HUM1,25 =  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; IMIP0,3 +  $\alpha$ -HUM1,25 = Imipramina 0,3 mg/Kg +  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg TI = Tempo de Imobilidade.

**Tabela 8.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TI no teste de Potencialização com Imipramina.

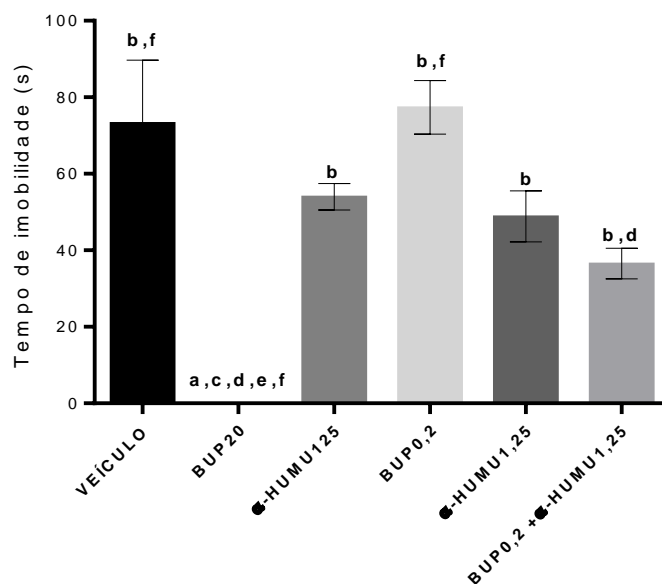
(Coluna estatística - Apêndice 25; *Analyze* – Apêndice 26).

GRUPOS (n=10)	TI
CL	73,3 ± 16,5
IMIP30	8,9 ± 1,5
$\alpha$ -HUM 125	54 ± 3,4
IMIP0,3	67,1 ± 2,9
$\alpha$ -HUM 1,25	48,9 ± 6,7
IMIP0,3 + $\alpha$ -HUM 1,25	61,3 ± 8,5

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d” e “e” vs CL, IMIP30,  $\alpha$ -HUM125, IMIP0,3 e  $\alpha$ -HUM1,25, respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), IMIP30 = Imipramina 30 mg/Kg,  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg, IMIP0,3 = Imipramina 0,3 mg/Kg;  $\alpha$ -HUM1,25 =  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; IMIP0,3 +  $\alpha$ -HUM1,25 = Imipramina 0,3 mg/Kg +  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg TI = Tempo de Imobilidade.

Estes resultados sugerem que possivelmente o  $\alpha$ -humuleno não age de maneira semelhante a imipramina. Como já destacado anteriormente, ela tem seu efeito sobre a inibição, de maneira não seletiva, da recaptção de monoaminas, sendo, portanto, considerado um antidepressivo tricíclico (ADT). A nível pré-sináptico esta classe age bloqueando a recaptção das monoaminas, preferencialmente NE e 5-HT e com menor frequência dopamina (DA). A atividade pós-sináptica está, majoritariamente, ligada a ocorrência de seus efeitos colaterais, que acontecem por bloqueio de receptores muscarínicos, histaminérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos, de serotonina e com menor intensidade os de dopamina [7].

Referente a potencialização da bupropiona, os resultados mostraram que este medicamento (BUP 20 mg/kg), o  $\alpha$ -humuleno (125 mg/kg) e sua dose subterapêutica (1,25 mg/kg) reduziram em 100%, 26,3% e 33,3%, respectivamente, o TI dos animais no TNF quando comparado ao controle salina. No entanto, quando observada a dose subterapêutica da bupropiona (0,2 mg/kg), um aumento de 5,7% do TI foi evidenciado, quando comparado ao grupo salina. Sobre a associação das doses subterapêuticas da bupropiona e do  $\alpha$ -humuleno (0,2 mg/kg + 1,25 mg/kg), uma redução do TI de 50,2 % foi demonstrada, quando compara ao grupo controle salina (Figura 10) (Tabela 9).



**Figura 10.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o TI no teste de Potencialização com Bupropiona.

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” vs CL, BUP20,  $\alpha$ -HUM125, BUP0,2,  $\alpha$ -HUM1,25 e BUP0,2 +  $\alpha$ -HUM1,25 respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), BUP20 = Bupropiona 20 mg/Kg,  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg, BUP0,2 = Bupropiona 0,2 mg/Kg;  $\alpha$ -HUM1,25 =  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; BUP0,2 +  $\alpha$ -HUM1,25 = Bupropiona 0,2 mg/Kg +  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; TI = Tempo de Imobilidade.

**Tabela 9.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TI no teste de Potencialização com Bupropiona.

(Coluna estatística - Apêndice 27; *Analyze* – Apêndice 28).

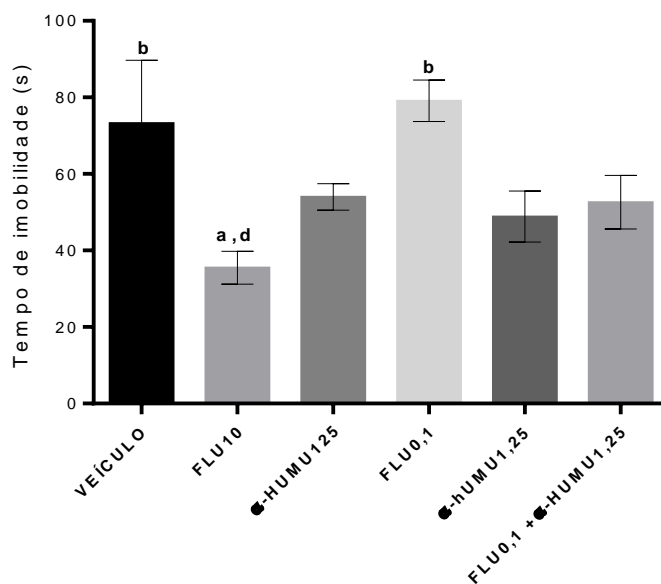
GRUPOS (n=10)	TI
CL	73,3 $\pm$ 16,5
BUP20	0 $\pm$ 0
$\alpha$ -HUM 125	54 $\pm$ 3,4
BUP0,2	77,4 $\pm$ 7
$\alpha$ -HUM 1,25	48,9 $\pm$ 6,7
BUP0,2 + $\alpha$ -HUM 1,25	36,5 $\pm$ 4

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um  $n = 10$  animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” vs CL, BUP20,  $\alpha$ -HUM125, BUP0,2,  $\alpha$ -HUM1,25 e BUP0,2 +  $\alpha$ -HUM1,25 respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), BUP20 = Bupropiona 20 mg/Kg,  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg, BUP0,2 = Bupropiona 0,2 mg/Kg;  $\alpha$ -HUM1,25 =  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; BUP0,2 +  $\alpha$ -HUM1,25 = Bupropiona 0,2 mg/Kg +  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; TI = Tempo de Imobilidade.



A bupropiona age sobre as monoaminas DA e NE, sendo considerado um Inibidor Seletivo da Recaptação de Dopamina (ISRD). Ela apresenta menos efeitos colaterais que os antidepressivos de nova geração, possivelmente por sua pouca aplicabilidade sobre o sistema serotoninérgico, receptores histamínicos e colinérgicos, além de não inibir a MAO. Este medicamento age aumentando os níveis sinápticos de dopamina e NE [7, 139, 140]. No entanto os resultados da associação das doses subterapêuticas do  $\alpha$ -humuleno e deste antidepressivo não foram estatisticamente significativos, não sendo suficientes para determinar se o composto estaria agindo de maneira semelhante a bupropiona.

E quando avaliado a potencialização do antidepressivo fluoxetina, os resultados mostraram uma redução do TI em 51,5%, 26,3% e 33,3%, para a fluoxetina (10 mg/kg),  $\alpha$ -humuleno (125 mg/kg) e  $\alpha$ -humuleno (1,25 mg/kg), respectivamente, quando comparados ao grupo controle salina. A dose subterapêutica da fluoxetina aumentou o TI em 8% quando comparado ao controle salina. Já a associação entre a fluoxetina e o  $\alpha$ -humuleno (0,1 mg/kg + 1,25 mg/kg) ocasionou uma diminuição de 28,2% do TI quando comparado ao controle salina (Figura 11) (Tabela 10).



**Figura 11.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o TI no teste de Potencialização com Fluoxetina. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por Tukey (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “d” vs CL, FLU10 e FLU0,1, respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), FLU10 = Fluoxetina 10 mg/Kg,  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125

mg/Kg, FLU0,1 = Fluoxetina 0,1 mg/Kg;  $\alpha$ -HUM1,25 =  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; FLU0,1 +  $\alpha$ -HUM1,25 = Fluoxetina 0,1 mg/Kg +  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; TI = Tempo de Imobilidade.

**Tabela 10.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o sobre o TI no teste de Potencialização com Fluoxetina.

(Coluna estatística - Apêndice 29; *Analyze* – Apêndice 30).

GRUPOS (n=10)	TI
CL	73,3 ± 16,5
FLU10	35,5 ± 3,4
$\alpha$ -HUM 125	54 ± 3,4
FLU0,1	79,1 ± 5,5
$\alpha$ -HUM 1,25	48,9 ± 6,7
FLU0,1 + $\alpha$ -HUM 1,25	52,6 ± 6,9

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “d” vs CL, FLU10 e FLU0,1, respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), FLU10 = Fluoxetina 10 mg/Kg,  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg, FLU0,1 = Fluoxetina 0,1 mg/Kg;  $\alpha$ -HUM1,25 =  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; FLU0,1 +  $\alpha$ -HUM1,25 = Fluoxetina 0,1 mg/Kg +  $\alpha$ -humuleno 1,25 mg/Kg; TI = Tempo de Imobilidade.

A fluoxetina age seletivamente inibindo a recaptação de serotonina, sendo de maior tolerabilidade e mais seguro que os ADT. Este medicamento possui uma meia vida prolonga, além de ter um metabólito farmacologicamente ativo. No entanto, possui uma latência prolongada para o início de seus efeitos antidepressivos [7]. Apesar da leve redução do TI no grupo que recebeu a associação do antidepressivo com o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno, os resultados obtidos não foram estatisticamente significantes para apoiar que este composto agisse de maneira semelhante a fluoxetina.

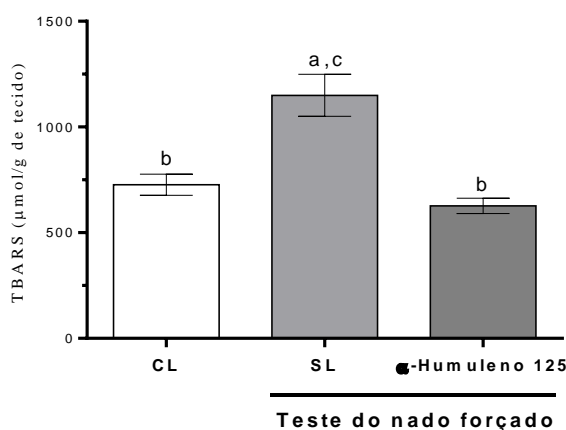
Não foi encontrado na literatura dados que pudessem justificar este possível envolvimento do  $\alpha$ -humuleno com a via dopaminérgica da depressão. Ressaltando, portanto, a necessidade de que estudos neuroquímicos possam ser desenvolvidos, a fim de desvendar o real mecanismo pelo qual este composto possa está agindo.

### 3.2.7. Participação da atividade antioxidante – Concentração de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito

Muito se tem estudado sobre os mecanismos patogênicos para o desenvolvimento do transtorno depressivo, no entanto vale destacar que estes ainda não foram completamente esclarecidos. Alguns estudos expressam uma possível relação do estresse oxidativo (EO) com o aparecimento da depressão, que pode ser relacionada a vulnerabilidade do SNC aos danos ocasionados pelo EO [20, 21].

O estresse oxidativo é decorrente de um aumento da produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Fisiologicamente estes radicais livres são suprimidos por enzimas antioxidantes [141]. No SNC, quando há um desequilíbrio nos mecanismos de defesa antioxidante, danos ocasionados pelos radicais livres se acumulam com o passar do tempo originando o EO, que podem predispor o organismo ao desenvolvimento da depressão [21].

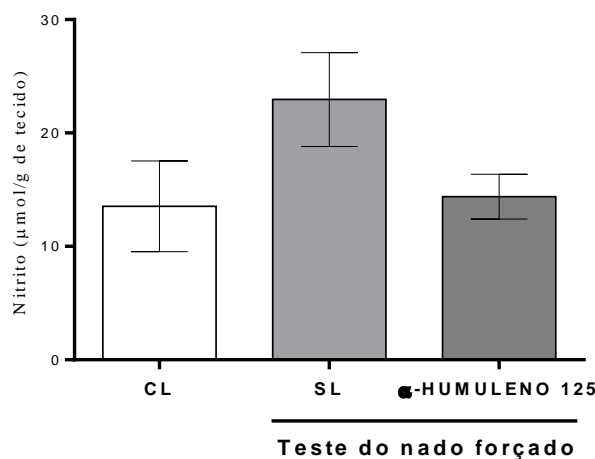
Nesta perspectiva, um protocolo experimental para mensurar os níveis de TBARS e Nitrito foi realizado, a fim de investigar o possível envolvimento da atividade antioxidante. A figura 12 evidencia os resultados do  $\alpha$ -humuleno sobre a produção de TBARS nos animais que foram estressados a partir do TNF. Quando comparado o grupo salina (SL) que sofreu o estresse com o grupo controle (CL) que recebeu salina, mas não passou pelo processo estressante, é possível observar que houve um aumento de 58,2 % nos níveis de TBARS no grupo SL, demonstrando que houve uma situação de estresse. E ao comparar os níveis de TBARS entre o grupo SL estressado e o grupo  $\alpha$ -humuleno (125 mg/kg), que também passou pelo processo estressante, foi possível observar que o grupo do  $\alpha$ -humuleno reduziu os níveis de TBARS em 45,5% (Tabela 11).



**Figura 12.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o marcador TBARS de estresse oxidativo decorrente do TNF.

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs CL, SL e  $\alpha$ -HUM125, respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), SL (solução fisiológica 0,9%),  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg; TBARS = ácido tiobarbitúrico.

Já ao analisar os níveis de Nitrito, a figura 13 nos mostra que o grupo SL estressado aumentou em 69,6% os níveis de nitrito, quando comparado ao grupo CL não estressado, evidenciando que o processo estressante aconteceu após os animais serem submetidos ao TNF. No entanto o grupo do  $\alpha$ -humuleno estressado diminuiu os níveis de Nitrito em 37,1% quando comparado ao grupo SL estressado.



**Figura 13.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre o marcador nitrito de estresse oxidativo decorrente do TNF.

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), SL (solução fisiológica 0,9%),  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg.

**Tabela 11.** Efeito do  $\alpha$ -humuleno sobre as concentrações de TBARS e Nitrito. (Coluna estatística - Apêndices 31 e 33; *Analyze* – Apêndices 32 e 34).

GRUPOS (n=10)	TBARS	Nitrito
CL	727,1 $\pm$ 49,8	13,5 $\pm$ 4
SL	1150 $\pm$ 99,2	22,9 $\pm$ 4,1
$\alpha$ -HUM 125	627,2 $\pm$ 36,2	14,4 $\pm$ 1,9

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os grupos tiveram um n = 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido por *Tukey* (post hoc). Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs CL, SL e  $\alpha$ -HUM125, respectivamente, quando  $p < 0.05$ . CL = Controle (solução fisiológica 0,9%), SL (solução fisiológica 0,9%),  $\alpha$ -HUM125 =  $\alpha$ -humuleno 125 mg/Kg; TBARS = ácido tiobarbitúrico.

Como observado neste protocolo, o teste do nado forçado foi capaz de aumentar o estresse oxidativo a partir do aumento dos níveis de TBARS. Sendo possível evidenciar o potencial de diminuição dos níveis desta substância do  $\alpha$ -humuleno, em sua menor dose.

O TBARS diz respeito a substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, resultados da peroxidação lipídica. Já o nitrito é uma ERN. Alguns estudos têm demonstrado um aumento de radicais livres, como o óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA), em pacientes com características deprimidas, assim como em experimentos que envolvam animais predispostos ao quadro mimético de depressão [142-144].

Outra informação importante é que, outro estudo evidenciou que, pacientes que foram submetidos ao tratamento com antidepressivos demonstraram uma redução dos níveis dos radicais livres MDA e NO [145]. Esse direcionamento para uma relação entre o EO e a depressão cria caminhos para o desenvolvimento de pesquisas que busquem investigar compostos com potencial antioxidante no combate ao transtorno depressivo [146].

A bastante tempo o  $\alpha$ -humuleno, assim como vários isômeros de mesma composição química, são difundidos como importantes compostos no tratamento da inflamação [109, 110, 112, 147-150], além de apresentarem-se, também, como substâncias com alto potencial antioxidante [151]. No estudo de Calleja e colaboradores [151], por exemplo, o  $\beta$ -cariofileno, isômero do  $\alpha$ -humuleno, apresentou atividade antioxidante através da eliminação de radicais livres, possivelmente contra radicais hidroxila, ânions superóxido e peróxidos lipídicos.

No trabalho de Cardoso [152] o  $\beta$ -cariofileno, também, agiu diminuindo o estresse oxidativo em áreas do cérebro – hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado – por redução dos níveis de MDA e nitrito-nitrato. Neste sentido, caminhos foram criados a fim de investigar o envolvimento de substâncias com potencial antioxidante no combate a depressão, tendo em vista os resultados apresentados frente a redução dos níveis de TBARS com o  $\alpha$ -humuleno.

#### **4. Considerações finais**

A realização desse trabalho proporcionou uma contribuição a literatura científica sobre o  $\alpha$ -humuleno, um importante sesquiterpeno.

A partir do desenvolvimento dos protocolos experimentais, pode-se concluir que o  $\alpha$ -humuleno não apresentou alterações dos tipos excitatórias ou sedativas sobre o SNC, tendo DL50 estimada em  $\geq 5.000$  mg/kg. Não apresentou atividade ansiolítica, tampouco alterações das atividades locomotora e exploratória, nas doses de 125 e 250 mg/kg.

No entanto, os resultados da dose 500mg/kg sugeriram efeito sedativo no ensaio do CA, possivelmente do tipo dose-dependente, ou seja, a medida que a dose aumenta, a substância tende a ser sedativa. Ressalta-se, ainda, que o  $\alpha$ -humuleno não possui propriedades miorrelaxantes, visto que não alterou a função motora dos animais tratados.

Sobre a atividade antidepressiva (símile), o composto demonstrou um potencial significativo, pois reduziu o tempo de imobilidade dos animais, assim como aumentou a latência para imobilidade, no teste do nado forçado. Esse dado possibilita caminhos para a realização de estudos futuros que busquem investigar o possível mecanismo de ação que o  $\alpha$ -humuleno desempenha. No entanto, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos que justificassem sua atividade a nível de monoaminas, sendo necessário mais estudo que investiguem os mecanismos de ação pelo qual o composto possa está agindo.

O  $\alpha$ -humuleno revelou, também, potencial de redução do estresse oxidativo, permitindo meios para a avaliações futuras que visem investigar o envolvimento da via inflamatória no transtorno depressivo.

## 5. Referências

- [1] Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial de Saúde. Folha informativa - Transtornos mentais. 2018. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5652:folha-informativa-transtornos-mentais&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5652:folha-informativa-transtornos-mentais&Itemid=839)>. Acesso em: 04 set 2018.
- [2] OMS. Organização Mundial da Saúde. Relatório Mundial da Saúde. Saúde Mental: Nova concepção, nova esperança. Lisboa 2002. Disponível em: ([https://www.who.int/whr/2001/en/whr01\\_djmessage\\_po.pdf?ua=1](https://www.who.int/whr/2001/en/whr01_djmessage_po.pdf?ua=1)).
- [3] APA. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed 2014.
- [4] APA. American Psychiatric Association [homepage na Internet]. Parekh R. What Is Depression? [Atualizado em 2017; Citado em 06 de setembro de 2018]. Disponível em: (<https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>).
- [5] Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2014.
- [6] NIH. National Institute of Mental Health [homepage na Internet]. Transforming the understanding and treatment of mental illnesses. Depression 2018 [Citado em 06 de setembro de 2018]. Disponível em: (<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/depression/index.shtml>).
- [7] Moreno RA; Moreno DH; Soares MBM. Psicofarmacologia de antidepressivos. Revista Brasileira de Psiquiatria 1999; 21: 24-40.

- [8] Felipe LO, Bicas JL. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola* 2017; 39(2): 120-30.
- [9] Maia JGS, Andrade EHA. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Química Nova* 2009; 32(3): 595-622.
- [10] Krivoruchko A, Nielsen J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Biotechnology* 2015; 35: 7-15.
- [11] Oliveira CC, Oliveira CV, Grigoletto J, *et al.* Anticonvulsant activity of  $\beta$ -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy & Behavior* 2016; 56: 26-31.
- [12] Nogueira Neto JD, Almeida AAC, Silva AO, *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do Nerolidol em camundongos. *Revista de Biologia e Farmácia* 2012; 08(02): 42-56.
- [13] Rocha NF, Rios VER, Carvalho AMR, *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- $\alpha$ -bisabolol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2011; 384(6): 525-33.
- [14] Azambuja W. Óleo Essencial de Erva Baleeira - Óleos Essenciais. O Guia do Brasil [homepage na Internet]. [Citado em 28 de setembro de 2018]. Disponível em: (<http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-erva-baleeira/#>).
- [15] Chaves JS, Leal PC, Pianowisky L, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene alpha-humulene in mice. *Planta Medica* 2008; 74(14): 1678-83.
- [16] Almeida MFO, Melo ACR, Pinheiro MLB, *et al.* Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova* 2011; 34(7): 1182-7.
- [17] Alves SF. Estudo da composição química, de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vorgel – Fabaceae (Sucupira). (Dissertação) Goiás: Universidade Federal de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia 2012 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/2112>).
- [18] Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, *et al.* Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology* 2007; 151: 618-27.
- [19] Oliveira RN. Atividade do Óleo essencial, Frações e Sesquiterpenos de *Baccharis trimera* (Less) sobre *Schistosoma mansoni*. (TESE) Campinas: Universidade Estadual de Campinas 2016 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/321644>).
- [20] Liu T, Zhong S, Liao X, *et al.* A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *Plos One* 2015; 10(10): 1-17.
- [21] Rodrigues R, Petersen RB, Perry G. Parallels between Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease: role of oxidative stress and genetic vulnerability. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2014; 34(7): 925-49.

- [22] Bazzano FCO. Aspectos éticos da pesquisa científica. In: Silva, JV, *et al*, Eds. Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa. 1ª ed. São Paulo: Iátria 2006; pp. 149-80.
- [23] Brasil. Lei Federal Nº 9605 do ano 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. 1998 [Citado em 28 de setembro de 2018]. Disponível em: ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19605.htm#:~:text=LEI%20N%C2%BA%209.605%2C%20DE%2012%20DE%20FEVEREIRO%20DE%201998.&text=Disp%C3%B5e%20sobre%20as%20san%C3%A7%C3%B5es%20penais,ambiente%2C%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAs](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm#:~:text=LEI%20N%C2%BA%209.605%2C%20DE%2012%20DE%20FEVEREIRO%20DE%201998.&text=Disp%C3%B5e%20sobre%20as%20san%C3%A7%C3%B5es%20penais,ambiente%2C%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAs)).
- [24] Brasil. Lei Federal nº 11.794 de 2008. Dispõem sobre Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. 2008 [Citado em 28 de setembro de 2018]. Disponível em: ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm#:~:text=Regulamenta%20o%20inciso%20VII%20do,1979%3B%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAs](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm#:~:text=Regulamenta%20o%20inciso%20VII%20do,1979%3B%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAs)).
- [25] Machado JGS, Pinheiro MS, Marçal SH. Análise bioética aplicável ao uso de animais não-humanos em experimentos científicos. In: Garrafa V, Cordón J, Eds. Pesquisas em bioética no Brasil de hoje. São Paulo: Gaia 2006; p.45-62.
- [26] Brasil. Decreto nº 24.645, de 10 julho de 1934. Estabelece medidas de proteção aos animais. 1934 [citado em 28 de setembro de 2018]. Disponível em: ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1930-1949/D24645.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24645.htm)).
- [27] Brasil. Lei nº 6638 de 8 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências. 1979 [Citado em 28 de setembro de 2018]. Disponível em: ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/1970-1979/L6638.htm#:~:text=Estabelece%20normas%20para%20a%20pr%C3%A1tica,animais%2C%20nos%20termos%20desta%20Lei](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1970-1979/L6638.htm#:~:text=Estabelece%20normas%20para%20a%20pr%C3%A1tica,animais%2C%20nos%20termos%20desta%20Lei)).
- [28] Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 2003; 53(2): 278-85.
- [29] Malone MH. Pharmacological approaches to natural product and evaluating. In: Wasner H, Walff LP, Eds. *Natural products and plant drugs with pharmacological biological or therapeutic activity*. Berlin: Springer Verlag 1977; pp. 23-56.
- [30] OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, Guidelines for the testing of chemicals. Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP) 2008. Disponível em: (<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071049-en.pdf?expires=1598531123&id=id&accname=guest&checksum=C69BB3871FF9A8DC9D9340848172F8DD>).
- [31] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92(2): 180-5.
- [32] Handley SL; Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’ -motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives or Pharmacology* 1984; 327(1): 1-5.



- [33] Pellow S, Chopin PSE, 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* 1985; 14(3): 149-67.
- [34] Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 1990; 46(3): 321-40.
- [35] Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour* 1973; 21(2): 205-35.
- [36] Carlini EA, Burgos V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. *Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria* 1979; 1: 25-31.
- [37] Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmacists Association* 1957; 46: 208-9.
- [38] Porsolt RD, Anton G, Blavet N, *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* 1978; 47(4): 379-91.
- [39] Askew BM. A simple screening procedure for imipramine-like antidepressant agents. *Life Sciences* 1963; 2(10): 725-30.
- [40] Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 421-31.
- [41] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 1982; 126(1): 131-8.
- [42] Bastos IVGA, Silva GKC, Rodrigues GCR, *et al.* Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. *Revista Brasileira de Farmácia* 2011; 92(3): 219-22.
- [43] Campos SC, Silva CG, Campana PRV, *et al.* Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2016; 18(1): 373-82.
- [44] (LaVoie *et al.*, 1986)
- [45] Carlini EA, Mendes FR, Eds. *Protocolos em psicofarmacologia experimental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas mediciniais.* São Paulo: FAP-UNIFESP 2011.
- [46] Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1997; 21(6): 801-10.
- [47] Arruda EJ, Kitamura JH, Chaves TP, *et al.* Comportamento Exploratório e Ansiolítico de Ratos e Ratas Submetidos à Estimulação Somatossensorial. *Revista Brasileira de Terapias e Saúde* 2011; 2(1): 7-12.
- [48] Bahi A, Al Mansouri S, Al Memari E, *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiology & Behavior* 2014; 135: 119-24.
- [49] Galdino PM, Nascimento MVM, Florentino IF, *et al.* The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major

component,  $\beta$ -caryophyllene, in male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2012; 38: 276-84.

[50] Goel RK, Kaur D, Pahwa P. Assessment of anxiolytic effect of nerolidol in mice. *Indian Journal of Pharmacology* 2016; 48(4): 450-2.

[51] Ma L, Wang S, Tai F, *et al.* Effects of bilobalide on anxiety, spatial learning, memory and levels of hippocampal glucocorticoid receptors in male Kunming mice. *Phytomedicine* 2012; 20(1): 89-96.

[52] Tabari MA, Tehrani MAB. Evidence for the involvement of the GABAergic, but not serotonergic transmission in the anxiolytic-like effect of bisabolol in the mouse elevated plus maze. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2017; 390(10): 1041-6.

[53] Montanha FP; Azevedo MGP. Drug administration: advantages and disadvantages of different ways. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* 2013; 20.

[54] Shahnouri M, Tabari MA, Araghi A. Neuropharmacological properties of farnesol in Murine model. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2016; 17: 259-64.

[55] Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures individual differences in emotionality. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1934; 18: 385-403.

[56] Schmitt U, Hiemke C. Strain Differences in Open-Field and Elevated Plus-Maze Behavior of Rats Without and With Pretest Handling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1998; 59(4): 807-11.

[57] Tabach R. Modelo Animais para o Estudo de Drogas Ansiolítica. In: Carlini EA, Mendes FR, Eds. *Protocolos em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais*. São Paulo: Fap-Unifesp 2011; pp.159-81.

[58] Carlini EA. Teste iniciais para estudo de drogas e extratos com efeito central. IN: Carlini EA, Mendes FR, Eds. *Protocolos em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais*. São Paulo: editora Fap-Unifesp, 2011; pp. 131-58.

[59] Costa-Lotufo LV, Lucena DFD, Andrade-Neto M, *et al.* Analgesic, antiinflammatory and central depressor effects of the hydroalcoholic extract and fractions from *Aeolanthus suaveolens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27(6): 821-4.

[60] Olsen RW. Absinthe and  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 4417-8.

[61] Lacerda GFML. Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial. (Dissertação) Paraná: Universidade Federal do Paraná - Pós-Graduação em Farmacologia 2006 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/3780>).

[62] Ago J, Ishikawa T, Matsumoto N, *et al.* Mechanism of imipramine-induced seizures in amygdala-kindled rats. *Epilepsy research* 2006; 72(1): 1-9.

- [63] Olson R. GABA. In: Davis K, Charney D, Coyle J, *et al*, Eds. Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 2002.
- [64] Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10: 519-29.
- [65] Gobira PH, Ropke J, Aguiar DC, *et al*. Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2013; 35(2): 132-9.
- [66] Pinto WBVR, Ko GM. Teste de *rotarod*: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório* 2012; 1(2): 202-12.
- [67] Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, *et al*. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods* 2010; 189(2): 180-5.
- [68] Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?. *Psychopharmacology* 1998; 94: 147-61, 1998.
- [69] Vieira C, Lima TC, Pádua-Carobrez A, *et al*. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. *Neuroscience letters* 2008; 445(2): 170-3.
- [70] Brasil. Ministério da Saúde. Depressão: causas, sintomas, tratamentos, diagnóstico e prevenção [Citado em 20 de dezembro de 2019]. Disponível em: (<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/depressao>).
- [71] Coryell W. Depressão. Manual MSD versão saúde para a família [homepage na Internet]. [Citado em 20 de dezembro de 2019]. Disponível em: (<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/disturbios-de-saude-mental/transtornos-do-humor/depressao>).
- [72] OPAS/OMS. Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial de Saúde-Brasil. Depressão: o que você precisa saber. 2017 [Citado em 20 de dezembro de 2019]. Disponível em: ([https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5372:depressao-o-que-voce-precisa-saber&Itemid=822](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5372:depressao-o-que-voce-precisa-saber&Itemid=822)).
- [73] OPAS/OMS. Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial de Saúde-Brasil. Folha informativa – Depressão. 2018 [Citado em 20 de dezembro de 2019]. Disponível em: ([https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095)).
- [74] Insel TR. From animal models to model animals. *Biological Psychiatry* 2007; 62: 1337-9.
- [75] La Follette H, Shanks N. Animal models in biomedical research: some epistemological worries. *Public Affairs Quarterly* 1993; 7(2): 113-30.
- [76] Mcgonigle P. Animal models of CNS disorders. *Biochemical Pharmacology* 2014; 87: 140-9.

- [77] Nunes EA, Hallak JEC. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental* 2014; 17(3): 528-43.
- [78] Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology* 2011; 164(4): 1162-94.
- [79] Porsolt RD, Lepichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 1977; 266: 730-2.
- [80] Ferreira DC, Tourinho EZ. Desamparo Aprendido e Incontrolabilidade: Relevância para uma Abordagem Analítico-Comportamental da Depressão. *Psicologia: Teoria e Pesquisa* 2013; 29(2): 211-9.
- [81] Maier SF, Seligman MEP. Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General* 1976; 105(1): 3-46.
- [82] Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002; 23(5): 238-45.
- [83] HMDB. The Metabolomics Innovation Centre. Showing metabocard for alpha-Humulene (HMDB0036467) [homepage na Internet]. [Citado em 03 de janeiro de 2020]. Disponível em: (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0036467#references>).
- [84] NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database [homepage na Internet]. alpha-Humulene, CID=6508206 [Citado em 03 de janeiro de 2020]. Disponível em: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Humulene>).
- [85] Agliassa C, Maffei ME. *Origanum vulgare* Terpenoids Induce Oxidative Stress and Reduce the Feeding Activity of *Spodoptera littoralis*. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(9): 1-19.
- [86] Balogh SL, Huber DPW, Lindgren BS. Single-generation effects on terpenoid defenses in lodgepole pine populations following mountain pine beetle infestation. *PLoS ONE* 2018; 13(3): 1-22.
- [87] Chen MS. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 2008; 15(2): 101-14.
- [88] Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, *et al.* Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 2013; 198(1): 16-32.
- [89] Gijzen M, Lewinsohn E, Savage TJ, *et al.* Conifer monoterpenes: biochemistry and bark beetle chemical ecology. In: Teranishi R, Buttery RG, Sugisawa H, Eds. *Bioactive Volatile Compounds from Plants*. ACS Symposium Series 525. Washington: American Chemical Society 1993; pp. 8–22.
- [90] Müller LG, Salles LA, Stein AC, *et al.* Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2012; 36(1): 101-9.
- [91] Murphy K, Kubin ZJ, Shepherd JN, *et al.* *Valeriana officinalis* root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. *Phytomedicine* 2010; 17(8–9): 674-8.

- [92] Rezvani ME, Roohbakhsh A, Allahtavakoli M, *et al.* Anticonvulsant effect of aqueous extract of *Valeriana officinalis* in amygdala-kindled rats: Possible involvement of adenosine. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 127(2): 313-8.
- [93] Silva AL. Análise química de espécies de *Valeriana* brasileiras. (Tese) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Programa de Pós-Graduação em Química 2009 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/18403>).
- [94] Bianchini AE, Garlet QI, Cunha JÁ, *et al.* Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017; 50(12): 1-8.
- [95] Bezerra DS. Avaliação do efeito do eucaliptol nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos. (Monografia) João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba 2017 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/3611>).
- [96] Melo CGF. Efeito anticonvulsivante do monoterpeno sintético (1S)-(-)-verbenona em animais de laboratório por metodologias específicas comportamentais. (Tese) João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos 2017 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/12317>).
- [97] Guzmán-Gutiérrez SL, Gómez-Cansino R, García-Zebadúa JC, *et al.* Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of  $\beta$ -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 143(2): 673-9.
- [98] Liú XG, Gao PY, Wang GS, *et al.* In vivo antidepressant activity of sesquiterpenes from the roots of *Valeriana fauriei* Briq. *Fitoterapia* 2012; 83(3): 599-603.
- [99] Giordano OS, Guerreiro E, Pestchanker MJ, *et al.* The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *Journal of Natural Products* 1990; 53(4): 803-9.
- [100] Wong HR, Menendez IY. Sesquiterpene lactones inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 262(2): 375-80.
- [101] Lan YH, Wu YC, Wu KW, *et al.* Death receptor 5-mediated TNFR family signaling pathways modulate  $\Delta^9$ -humulene-induced apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells. *Oncology Reports* 2011; 25: 419-24.
- [102] Silva SL, Chaar JS, Figueiredo PMS, *et al.* Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica* 2008; 38(1): 107-12.
- [103] Su YC, Hsu KP, Wang EIC, *et al.* Composition, in vitro Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Flower Essential Oil of *Diospyros discolor* from Taiwan. *Natural Product Communications* 2015; 10(7): 1311-4.

- [104] Xing M, Zheng L, Deng Y, *et al.* Antifungal Activity of Natural Volatile Organic Compounds against Litchi Downy Blight Pathogen *Peronophythora litchi*. *Molecules* 2018; 23(358): 1-15.
- [105] Torres-Hernández BA, Valle-Mojica LMD, Ortíz JG. Valerenic acid and *Valeriana officinalis* extracts delay onset of Pentylentetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult *Danio rerio* (Zebrafish). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2015; 15(228): 1-10.
- [106] Ambrož M, Boušová I, Skarka A, *et al.* The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules* 2015; 20: 15343-58.
- [107] Ambrož M, Matoušková P, Skarka A, *et al.* The Effects of Selected Sesquiterpenes from *Myrica rubra* Essential Oil on the Efficacy of Doxorubicin in Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. *Molecules* 2017; 22(1021): 1-10.
- [108] El Hadri A, Río MÁG, Sanz J, *et al.* Cytotoxic activity of  $\alpha$ -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia. Nacional de Farmacia* 2010; 76(3): 343-56.
- [109] Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* 2007; 569: 228–36.
- [110] Passos GF, Fernandes ES, Cunha FM, *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 110: 323-33.
- [111] Azizan N, Said SM, Abidin ZZ, *et al.* Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Orthosiphon stamineus* Benth and *Ficus deltoidea* Jack against Pathogenic Oral Bacteria. *Molecules* 2017; 22(2135): 1-18.
- [112] Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Lekphrom R. Bioactive Constituents of the Roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 1536-8.
- [113] Lemos M, Santin JR, Mizuno CS, *et al.* *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2015; 25: 238-45.
- [114] Pereira FG, Marquete R, Domingos LT, *et al.* Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestri* Sw. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2017; 89(4): 2817-24.
- [115] Silva SMM, Costa CRR, Gelfuso GM, *et al.* Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. *Molecules* 2019; 24(2): 1-16.
- [116] Oliveira DR. Avaliação da atividade tipo antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* a. St.-Hil. e de seu componente majoritário,  $\beta$ -cariofileno. (Dissertação) Goiânia: Universidade Federal de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 2016 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5858>).

- [117] Carvalho RC, Patti CC, Takatsu-Coleman AL, *et al.* Effects of reserpine on the plus-maze discriminative avoidance task: dissociation between memory and motor impairments. *Brain research* 2006; 1122(1): 179-83.
- [118] Dawson L, Chadha A, Megalou M, *et al.* The group II metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, alleviates akinesia following intranigral or intraventricular administration in the reserpine-treated rat. *British journal of pharmacology* 2000; 129(3): 541-6.
- [119] Freis ED, Ari R. Clinical and experimental effects of reserpine in patients with essential hypertension. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1954; 59(1): 45-53.
- [120] Massari-Leite CM. Estudo do efeito antidiscinético e neuroprotetor da guanosina em camundongos tratados com reserpina. (Dissertação) Florianópolis – SC: Universidade Federal de Santa Catarina - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica 2016 [citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/167939>).
- [121] Mcqueen EG, Doyle AE, Smirk FH. Mechanism of hypotensive action of reserpine, an alkaloid of *Rauwolfia serpentina*. *Nature* 1954; 174(4439): 1015.
- [122] Steinpreis RE, Salamone JD. Effects of acute haloperidol and reserpine administration on vacuous jaw movements in three different age groups of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1993; 46(2): 405-9.
- [123] Colpaert FC. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* 1987; 26(9): 1431-40.
- [124] Kane JM, Smith JM. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Archives Of General Psychiatry* 1982; 39(4): 473-81.
- [125] Alves CS, Andreatini R, Cunha C, *et al.* Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. *European journal of pharmacology* 2000; 404(1): 161-7.
- [126] Prediger RDS, Cunha C, Takahashi RN. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behavioural pharmacology* 2005; 16(4): 209-18.
- [127] Sigg RB, Gyermek L, Hill R. Antagonism to Reserpine Induced Depression by Imipramine, Related Psychoactive Drugs, and Some Autonomic Agents. *Psychopharmacologia* 1965; 7: 144-9.
- [128] Skalisz LL, Bejamini V, Joca SL, *et al.* Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression–Parkinson's disease association. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2002; 26(5): 879-83.
- [129] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A. Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual* 1998; 6(1): 165-91.
- [130] Li S, Han J, Wang DS, *et al.* Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. *Metabolic Brain Disease* 2016; 31(2): 455-63.

- [131] Minor T, Hanff T. Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research* 2015; 286(1): 184-91.
- [132] Ozerov A, Bagmetova V, Chernysheva V, *et al.* Comparison of the efficiency of adrophen and antidepressants of various groups on the model of reserpine-induced depression in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2016; 160(5): 649-52.
- [133] Socala K, Nieoczym D, Pieróg M, *et al.* Antidepressant-like activity of sildenafil following acute and subchronic treatment in the forced swim test: Effects of restraint stress and monoamine depletion. *Metabolic Brain Disease* 2016; 31: 1095-104.
- [134] Hill RT, Tedeshi DH. Teste de animais e procedimentos de triagem na avaliação de drogas psicóticas. In: Rech RH, Moore KE, Eds. *Uma introdução à psicofarmacologia*, New York: Raven Press 1971; pp. 237-281.
- [135] Mckinney WT. Modelos animais de depressão. In: Gallant DM, Simpson GM, Eds. *Depression: behavioral, biochemical diagnostic and treatment concepts*. spectrum. New York 1976; pp. 1-77.
- [136] Wachtel H, Schneider HH. Rolipram, a novel antidepressant drug, reverses the hypothermia and hypokinesia of monoamine-depleted mice by an action beyond postsynaptic monoamine receptors. *Neuropharmacology* 1986; 25(10): 1119-26.
- [137] Berton O. & Nestler E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, 7(2):137-51, 2006.
- [138] Sousa DP, Silva RHN, Silva EF, *et al.* Essential Oils and Their Constituents: An Alternative Source for Novel Antidepressants. *Molecules* 2017; 22(1290): 1-22.
- [139] Dwoskin LP, Rauhut AS, King-Pospisil KA, *et al.* Review of the Pharmacology and Clinical Profile of Bupropion, an Antidepressant and Tobacco Use Cessation Agent. *CNS Drug Reviews* 2006; 12(3-4): 178-207.
- [140] Stahl SM, Pradko JF, Haight BR, *et al.* A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry* 2004; 6(4): 159-66.
- [141] Melo CTV. Investigação do efeito antidepressivo da riparina III: alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo. (Tese) Fortaleza: Universidade Federal do Ceará 2012 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/4783>).
- [142] Cheng J, Dong S, Yi L, *et al.* Magnolol abrogates chronic mild stress-induced depressive-like behaviors by inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in the prefrontal cortex of mice. *International Journal of Immunopharmacology* 2018; 59: 61-7.
- [143] Chung CP, Schmidt D, Stein CM, *et al.* Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. *Psychiatry Research* 2013; 206: 213-6.
- [144] Maes M, Bonifacio KL, Morelli NR, *et al.* Generalized Anxiety Disorder (GAD) and comorbid Major Depression with GAD are characterized by enhanced nitro-oxidative stress,



increased lipid peroxidation and lowered lipid-associated antioxidant defenses. *Neurotoxicity Research* 2018; 34(3): 489-510.

[145] Balmus IM, Ciobica A, Antioquia I, *et al.* Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016: 1-25.

[146] Black CN, Penninx BWJH, Bot M, *et al.* Oxidative stress, anti-oxidants and the cross-sectional and longitudinal association with depressive symptoms: results from the CARDIA study. *Translational Psychiatry* 2016; 6(2): 1-10.

[147] Bento AF, Marcon R, Dutra RC, *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through CB2 Receptor Activation and PPAR $\gamma$  Pathway. *The American Journal of Pathology* 2011; 178(3): 1153-66.

[148] Gertsch J, Leonti M, Raduner S, *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(26): 9099-104.

[149] Horváth B, Mukhopadhyay P, Kechrid M, *et al.*  $\beta$ -caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52(8): 1325-33.

[150] Varga ZV, Matyas C, Erdelyi K, *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. *British Journal of Pharmacology* 2018; 175: 320-34.

[151] Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, *et al.* The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition* 2013; 109: 394–401.

[152] Cardoso NA. Efeitos comportamentais e neuroquímicos do beta-cariofileno em modelos experimentais de ansiedade e depressão em camundongos. (Dissertação) Sobral: Universidade Federal do Ceará - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia 2018 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/39003>).

#### 4. Considerações Finais

A realização desse trabalho proporcionou uma contribuição a literatura científica sobre o  $\alpha$ -humuleno, um importante sesquiterpeno. A partir da Revisão Sistemática (RS) e da realização dos protocolos experimentais, conclui-se que:

- Sobre a Revisão Sistemática:
  - A RS evidenciou crescente utilização do sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno, assim como de seus isômeros, como agentes terapêuticos potenciais;
  - Dentre as atividades elencadas na RS, destacam-se as atividades antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras. Além de ressaltar a necessidade do desenvolvimento de estudos que avaliem a segurança deste grupo de compostos;
- Sobre os Protocolos Experimentais:
  - O  $\alpha$ -humuleno não apresentou alterações do tipo excitatórias ou sedativas sobre o SNC, e apresentou DL50  $\geq$  5.000 mg/kg, por via oral;
  - Os dados obtidos a partir do teste do LCE mostraram que o  $\alpha$ -humuleno não apresenta atividade do tipo ansiolítica;
  - A partir do experimento do CA, as doses de 125 e 250 mg/kg não apresentaram alterações sobre a atividade locomotora e exploratória dos animais (NC, NR e NG). E a dose de 500 mg/kg demonstrou leve diminuição do NC e NR, sugerindo que o efeito sedativo da substância teste pode ser do tipo dose-dependente, ou seja, a medida que a dose aumenta a substância tende a ser sedativa.
  - De acordo com o protocolo do RR o  $\alpha$ -humuleno não possui propriedades miorrelaxante, visto que ele não altera a função motora dos animais tratados.
  - O  $\alpha$ -humuleno apresentou possível atividade do tipo antidepressiva (símile), quando comparado ao controle salina, pois reduziu o tempo de imobilidade dos animais, assim como aumentou a latência para imobilidade.
  - O protocolo de AIR e de potencialização não foram esclarecedores quanto a potencial mecanismo de ação pelo qual o comportamento possa está agindo, sendo, portanto, necessário mais estudos que investiguem esta vertente.
  - O  $\alpha$ -humuleno revelou, também, potencial de redução do estresse oxidativo, permitindo meios para a avaliações futuras que visem investigar o envolvimento do estresse oxidativo no transtorno depressivo.

## Referências

- ACCATTINI, M. & PAPINE, J. M. **Distúrbios do SNC: Depressão, Ansiedade e Epilepsia.** Programa de desenvolvimento profissional ao farmacêutico: Medley, 2007.
- ALMEIDA, M.F.O.; MELO, A.C.R.; PINHEIRO, M.L.B.; et al. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1182-1187, 2011.
- ALVES, S. F. **Estudo da composição química, de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vorgele – Fabaceae (Sucupira).** (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, 2012.
- ANDREATINI, R. Uso de fitoterápicos em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 3, p. 104-105, 2000.
- APA. American Psychiatric Association. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5.** 5 ed, Porto Alegre, Artmed, 2014.
- APA. American Psychiatric Association. **What Is Depression?** Revisão médica por Parekh, R., 2017. Disponível em: <<https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>>. Acesso em: 06 set 2018.
- AZAMBUJA, W. **Óleo Essencial de Erva Baleeira - Óleos Essenciais.** O Guia do Brasil. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-erva-baleeira/#>>. Acesso em: 28 set 2018.
- BAHLS, S.C. Tratamento fitoterápico da depressão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 50, n. 11/12, p. 389-396, 2001.
- BALMUS, I.M.; CIOBICA, A.; ANTIOQUIA, I.; et al. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-25, 2016.
- BARRETO, M.A.M.; FERMOSELI, A.F.O.; MARINHO, A.A.; et al. As consequências da diminuição de dopamina produzida na substância nigra: uma breve reflexão. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2015.
- BEZCHLIBNYK-BUTLER, K. Z. & JEFFRIES, J. J. **Clinical handbook of psychotropic drugs.** 9th ed. Seattle: Hogrefe & Huber, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas.** Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2014.
- BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial de Saúde. **Folha informativa - Transtornos mentais.** 2018. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5652:folha-informativa-transtornos-mentais&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5652:folha-informativa-transtornos-mentais&Itemid=839)>. Acesso em: 04 set 2018.

CALLEJA, M.A.; VIEITES, J.M.; MONTERO-METERDEZ, T.; et al. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 394–401, 2013.

CARDOSO, N.A. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos do beta-cariofileno em modelos experimentais de ansiedade e depressão em camundongos**. (Dissertação) Sobral: Universidade Federal do Ceará - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia 2018 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/39003>).

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

CHENG, J.; DONG, S.; YI, L.; et al. Magnolol abrogates chronic mild stress-induced depressive-like behaviors by inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in the prefrontal cortex of mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 59, p. 61-67, 2018.

CHUNG, C.P.; SCHMIDT, D.; STEIN, C.M.; et al. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. **Psychiatry Research**, v. 206, p. 213-216, 2013.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272-8, 2005.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.M.; SILVA, E.P.; et al. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2056-2059, 2008.

DVORA, H. & KOFFAS, M.A.G. In: McNeil B, Archer D, Giavasis I, Harvey L. 1º Ed. **Microbial production of flavonoids and terpenoids. Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. Cambridge: Elsevier; Chap. 10, p. 234-261, 2013.

ESTEVINHO, M.F. & SOARES-FORTUNATO, J.M. Dopamina e Receptores. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v. 5, n. 1, 21-31, 2003.

FELIPE, L.O. & BICAS, J.L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica de GOODMAN & GILMAN**. 12ª ed.; Porto Alegre: AMGH, 2012.

HMDB. **The Metabolomics Innovation Centre. Showing metabocard for alpha-Humulene (HMDB0036467)**. Disponível em: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0036467#references>. Acesso em: 03 de janeiro de 2020.

KATON, W.; ROBINSON, P.; VON KORFF, M.; et al. A multifaceted intervention to improve treatment of depression in primary care. **Archives of General Psychiatry**, v. 53, n. 10, p. 924-32, 1996.

- KATZUNG, B.G.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**. 12<sup>a</sup> ed.; Porto Alegre: AMGH, 2014.
- KELAFER, B.; ALMEIDA, O.P.; JÚNIOR FRÁGUAS, R.; et al. **Depressão no Ciclo da Vida**. ARTMED, Porto Alegre, 2000.
- KESSEL, J.B.; SIMPSON, G.M. **Tricyclic and Tetracyclic Drugs**. In: KAPLAN, H.I. & SADOCK, B.J., editors. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 6th ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 2096-112, 1995.
- KIRSCH, I.; DEACON, B.J.; HUEDO-MEDINA, T.B.; et al. Initial Severity and Antidepressant Benefits: A Meta-Analysis of Data Submitted to the Food and Drug Administration. **PLoS Med**, v. 5, n. 2, p. e45, 2008.
- KRIVORUCHKO, A. & NIELSEN, J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 35, p. 7-15, 2015.
- LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L.; et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. SBPC, Campinas-SP, 2008.
- LIU, T.; ZHONG, S.; LIAO, X.; et al. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1-17, 2015.
- LOPES, C. S.; FOERSTEIN, E.; CHOR, D. Eventos de vida produtores de estresse e transtornos mentais comuns: resultados do estudo Pró-Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1713-1720, 2003.
- MAES, M.; BONIFACIO, K.L.; MORELLI, N.R.; et al. Generalized Anxiety Disorder (GAD) and comorbid Major Depression with GAD are characterized by enhanced nitro-oxidative stress, increased lipid peroxidation and lowered lipid-associated antioxidant defenses. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 3, p. 489-510, 2018.
- MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.
- MARQUES, T.H.C.; MELO, C.H.S.; FREITAS, R.M. In vitro evaluation of antioxidant, anxiolytic and antidepressant-like effects of the *Bellis perennis* extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1044-1052, 2012.
- MC MURRY, J. **Química Orgânica - Combo**. São Paulo: Cengage Learning, 7<sup>o</sup> Ed, 2011. 1344 p.
- MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618–627, 2007.
- MELO, C.T.V. **Investigação do efeito antidepressivo da riparina III: alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo**. (Tese) Fortaleza: Universidade Federal do Ceará 2012 [Citado em 27 de agosto de 2020]. Disponível em: (<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/4783>).

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

NASH, J.; NUTT, D. Antidepressants. **Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 289-94, 2007.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. **alpha-Humulene**, CID=6508206. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Humulene>. Acesso em: 03 jan de 2020.

NICE. National Institute for Health and Care Excellence. **Common mental health problems: identification and pathways to care**. Clinical guideline, 2011. Disponível em:

<<https://www.nice.org.uk/guidance/cg123/chapter/Introduction>>. Acesso em: 08 set 2018.

NIH. National Institute of Mental Health. **Transforming the understanding and treatment of mental illnesses. Depression**. 2018. Disponível em:

<<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/depression/index.shtml>>. Acesso em: 06 set 2018.

NISHIDA, A.; HISAOKA, K.; ZENSHO, H.; et al. Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 12, p. 1619-1626, 2002.

NOGUEIRA NETO, J.D.; ALMEIDA, A.A.C.; SILVA, O.A.; et al. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do Nerolidol em camundongos. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 08, n. 02, p. 42-56, 2012.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, C.V.; GRIGOLETTO, J.; et al. Anticonvulsant activity of  $\beta$ -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, p. 26-31, 2016.

OLIVEIRA, R.N. **Atividade do Óleo essencial, Frações e Sesquiterpenos de *Baccharis trimera* (Less) sobre *Schistosoma mansoni***. (TESE) Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Classificação de TM e de comportamento da CID-10**. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Relatório Mundial da Saúde. **Saúde Mental: Nova concepção, nova esperança**. Lisboa; 2002.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Media centre. **People with mental disabilities cannot be forgotten**. 2010. Disponível em:

<[http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/mental\\_disabilities\\_20100916/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/mental_disabilities_20100916/en/)>.

Acesso em: 09 set 2018.

PAYKEL, E.S.; HOLLYMAN, J.A.; FREELING, P.; et al. Predictors of therapeutic benefit from amitriptyline in mild depression: a general practice placebo-controlled trial. **Journal of affective disorders**, v. 14, n. 1, p. 83-95, 1988.

PETZSCH, D.G. **Avaliação pré-clínica da atividade do tipo antidepressiva de quatro preparações comerciais de *Hypericum perforatum* e a sua correlação com os teores de hiperforina**. (Dissertação) Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

- ROCHA, F.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C. et al. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents - In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 396-402, 2007.
- ROCHA, N.F.; RIOS, E.R.V.; CARVALHO, A.M.R.; et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- $\alpha$ -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 384, n. 6, p. 525-33, 2011.
- ROCHA, S.V.; ALMEIDA, M.M.G.; ARAÚJO, T.M.; et al. Prevalência de transtornos mentais comuns entre residentes em áreas urbanas de Feira de Santana, Bahia. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n. 4, p. 630-40, 2010.
- RODRIGUES, R.; PETERSEN, R.B.; PERRY, G. Parallels between Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease: role of oxidative stress and genetic vulnerability. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 7, p. 925-949, 2014.
- RODRÍGUEZ-LANDA, J.F.; CONTRERAS, C.M. A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. **Phytomedicine**, v. 10, n. 8, p. 688-699, 2003.
- ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W. et al. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 28, n. 2, p. 159-164, 2008.
- SÁNCHEZ-MATEO, C.C.; BONKANKA, C.X.; RABANAL, R.M. *Hypericum grandifolium* Choisy: a species native to Macaronesian Region with antidepressant effect. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 297-303, 2009.
- SANTOS, É.G.; SIQUEIRA, M.M. Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: uma revisão sistemática de 1997 a 2009. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 3, p. 238-246, 2010.
- SCHMIDT, D. R. C.; DANTAS, R. A. S.; MARZIALE, M. H. P. Ansiedade e depressão entre profissionais de enfermagem que atuam em blocos cirúrgicos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 2, p. 487-493, 2011.
- SILVA, A.F.S. *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) **Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados.** (Tese) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- SILVA, D.K. & ANDRADE, F.M. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptação de serotonina: uma revisão. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v.30, n.1, 2008.
- STAHL, S.M. **Psychopharmacology of antidepressants.** London: Martin Dunitz; 1997. 114p.
- STANDAERT, D.; GALANTER, J.M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. Princípios de Farmacologia: **A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia**, p.166-185, 2009.
- TOLEDO, L.M. **O que são transtornos mentais? Noções básicas.** Organizado por Luciano Medeiros de Toledo e Paulo Chagastelles Sabroza. Rio de Janeiro: ENSP/FIOCRUZ, Caderno n. 1, 16 p., 2011.

TUONO, V. L.; JORGE, M. H. P. M.; GOTLIEB, S. L. D.; et al. Transtornos mentais e comportamentais nas mortes de mulheres em idade fértil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 85-92, 2007.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VISMARI, L.; ALVES, G.J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 5, p. 196-204, 2008.



**ANEXOS**

**ANEXO A - Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais – CEUA da Universidade Regional do Cariri – URCA.**



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS**  
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta  
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291  
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil  
propg@urca.br - www.urca.br/ceua



**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "**Determinação do efeito antidepressivo-símile do  $\alpha$ -Humulene em camundongos**", Processo N° 00248/2018.2, foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.

Roseli Barbosa

Membro do CEUA/URCA  
(Portaria nº 120/2018-GR)

CRATO-CE  
2018

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO																						
	Dia 1										Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14
	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min													
Coçar focinho																							
Frequência respiratória																							
Hiperlocomoção																							
Lamber patas																							
Morder cauda																							
Piloereção																							
Tremores finos																							
Tremores grosseiros																							
Analgesia																							
Ataxia																							
Dispneia																							
Frequência respiratória																							
Hipnose																							
Hipolocomoção																							
Perda de apreensão da pata																							
Sedação																							
Contorção abdominal																							
Convulsões																							
Cromodacriorréia																							
Defecação																							
Diarreia																							
Hipotermia																							
Letargia																							
Micção																							
Midríase																							
Miose																							
Paralisia do trem posterior																							
Piloereção																							
Ptose palpebral																							
Salivação																							
Secreção brônquica																							
Sudorese																							
Morte																							
MASSA CORPORAL																							

ANEXO B - Tabela de Malone (1977) adaptada para teste hipocrático.

# APÊNDICES


**APÊNDICE 1 - Coluna Estatística do Número de Entradas nos Braços Abertos no Teste do Labirinto em Cruz Elevado**

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP1	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10
2						
3	Minimum	3	7	3	3	2
4	25% Percentile	4	9.5	4.75	3.75	4.25
5	Median	4.5	11	8.5	5	7
6	75% Percentile	6.25	13	9.25	7	9.25
7	Maximum	7	15	12	9	10
8						
9	Mean	4.9	11.2	7.6	5.2	6.6
10	Std. Deviation	1.37	2.44	2.836	1.932	3.169
11	Std. Error of Mean	0.4333	0.7717	0.8969	0.611	1.002
12						
13	Lower 95% CI	3.92	9.454	5.571	3.818	4.333
14	Upper 95% CI	5.88	12.95	9.629	6.582	8.867
15						
16	Mean ranks	15.65	42.35	28.1	17.1	24.3
17						

**APÊNDICE 2 - Análise do Número de Entradas nos Braços Abertos no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.**

1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	4					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?	
6							
7	CL vs. DZP1	-26.7	Yes	***	0.0001	B	DZP1
8	CL vs. 125	-12.45	No	ns	0.2177	C	125
9	CL vs. 250	-1.45	No	ns	>0.9999	D	250
10	CL vs. 500	-8.65	No	ns	0.7257	E	500
11							
12							
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	
14							
15	CL vs. DZP1	15.65	42.35	-26.7	10	10	
16	CL vs. 125	15.65	28.1	-12.45	10	10	
17	CL vs. 250	15.65	17.1	-1.45	10	10	
18	CL vs. 500	15.65	24.3	-8.65	10	10	
19							

**APÊNDICE 3 – Coluna Estatística do Tempo de Permanência nos Braços Abertos no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.**

 <b>1way ANOVA</b> Descriptive Statistics		CL	DZP1	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10
2						
3	Minimum	38	64	25	31	22
4	25% Percentile	39.75	95.75	40.5	53	39.75
5	Median	49.5	142	91.5	68	79
6	75% Percentile	72	155	108.5	85.25	100.5
7	Maximum	86	168	114	117	111
8						
9	Mean	56	126.9	80.4	70.1	70.8
10	Std. Deviation	17.64	36.09	33.45	24.83	33.51
11	Std. Error of Mean	5.58	11.41	10.58	7.852	10.6
12						
13	Lower 95% CI	43.38	101.1	56.47	52.34	46.83
14	Upper 95% CI	68.62	152.7	104.3	87.86	94.77
15						

**APÊNDICE 4 – Análise do Tempo de Permanência nos Braços Abertos no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.**

1way ANOVA Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	4							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary		A-?			
6									
7	CL vs. DZP1	-70.9	Yes	****		B	DZP1		
8	CL vs. 125	-24.4	No	ns		C	125		
9	CL vs. 250	-14.1	No	ns		D	250		
10	CL vs. 500	-14.8	No	ns		E	500		
11									
12									
13	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	t	DF
14									
15	CL vs. DZP1	56	126.9	-70.9	13.37	10	10	5.301	45
16	CL vs. 125	56	80.4	-24.4	13.37	10	10	1.824	45
17	CL vs. 250	56	70.1	-14.1	13.37	10	10	1.054	45
18	CL vs. 500	56	70.8	-14.8	13.37	10	10	1.107	45




**APÊNDICE 5** – Coluna Estatística do Número de Entrada nos Braços Fechados no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP1	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10
2						
3	Minimum	2	3	5	6	7
4	25% Percentile	4	6.75	7	7	8.75
5	Median	10	9.5	8.5	9.5	10.5
6	75% Percentile	13	11.25	10	11.25	12.25
7	Maximum	13	13	11	13	13
8						
9	Mean	8.8	9	8.4	9.4	10.3
10	Std. Deviation	4.264	2.981	1.776	2.366	2.058
11	Std. Error of Mean	1.348	0.9428	0.5617	0.7483	0.6506
12						
13	Lower 95% CI	5.75	6.867	7.129	7.707	8.828
14	Upper 95% CI	11.85	11.13	9.671	11.09	11.77
15						
16	Mean ranks	26	24.8	20	25.75	30.95
17						

**APÊNDICE 6 – Análise do Número de Entrada nos Braços Fechados no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.**

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	4				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	A-?	
6						
7	CL vs. DZP1	1.2	No	ns	B	DZP1
8	CL vs. 125	6	No	ns	C	125
9	CL vs. 250	0.25	No	ns	D	250
10	CL vs. 500	-4.95	No	ns	E	500
11						
12						
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
14						
15	CL vs. DZP1	26	24.8	1.2	10	10
16	CL vs. 125	26	20	6	10	10
17	CL vs. 250	26	25.75	0.25	10	10
18	CL vs. 500	26	30.95	-4.95	10	10

**APÊNDICE 7 – Coluna Estatística do Tempo de Permanência nos Braços Fechados no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.**

 <b>1way ANOVA</b> Descriptive Statistics		CL	DZP1	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10
2						
3	Minimum	54	41	61	105	98
4	25% Percentile	103.8	61	87.25	123.5	116.5
5	Median	132	96.5	95.5	144.5	156.5
6	75% Percentile	167.5	107.5	131	166.8	180.3
7	Maximum	177	118	156	176	189
8						
9	Mean	129.3	87.1	105.2	144	149.3
10	Std. Deviation	39.9	25.64	28.81	23.62	33.61
11	Std. Error of Mean	12.62	8.11	9.111	7.468	10.63
12						
13	Lower 95% CI	100.8	68.75	84.59	127.1	125.3
14	Upper 95% CI	157.8	105.4	125.8	160.9	173.3
15						



**APÊNDICE 9** – Coluna Estatística do Número de Cruzamentos no Teste do Campo Aberto.

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP2	IMI30	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10	10
2							
3	Minimum	68	27	41	39	72	45
4	25% Percentile	74.5	33.25	59.25	45.25	74.25	51.25
5	Median	83.5	39	69	56.5	84	58.5
6	75% Percentile	87.5	42.5	74	94.75	102.8	61.5
7	Maximum	92	52	77	99	117	63
8							
9	Mean	81.5	38.5	65.3	67	88.7	56.3
10	Std. Deviation	7.634	7.153	11.77	24.92	15.82	6.093
11	Std. Error of Mean	2.414	2.262	3.721	7.88	5.002	1.927
12							
13	Lower 95% CI	76.04	33.38	56.88	49.17	77.38	51.94
14	Upper 95% CI	86.96	43.62	73.72	84.83	100	60.66
15							
16	Mean ranks	44.7	7.25	29.9	30.95	48.2	22
17							

**APÊNDICE 10** – *Analyze* do Número de Cruzamentos no Teste do Campo Aberto.

1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	5					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	A-?		
6							
7	CL vs. DZP2	37.45	Yes	****		B	DZP2
8	CL vs. IMI30	14.8	No	ns		C	IMI30
9	CL vs. 125	13.75	No	ns		D	125
10	CL vs. 250	-3.5	No	ns		E	250
11	CL vs. 500	22.7	Yes	*		F	500
12							
13							
14	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	
15							
16	CL vs. DZP2	44.7	7.25	37.45	10	10	
17	CL vs. IMI30	44.7	29.9	14.8	10	10	
18	CL vs. 125	44.7	30.95	13.75	10	10	
19	CL vs. 250	44.7	48.2	-3.5	10	10	
20	CL vs. 500	44.7	22	22.7	10	10	
21							

**APÊNDICE 11** – Coluna Estatística do Número de *Rearing* no Teste do Campo Aberto.

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP2	IMI30	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10	10
2							
3	Minimum	5	0	0	1	5	0
4	25% Percentile	7.75	0	0	3.75	5	2.5
5	Median	10	0	0	5	6.5	4
6	75% Percentile	12.25	1	1	7.25	11	6.5
7	Maximum	16	1	1	9	12	8
8							
9	Mean	10	0.3	0.4	5.4	7.5	4.2
10	Std. Deviation	3.197	0.483	0.5164	2.413	2.759	2.658
11	Std. Error of Mean	1.011	0.1528	0.1633	0.763	0.8724	0.8406
12							
13	Lower 95% CI	7.713	-0.04555	0.03059	3.674	5.526	2.298
14	Upper 95% CI	12.29	0.6456	0.7694	7.126	9.474	6.102
15							
16	Mean ranks	50.9	10.95	12.1	35.75	43.2	30.1

**APÊNDICE 12** – *Analyze do Número de Rearing no Teste do Campo Aberto.*

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	5				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	A-?	
6						
7	CL vs. DZP2	39.95	Yes	****		B DZP2
8	CL vs. IMI30	38.8	Yes	****		C IMI30
9	CL vs. 125	15.15	No	ns		D 125
10	CL vs. 250	7.7	No	ns		E 250
11	CL vs. 500	20.8	Yes	*		F 500
12						
13						
14	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
15						
16	CL vs. DZP2	50.9	10.95	39.95	10	10
17	CL vs. IMI30	50.9	12.1	38.8	10	10
18	CL vs. 125	50.9	35.75	15.15	10	10
19	CL vs. 250	50.9	43.2	7.7	10	10
20	CL vs. 500	50.9	30.1	20.8	10	10



**APÊNDICE 13** – Coluna Estatística do Número de *Grooming* no Teste do Campo Aberto.

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP2	IMI30	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10	10
2							
3	Minimum	2	1	1	2	1	2
4	25% Percentile	3	1	1	2	2	2
5	Median	4	1	1.5	4	2.5	2.5
6	75% Percentile	4.25	2	2	5.25	3.5	3.25
7	Maximum	5	3	3	6	5	4
8							
9	Mean	3.7	1.4	1.6	3.8	2.8	2.7
10	Std. Deviation	0.9487	0.6992	0.6992	1.549	1.317	0.8233
11	Std. Error of Mean	0.3	0.2211	0.2211	0.4899	0.4163	0.2603
12							
13	Lower 95% CI	3.021	0.8998	1.1	2.692	1.858	2.111
14	Upper 95% CI	4.379	1.9	2.1	4.908	3.742	3.289
15							
16	Mean ranks	44.65	13.35	16.55	42.95	32.65	32.85
17							

**APÊNDICE 14** – *Analyze* do Número de *Grooming* no Teste do Campo Aberto.

1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	5					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	A-?		
6							
7	CL vs. <b>DZP2</b>	31.3	Yes	***		B	<b>DZP2</b>
8	CL vs. <b>IMI30</b>	28.1	Yes	**		C	<b>IMI30</b>
9	CL vs. <b>125</b>	1.7	No	ns		D	<b>125</b>
10	CL vs. <b>250</b>	12	No	ns		E	<b>250</b>
11	CL vs. <b>500</b>	11.8	No	ns		F	<b>500</b>
12							
13							
14	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	
15							
16	CL vs. <b>DZP2</b>	44.65	13.35	31.3	10	10	
17	CL vs. <b>IMI30</b>	44.65	16.55	28.1	10	10	
18	CL vs. <b>125</b>	44.65	42.95	1.7	10	10	
19	CL vs. <b>250</b>	44.65	32.65	12	10	10	
20	CL vs. <b>500</b>	44.65	32.85	11.8	10	10	

**APÊNDICE 15** – Coluna Estatística do Número de Quedas no Teste do *Rota-rod*.

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP5	IMI30	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10	10
2							
3	Minimum	0	1	0	0	0	0
4	25% Percentile	0	1	0	0	0	0
5	Median	0	1	0	0	0	0.5
6	75% Percentile	0	2	0	0.25	0	1
7	Maximum	0	2	0	1	0	1
8							
9	Mean	0	1.4	0	0.2	0	0.5
10	Std. Deviation	0	0.5164	0	0.4216	0	0.527
11	Std. Error of Mean	0	0.1633	0	0.1333	0	0.1667
12							
13	Lower 95% CI	0	1.031	0	-0.1016	0	0.123
14	Upper 95% CI	0	1.769	0	0.5016	0	0.877
15							
16	Mean ranks	22	53.4	22	27.6	22	36

## APÊNDICE 16 – Análise do Número de Quedas no Teste do *Rota-rod*.


1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	5					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	A-?		
6							
7	CL vs. DZP5	-31.4	Yes	****		B	DZP5
8	CL vs. IMI30	0	No	ns		C	IMI30
9	CL vs. 125	-5.6	No	ns		D	125
10	CL vs. 250	0	No	ns		E	250
11	CL vs. 500	-14	No	ns		F	500
12							
13							
14	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	
15							
16	CL vs. DZP5	22	53.4	-31.4	10	10	
17	CL vs. IMI30	22	22	0	10	10	
18	CL vs. 125	22	27.6	-5.6	10	10	
19	CL vs. 250	22	22	0	10	10	
20	CL vs. 500	22	36	-14	10	10	

**APÊNDICE 17** – Coluna Estatística do Tempo de Permanência no Teste do *Rota-rod*.

1way ANOVA Descriptive Statistics		CL	DZP5	IMI30	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10	10
2							
3	Minimum	60	35	60	58	60	53
4	25% Percentile	60	49.5	60	60	60	56.5
5	Median	60	51	60	60	60	59
6	75% Percentile	60	55.5	60	60	60	60
7	Maximum	60	57	60	60	60	60
8							
9	Mean	60	50.7	60	59.8	60	58
10	Std. Deviation	0	6.308	0	0.6325	0	2.494
11	Std. Error of Mean	0	1.995	0	0.2	0	0.7888
12							
13	Lower 95% CI	60	46.19	60	59.35	60	56.22
14	Upper 95% CI	60	55.21	60	60.25	60	59.78
15							



**APÊNDICE 19** – Coluna Estatística do Tempo de Imobilidade no Teste do Nado Forçado.


 <b>1way ANOVA</b>						
Descriptive Statistics		SALINA	IMIP 30	125	250	500
1	Number of values	10	10	10	10	10
2						
3	Minimum	122	0	35	25	43
4	25% Percentile	139.8	4	41.5	45.25	47.75
5	Median	158.5	14	50	49.5	60
6	75% Percentile	180.8	22	57.75	73.5	74
7	Maximum	183	40	72	75	95
8						
9	Mean	158.4	14.7	50.7	54.3	62.6
10	Std. Deviation	22.46	13.17	11.07	16.23	16.02
11	Std. Error of Mean	7.101	4.163	3.499	5.132	5.064
12						
13	Lower 95% CI	142.3	5.282	42.78	42.69	51.14
14	Upper 95% CI	174.5	24.12	58.62	65.91	74.06

## APÊNDICE 20 – *Analyze* do Tempo de Imobilidade no Teste do Nado Forçado.

1way ANOVA Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	4							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?		
6									
7	SALINA vs. IMIP 30	143.7	125.3 to 162.1	Yes	****	0.0001	B	IMIP 30	
8	SALINA vs. 125	107.7	89.31 to 126.1	Yes	****	0.0001	C	125	
9	SALINA vs. 250	104.1	85.71 to 122.5	Yes	****	0.0001	D	250	
10	SALINA vs. 500	95.8	77.41 to 114.2	Yes	****	0.0001	E	500	
11									
12									
13	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
14									
15	SALINA vs. IMIP 30	158.4	14.7	143.7	7.266	10	10	19.78	45
16	SALINA vs. 125	158.4	50.7	107.7	7.266	10	10	14.82	45
17	SALINA vs. 250	158.4	54.3	104.1	7.266	10	10	14.33	45
18	SALINA vs. 500	158.4	62.6	95.8	7.266	10	10	13.18	45



**APÊNDICE 21 – Coluna Estatística do Latência para Imobilidade no Teste do Nado Forçado.**

 <b>1way ANOVA</b> Descriptive Statistics		SALINA	IMIP 30	125	250	500
		1	Number of values	10	10	10
2						
3	Minimum	18	120	62	65	56
4	25% Percentile	23	137.8	63	69.25	61.75
5	Median	25	152.5	75.5	98	67.5
6	75% Percentile	36.25	176.8	88.75	112	73.5
7	Maximum	50	191	107	129	79
8						
9	Mean	29.6	155	78.4	94.1	67.8
10	Std. Deviation	10.33	23.75	15.31	22.94	7.162
11	Std. Error of Mean	3.267	7.511	4.84	7.253	2.265
12						
13	Lower 95% CI	22.21	138	67.45	77.69	62.68
14	Upper 95% CI	36.99	172	89.35	110.5	72.92
15						





APÊNDICE 24 – Análise do Teste de Acinesia Induzida por Reserpina.

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	28				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary		
6						
7	SL vs. RES10	54.19	Yes	****		A-B
8	SL vs. IMIP30	27.31	No	ns		A-C
9	SL vs. BUP20	13.13	No	ns		A-D
10	SL vs. FLU10	24.31	No	ns		A-E
11	SL vs. $\alpha$ -Humuleno 125	39.19	Yes	***		A-F
12	SL vs. $\alpha$ -Humuleno 250	34.5	Yes	**		A-G
13	SL vs. $\alpha$ -Humuleno 500	31.38	Yes	*		A-H
14	RES10 vs. IMIP30	-26.88	No	ns		B-C
15	RES10 vs. BUP20	-41.06	Yes	***		B-D
16	RES10 vs. FLU10	-29.88	Yes	*		B-E
17	RES10 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	-15	No	ns		B-F
18	RES10 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	-19.69	No	ns		B-G
19	RES10 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	-22.81	No	ns		B-H
20	IMIP30 vs. BUP20	-14.19	No	ns		C-D
21	IMIP30 vs. FLU10	-3	No	ns		C-E
22	IMIP30 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	11.88	No	ns		C-F
23	IMIP30 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	7.188	No	ns		C-G
24	IMIP30 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	4.063	No	ns		C-H
25	BUP20 vs. FLU10	11.19	No	ns		D-E
26	BUP20 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	26.06	No	ns		D-F
27	BUP20 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	21.38	No	ns		D-G
28	BUP20 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	18.25	No	ns		D-H
29	FLU10 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	14.88	No	ns		E-F
30	FLU10 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	10.19	No	ns		E-G
31	FLU10 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	7.063	No	ns		E-H
32	$\alpha$ -Humuleno 125 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	-4.688	No	ns		F-G
33	$\alpha$ -Humuleno 125 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	-7.813	No	ns		F-H
34	$\alpha$ -Humuleno 250 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	-3.125	No	ns		G-H
35						
36						
37	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
38						
39	SL vs. RES10	60.5	6.313	54.19	8	8
40	SL vs. IMIP30	60.5	33.19	27.31	8	8
41	SL vs. BUP20	60.5	47.38	13.13	8	8
42	SL vs. FLU10	60.5	36.19	24.31	8	8
43	SL vs. $\alpha$ -Humuleno 125	60.5	21.31	39.19	8	8
44	SL vs. $\alpha$ -Humuleno 250	60.5	26	34.5	8	8
45	SL vs. $\alpha$ -Humuleno 500	60.5	29.13	31.38	8	8
46	RES10 vs. IMIP30	6.313	33.19	-26.88	8	8
47	RES10 vs. BUP20	6.313	47.38	-41.06	8	8
48	RES10 vs. FLU10	6.313	36.19	-29.88	8	8
49	RES10 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	6.313	21.31	-15	8	8
50	RES10 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	6.313	26	-19.69	8	8
51	RES10 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	6.313	29.13	-22.81	8	8
52	IMIP30 vs. BUP20	33.19	47.38	-14.19	8	8
53	IMIP30 vs. FLU10	33.19	36.19	-3	8	8
54	IMIP30 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	33.19	21.31	11.88	8	8
55	IMIP30 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	33.19	26	7.188	8	8
56	IMIP30 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	33.19	29.13	4.063	8	8
57	BUP20 vs. FLU10	47.38	36.19	11.19	8	8
58	BUP20 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	47.38	21.31	26.06	8	8
59	BUP20 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	47.38	26	21.38	8	8
60	BUP20 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	47.38	29.13	18.25	8	8
61	FLU10 vs. $\alpha$ -Humuleno 125	36.19	21.31	14.88	8	8
62	FLU10 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	36.19	26	10.19	8	8
63	FLU10 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	36.19	29.13	7.063	8	8
64	$\alpha$ -Humuleno 125 vs. $\alpha$ -Humuleno 250	21.31	26	-4.688	8	8
65	$\alpha$ -Humuleno 125 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	21.31	29.13	-7.813	8	8
66	$\alpha$ -Humuleno 250 vs. $\alpha$ -Humuleno 500	26	29.13	-3.125	8	8
67						



APÊNDICE 26 – Análise do TI no Teste de Potencialização – Imipramina.

1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	15					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary		
6							
7	VEÍCULO vs. IMI30	64.38	29.47 to 99.28	Yes	****		A-B
8	VEÍCULO vs. $\alpha$ -HUMU125	19.25	-15.66 to 54.16	No	ns		A-C
9	VEÍCULO vs. IMI0,3	6.125	-28.78 to 41.03	No	ns		A-D
10	VEÍCULO vs. $\alpha$ -HUMU1,25	24.38	-10.53 to 59.28	No	ns		A-E
11	VEÍCULO vs. IMI0,3 + $\alpha$ -HUMU1,25	12	-22.91 to 46.91	No	ns		A-F
12	IMI30 vs. $\alpha$ -HUMU125	-45.13	-80.03 to -10.22	Yes	**		B-C
13	IMI30 vs. IMI0,3	-58.25	-93.16 to -23.34	Yes	***		B-D
14	IMI30 vs. $\alpha$ -HUMU1,25	-40	-74.91 to -5.094	Yes	*		B-E
15	IMI30 vs. IMI0,3 + $\alpha$ -HUMU1,25	-52.38	-87.28 to -17.47	Yes	***		B-F
16	$\alpha$ -HUMU125 vs. IMI0,3	-13.13	-48.03 to 21.78	No	ns		C-D
17	$\alpha$ -HUMU125 vs. $\alpha$ -HUMU1,25	5.125	-29.78 to 40.03	No	ns		C-E
18	$\alpha$ -HUMU125 vs. IMI0,3 + $\alpha$ -HUMU1,25	-7.25	-42.16 to 27.66	No	ns		C-F
19	IMI0,3 vs. $\alpha$ -HUMU1,25	18.25	-16.66 to 53.16	No	ns		D-E
20	IMI0,3 vs. IMI0,3 + $\alpha$ -HUMU1,25	5.875	-29.03 to 40.78	No	ns		D-F
21	$\alpha$ -HUMU1,25 vs. IMI0,3 + $\alpha$ -HUMU1,25	-12.38	-47.28 to 22.53	No	ns		E-F
22							
23							



APÊNDICE 28 – Análise do TI no Teste de Potencialização – Bupropiona.

1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	15					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary		
6							
7	VEÍCULO vs. BUP20	73.25	39.11 to 107.4	Yes	****		A-B
8	VEÍCULO vs. $\alpha$ -HUMU125	19.25	-14.89 to 53.39	No	ns		A-C
9	VEÍCULO vs. BUP0,2	-4.125	-38.27 to 30.02	No	ns		A-D
10	VEÍCULO vs. $\alpha$ -HUMU1,25	24.38	-9.768 to 58.52	No	ns		A-E
11	VEÍCULO vs. BUP0,2 + $\alpha$ -HUMU1,25	36.75	2.607 to 70.89	Yes	*		A-F
12	BUP20 vs. $\alpha$ -HUMU125	-54	-88.14 to -19.86	Yes	***		B-C
13	BUP20 vs. BUP0,2	-77.38	-111.5 to -43.23	Yes	****		B-D
14	BUP20 vs. $\alpha$ -HUMU1,25	-48.88	-83.02 to -14.73	Yes	**		B-E
15	BUP20 vs. BUP0,2 + $\alpha$ -HUMU1,25	-36.5	-70.64 to -2.357	Yes	*		B-F
16	$\alpha$ -HUMU125 vs. BUP0,2	-23.38	-57.52 to 10.77	No	ns		C-D
17	$\alpha$ -HUMU125 vs. $\alpha$ -HUMU1,25	5.125	-29.02 to 39.27	No	ns		C-E
18	$\alpha$ -HUMU125 vs. BUP0,2 + $\alpha$ -HUMU1,25	17.5	-16.64 to 51.64	No	ns		C-F
19	BUP0,2 vs. $\alpha$ -HUMU1,25	28.5	-5.643 to 62.64	No	ns		D-E
20	BUP0,2 vs. BUP0,2 + $\alpha$ -HUMU1,25	40.88	6.732 to 75.02	Yes	*		D-F
21	$\alpha$ -HUMU1,25 vs. BUP0,2 + $\alpha$ -HUMU1,25	12.38	-21.77 to 46.52	No	ns		E-F
22							
23							





**APÊNDICE 30** – *Analyse do TI no Teste de Potencialização – Fluoxetina.*

1way ANOVA Multiple comparisons							
1	Number of families	1					
2	Number of comparisons per family	15					
3	Alpha	0.05					
4							
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary		
6							
7	VEÍCULO vs. FLU10	37.75	2.292 to 73.21	Yes	*		A-B
8	VEÍCULO vs. $\alpha$ -HUMU125	19.25	-16.21 to 54.71	No	ns		A-C
9	VEÍCULO vs. FLU0,1	-5.875	-41.33 to 29.58	No	ns		A-D
10	VEÍCULO vs. $\alpha$ -hHUMU1,25	24.38	-11.08 to 59.83	No	ns		A-E
11	VEÍCULO vs. FLU0,1 + $\alpha$ -HUMU1,25	20.63	-14.83 to 56.08	No	ns		A-F
12	FLU10 vs. $\alpha$ -HUMU125	-18.5	-53.96 to 16.96	No	ns		B-C
13	FLU10 vs. FLU0,1	-43.63	-79.08 to -8.167	Yes	**		B-D
14	FLU10 vs. $\alpha$ -hHUMU1,25	-13.38	-48.83 to 22.08	No	ns		B-E
15	FLU10 vs. FLU0,1 + $\alpha$ -HUMU1,25	-17.13	-52.58 to 18.33	No	ns		B-F
16	$\alpha$ -HUMU125 vs. FLU0,1	-25.13	-60.58 to 10.33	No	ns		C-D
17	$\alpha$ -HUMU125 vs. $\alpha$ -hHUMU1,25	5.125	-30.33 to 40.58	No	ns		C-E
18	$\alpha$ -HUMU125 vs. FLU0,1 + $\alpha$ -HUMU1,25	1.375	-34.08 to 36.83	No	ns		C-F
19	FLU0,1 vs. $\alpha$ -hHUMU1,25	30.25	-5.208 to 65.71	No	ns		D-E
20	FLU0,1 vs. FLU0,1 + $\alpha$ -HUMU1,25	26.5	-8.958 to 61.96	No	ns		D-F
21	$\alpha$ -hHUMU1,25 vs. FLU0,1 + $\alpha$ -HUMU1,25	-3.75	-39.21 to 31.71	No	ns		E-F
22							

**APÊNDICE 31 – Coluna Estatística da Dosagem do Conteúdo de Nitrito nos Animais Submetidos ao TNF.**

Col. stats		A	B	C	D	E	F
		CL	SL	$\alpha$ -HUMULENO 125	Title	Title	Title
		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	8	8	8			
2							
3	Minimum	4.91	13.61	6.86			
4	25% Percentile	6.41	14.51	11.44			
5	Median	8.885	18.19	13.61			
6	75% Percentile	20.33	34.18	16.92			
7	Maximum	37.63	43.79	25.92			
8							
9	Mean	13.54	22.96	14.38			
10	Std. Deviation	11.33	11.69	5.598			
11	Std. Error of Mean	4.005	4.133	1.979			
12							
13	Lower 95% CI of mean	4.068	13.18	9.702			
14	Upper 95% CI of mean	23.01	32.73	19.06			
15							
16	Sum	108.3	183.7	115.1			
17							
18	D'Agostino & Pearson normality test						
19	K2	7.814	2.455	4.936			
20	P value	0.0201	0.2930	0.0847			
21	Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	Yes			
22	P value summary	*	ns	ns			
23							







