

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA
UEL/UEPG/UNICENTRO**

ANA CAROLINA MENDES HACKE

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS E
COMPOSTOS DE DUAS ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS**

**PONTA GROSSA
2021**

ANA CAROLINA MENDES HACKE

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS E
COMPOSTOS DE DUAS ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Química na Universidade Estadual de Ponta Grossa,
área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Romaiana Picada Pereira.
Coorientadora: Prof. Dr^a. Jacqueline Aparecida
Marques.

**PONTA GROSSA
2021**

H118 Hacke, Ana Carolina Mendes
Avaliação das propriedades biológicas de extratos e compostos de duas espécies de plantas medicinais / Ana Carolina Mendes Hacke. Ponta Grossa, 2021.
199 f.
Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira.
Coorientadora: Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques.
1. *Cymbopogon citratus*. 2. Citral. 3. Geraniol. 4. Peixe-zebra. 5. *Cannabis sativa*. I. Pereira, Romaiana Picada. II. Marques, Jacqueline Aparecida. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

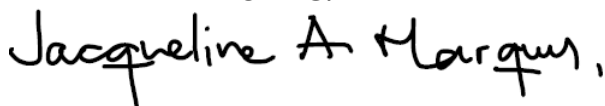
ANA CAROLINA MENDES HACKE

“AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS E COMPOSTOS DE DUAS ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira (Orientadora)
UEPG/PR



Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques (Coorientadora)
UEPG/PR



Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana
UEPG/PR



Prof. Dr. Edmar Miyoshi
UEPG/PR



Profa. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
UFSM/RS



Prof. Dr. Jorge Iulek
UEPG/PR

Ponta Grossa, 30 de setembro de 2021.

Ao meu esposo, Dhésmon Lima
Aos meus pais, Maria Alice e Orestes
Ao meu irmão, Carlos Henrique.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria em conduzir este trabalho e pela presença constante em minha vida.

Ao meu querido esposo Dhésmon, por todo o apoio e ajuda. Por sempre acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos. Por todo o companheirismo e paciência, e por me fazer sempre feliz!

Agradeço aos meus amados pais, Maria Alice e Orestes, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Por todos os conselhos, por sempre acreditarem em mim e me confortarem nos momentos em que mais precisei. Ao meu irmão, Carlos Henrique, por todo o apoio e amizade, e por me encorajar sempre!

Agradeço à professora Dr^a. Romaiana Picada Pereira, pela orientação e ensinamentos durante os anos de mestrado e doutorado. Obrigada à minha coorientadora, professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Marques, por todos os conselhos e conhecimentos a mim passados. Muito obrigada pela confiança e pelos bons momentos que passamos juntas durante estes seis anos!

Ao professor Dr. Kagan Kerman, da Universidade de Toronto Scarborough (UTSC), por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pela confiança em mim depositada para desenvolver o projeto da “Canabis”. A todos os amigos que fiz durante este período por toda a ajuda e acolhimento.

À minha querida “aluna de iniciação científica” Julie, por toda a ajuda, e por sempre me socorrer no laboratório. Por todos os momentos de descontração e conversas desde o mestrado, o que tornou este período mais leve. Obrigada por sua amizade!

Aos meus grandes amigos Rafael, Douglas e Tânia, por todo o apoio e por sempre estarem presentes em todos os momentos!

A Sandrinha, Gisele e Rossana por sempre realizarem as coletas de sangue, o que permitiu a execução deste trabalho! Obrigada! Gostaria de agradecer também a todos os voluntários pela doação de sangue para a execução desta pesquisa.

Ao professor Dr. Edmar Miyoshi, por ceder o espaço de seu laboratório para a execução deste trabalho, e por toda a ajuda e disponibilidade.

Ao Complexo de Laboratório Multiusuários da UEPG (C-Labmu), em especial à Vanessa, pela disponibilidade e realização de todas as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, o que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, que constituiu a base de toda a minha formação, construída ao longo destes últimos doze anos. Ao Programa de Pós-Graduação em

Química Associação UEL/UEPG/UNICENTRO por toda a assistência e disponibilidade ao longo destes anos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho e me apoiaram durante estes quatros anos de doutorado.

Muito obrigada!

*“Dificuldades preparam pessoas comuns
para destinos extraordinários.”*

C. S. Lewis

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas na prevenção de doenças desde o início da civilização humana e as suas propriedades terapêuticas estão relacionadas à composição química de seus extratos brutos. A *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*), popularmente conhecida como capim-limão, é utilizada em vários países devido à sua ação no sistema nervoso central. Entretanto, apesar dos inúmeros efeitos terapêuticos das plantas medicinais, é comprovado que alguns extratos podem ser potencialmente tóxicos para os seres humanos. Desta forma, é importante a avaliação da possível toxicidade exercida por extratos e compostos relacionados da *C. citratus*. Neste estudo, a citotoxicidade de extratos e frações obtidos a partir de diferentes métodos de extração, assim como o óleo essencial e seus principais constituintes químicos, citral e geraniol, foi avaliada pelo ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*, e a células sanguíneas humanas (leucócitos e eritrócitos). As frações acetato de etila obtidas em meios ácido e básico, e após a prévia remoção do óleo essencial das folhas da planta, reduziram a viabilidade celular dos leucócitos. Além disso, o óleo essencial, citral e geraniol também foram citotóxicos para estas células na concentração mais alta avaliada. Estas amostras aumentaram a fragilidade osmótica dos eritrócitos, e as análises de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) revelaram que houve alterações na morfologia destas células. Neste trabalho, as atividades ansiolítica e anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. citratus*, do citral e do geraniol (isolados e em associação) foram avaliadas em peixe-zebra. O teste claro/escuro demonstrou que o tratamento prévio com as amostras aumentou o tempo de permanência no lado claro do aquário pelos animais, assim o tempo de latência para a primeira convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ), indicando ação ansiolítica e anticonvulsivante, respectivamente. A mistura entre citral e geraniol nas menores concentrações investigadas em cada teste também apresentou efeito significativo, que foi, todavia, bloqueados quando os animais foram previamente expostos a uma solução de flumazenil (FMZ), o que revela o envolvimento dos receptores GABA_A no mecanismo de ação dos compostos estudados. Além disso, o tratamento prévio dos animais com as amostras restaurou os níveis de malondialdeído (MDA), catalase (CAT), óxido nítrico (NO) e glutathione (GSH) nos homogenatos de cérebro após a exposição dos peixes ao PTZ. Neste estudo, a atividade antioxidante da *Cannabis sativa* (*C. sativa*), uma planta utilizada para fins recreativos e medicinais em alguns países, e dos seus principais constituintes químicos, canabidiol (CBD) e tetrahydrocannabinol (THC) (isolados e em associação) também foi investigada. Neste sentido, métodos espectrofotométricos (poder redutor, e sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) e ácido hipocloroso (HOCl)), e métodos eletroquímicos (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) foram empregados para a avaliação da atividade antioxidante. Todas as amostras exibiram considerável efeito antioxidante em todos os métodos utilizados. Além disso, foi observado efeito sinérgico entre estes canabinóides na atividade antioxidante. Análises de correlação de Pearson demonstraram uma boa correlação entre os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos, o que indicou que estas técnicas são úteis na avaliação da atividade antioxidante de canabinóides. Assim, os resultados obtidos na presente tese reforçaram a importância das plantas medicinais na descoberta de novos fármacos assim como comprovaram as suas propriedades terapêuticas.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*; citral; geraniol; citotoxicidade; ansiedade; epilepsia; peixe-zebra; *Cannabis sativa*; antioxidante.

ABSTRACT

Medicinal plants have been employed in the prevention of diseases since the beginning of human civilization, and their therapeutic properties are related with the chemical composition of their crude extracts. *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*), popularly known as lemongrass, is worldwide consumed due to its action on the central nervous system. However, despite the therapeutic effects of medicinal plants to humans, it has already proven that some extracts can exhibit some toxicity. In this way, it is important to evaluate the toxicity of its extracts and related compounds. In this study, the toxicity of *C. citratus* extracts and fractions obtained from different extraction procedures, as well as for essential oil and its main chemical compounds, citral and geraniol, was evaluated in *Artemia salina*, and in human blood cells (leukocytes and erythrocytes). The ethyl acetate fractions obtained in acidic and basic conditions after essential oil removal from plant leaves, reduced the cell viability of leukocytes. Furthermore, the essential oil, citral and geraniol were also cytotoxic to these cells at the highest concentration analyzed. These samples also increased the osmotic fragility of erythrocytes, and field emission scanning electron microscopy (FESEM) analyzes revealed changes in the erythrocytes morphology. In this work, the anxiolytic and anticonvulsant effects of *C. citratus* hydroalcoholic extract and essential oil, citral and geraniol (isolated and in association) were evaluated in zebrafish. The light/dark test demonstrated that pretreatment with the samples increased the time spent by the animals in the light side of the tank and increased the latency time for the first seizure induced by pentylenetetrazole (PTZ), indicating anxiolytic and anticonvulsant effects, respectively. The mixture between citral and geraniol at the lowest concentrations employed in each test also showed a significant effect. These effects were antagonized when animals were previously exposed to flumazenil (FMZ) solution, which revealed the involvement of GABA_A receptors in the effects. Moreover, pretreatment with samples restored malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), nitric oxide (NO) and glutathione (GSH) levels in zebrafish brain homogenates after PTZ exposure. In this study, the antioxidant activity of *Cannabis sativa* (*C. sativa*), a medicinal plant used for recreational and medicinal purposes in some countries, and its major constituents, cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC) (isolated and in association) was also investigated. Therefore, spectrophotometric (reducing power ability, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and hypochlorous acid (HOCl) scavenger assays), and electrochemical assays (cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry) were employed. All samples exhibited a significant antioxidant effect in the assays used in this study. Furthermore, a synergistic effect between these cannabinoids in the antioxidant activity was verified. Pearson's correlation analysis showed a good correlation between the results obtained by spectrophotometric and electrochemical assays, which indicated that these techniques can be employed in the evaluation of samples containing cannabinoids. Thus, the results obtained in the present thesis evidenced the importance of medicinal plants in the discovery of new drugs and their therapeutic properties.

Keywords: *Cymbopogon citratus*; citral; geraniol; anxiety; cytotoxicity; epilepsy; zebrafish; *Cannabis sativa*; antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	–	Biossíntese dos precursores de terpenos, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalilfosfato (DMAPP) pela rota do ácido mevalônico (MVA).....	28
Figura 1.2	–	Biossíntese dos precursores de terpenos, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalilfosfato (DMAPP) pela rota do metileritritol fosfato (MEP).....	28
Figura 1.3	–	Biossíntese de terpenos.....	29
Figura 1.4	–	Estrutura química do ácido hidroxicinâmico e hidroxibenzóico..	30
Figura 1.5	–	Estrutura geral dos flavonoides (2-fenil-benzopirano).....	31
Figura 1.6	–	<i>Cymbopogon citratus</i>	32
Figura 1.7	–	Estrutura química dos principais ácidos fenólicos identificados na <i>Cymbopogon citratus</i>	33
Figura 1.8	–	Estrutura química dos principais flavonoides presentes na <i>Cymbopogon citratus</i>	34
Figura 1.9	–	Estrutura química dos principais constituintes químicos do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	36
Figura 1.10	–	Estrutura química do neral e geranial.....	37
Figura 1.11	–	Estrutura química do geraniol e nerol.....	37
Figura 1.12	–	Biossíntese do geraniol e citral em espécies de <i>Cymbopogon</i>	38
Figura 1.13	–	Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 1.....	42
Figura 1.14	–	Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 2.....	43
Figura 1.15	–	Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 3.....	44
Figura 1.16	–	Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 4.....	45
Figura 1.17	–	<i>Artemia salina</i>	48
Figura 1.18	–	Estrutura de um eritrócito normal e hemólise.....	54
Figura 1.19	–	Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com os extratos de <i>Cymbopogon citratus</i> a) INF; b) EtOH e c) HEtOH, após 3 horas de exposição a 37 °C.....	55
Figura 1.20	–	Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com frações de <i>Cymbopogon citratus</i> a) CHCl ₃ F1; b) AcOEt F1 e c) AQL F1 após 3 horas de exposição a 37 °C.....	56
Figura 1.21	–	Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com as frações de <i>Cymbopogon citratus</i> . a) AcOEt pH 8 F2 e b) AcOEt pH 4 F2 após 3 horas de exposição a 37 °C.....	57
Figura 1.22	–	Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com as frações de <i>Cymbopogon citratus</i> . a) CHCl ₃ F3; b) AcOEt pH 8 F3 e c) AcOEt pH 4 F3 após 3 horas de exposição a 37 °C.....	58

Figura 1.23	–	Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com as frações de <i>Cymbopogon citratus</i> . a) CHCl ₃ F4; b) AcOEt pH 8 F4; c) AcOEt pH 4 F4 após 3 horas de exposição a 37 °C.....	59
Figura 1.24	–	Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com a) óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> ; b) citral; c) geraniol após 3 horas de exposição a 37 °C a diferentes concentrações.....	60
Figura 1.25	–	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) dos eritrócitos humanos previamente tratados a 37 °C durante 3 horas com (a) PBS; (b) etanol; (c) INF; (d) EtOH; (e) HEtOH; (f) CHCl ₃ F1; (g) AcOEt F1; (h) AQL F1; (i) AcOEt pH 8 F2; (j) AcOEt pH 4 F2; (k) CHCl ₃ F3; (l) AcOEt pH 8 F3; (m) AcOEt pH 4 F3; (n) CHCl ₃ F4; (o) AcOEt pH 8 F4 e (p) AcOEt pH 4 F4 de <i>Cymbopogon citratus</i> na concentração de 400 µg mL ⁻¹	62
Figura 1.26	–	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) dos eritrócitos humanos previamente tratados a 37 °C durante 3 horas com (a) PBS; (b) etanol; (c) INF; (d) EtOH; (e) HEtOH; (f) CHCl ₃ F1; (g) AcOEt F1; (h) AQL F1; (i) AcOEt pH 8 F2; (j) AcOEt pH 4 F2; (k) CHCl ₃ F3; (l) AcOEt pH 8 F3; (m) AcOEt pH 4 F3; (n) CHCl ₃ F4; (o) AcOEt pH 8 F4 e (p) AcOEt pH 4 F4 de <i>Cymbopogon citratus</i> na concentração de 200 µg mL ⁻¹	63
Figura 1.27	–	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) dos eritrócitos humanos previamente tratados a 37 °C durante 3 horas com (a) óleo essencial 100 µg mL ⁻¹ ; (b) óleo essencial 200 µg mL ⁻¹ ; (c) óleo essencial 400 µg mL ⁻¹ de <i>Cymbopogon citratus</i> (d) citral 100 µg mL ⁻¹ ; (e) citral 200 µg mL ⁻¹ ; (f) citral 400 µg mL ⁻¹ ; (g) geraniol 100 µg mL ⁻¹ ; (h) geraniol 200 µg mL ⁻¹ e (i) geraniol 400 µg mL ⁻¹	65
Figura 2.1	–	Representação das crises epiléticas. Eletroencefalograma (EEG) de um (a) cérebro sem convulsões; (b) cérebro com convulsões parciais e (c) cérebro com convulsões generalizadas.....	70
Figura 2.2	–	Fitoquímicos como ligantes dos receptores GABA _A	71
Figura 2.3	–	Representação esquemática do receptor GABA _A . (a) Estrutura pentamérica do receptor GABA _A . (b) Principais sítios de ligação no receptor GABA _A	74
Figura 2.4	–	Peixe-zebra.....	75
Figura 2.5	–	Estrutura química do pentilenotetrazol (PTZ).....	79
Figura 2.6	–	Aparato experimental para execução do teste claro/escuro em peixe-zebra.....	85
Figura 2.7	–	Esquema representativo do teste de atividade anticonvulsivante em peixe-zebra induzido por PTZ.....	86
Figura 2.8	–	Estrutura química do clonazepam.....	90
Figura 2.9	–	Efeitos do (a, b, c) óleo essencial e do (d, e, f) extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (n=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os	

	compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $< 0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	91
Figura 2.10	– Efeitos do (a, b, c) citral e do (d, e, f) geraniol no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (n=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $< 0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	94
Figura 2.11	– Efeitos da (a, b, c) mistura citral e geraniol (1 mg L ⁻¹) no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. ** $< 0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	95
Figura 2.12	– Estrutura química do flumazenil.....	97
Figura 2.13	– Efeitos da exposição do flumazenil 1,25 mg L ⁻¹ (FMZ) prévia ao (a, b, c) óleo essencial e ao (d, e, f) extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	98
Figura 2.14	– Efeitos da exposição do flumazenil 1,25 mg L ⁻¹ (FMZ) prévia ao (a, b, c) citral e ao (d, e, f) geraniol no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $< 0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	99
Figura 2.15	– Efeitos da exposição do flumazenil 1,25 mg L ⁻¹ (FMZ) prévia a (a, b, c) mistura entre citral e geraniol (1 mg L ⁻¹) no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	100
Figura 2.16	– Tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) induzida por PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ para os grupos de peixes previamente expostos ao (a) óleo essencial (OE) (5, 10 e 20 mg L ⁻¹), (b) extrato hidroalcoólico (E1) (1, 2 e 3 g L ⁻¹) e para o controle positivo clonazepam (CLZ) 0,75 mg L ⁻¹ e o efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ). Os resultados são	

	apresentados como a média $\pm$ erro padrão dos experimentos (N = 12 animais por grupo). **p < 0,01 ou *** p < 0,001 vs veículo ou grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	103
Figura 2.17	– Tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) induzida por PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ para os grupos de peixes previamente expostos ao (a) citral (5, 10 e 20 mg L ⁻¹), (b) geraniol (5, 10 e 20 mg L ⁻¹) e (c) CIT + GER (5 mg L ⁻¹) e para o controle positivo clonazepam (CLZ) 0,75 mg L ⁻¹ e o efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão dos experimentos (N = 12 animais por grupo). **p < 0,01 ou *** p < 0,001 vs veículo ou grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).....	104
Figura 2.18	– Porcentagem de animais que atingiram os estágios (1 – 5) em função do tempo. (a) PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ , (b) veículo e (c) clonazepam 0,75 mg L ⁻¹	106
Figura 2.19	– Porcentagem de animais que atingiram os estágios (1 – 5) em função do tempo previamente tratados com (a) óleo essencial (20 mg L ⁻¹) e (b) extrato hidroalcoólico 3 g L ⁻¹ e expostos ao PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ durante 20 minutos.....	107
Figura 2.20	– Porcentagem de animais que atingiram os estágios (1 – 5) em função do tempo previamente tratados com (a) citral (10 mg L ⁻¹), (b) geraniol (10 mg L ⁻¹), (c) citral + geraniol (5 mg L ⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ durante 20 minutos.....	108
Figura 2.21	– Teor de malondialdeído (MDA) nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L ⁻¹) e extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> (E1) (3 g L ⁻¹), citral (20 mg L ⁻¹), geraniol (20 mg L ⁻¹), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L ⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ e para o controle clonazepam (CLZ) 0,75 mg L ⁻¹ . *** p < 0,001 e ** p < 0,01 vs grupo controle.....	112
Figura 2.22	– Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA).....	112
Figura 2.23	– Conteúdo de GSH nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L ⁻¹) e extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> (E1) (3 g L ⁻¹), citral (20 mg L ⁻¹), geraniol (20 mg L ⁻¹), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L ⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ e para o controle clonazepam (CLZ) 0,75 mg L ⁻¹ . ** p < 0,01 e * p < 0,05 vs grupo controle.....	114
Figura 2.24	– Mecanismo de detecção da glutathiona (GSH).....	114
Figura 2.25	– Atividade da enzima catalase (CAT) nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L ⁻¹) e extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> (E1) (3 g L ⁻¹), citral (20 mg L ⁻¹), geraniol (20 mg L ⁻¹), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L ⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ e para o controle clonazepam 0,75 mg L ⁻¹ . ** p < 0,01 e * p < 0,05 vs grupo controle.....	115
Figura 2.26	– Conteúdo de NO nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L ⁻¹) e	

	extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> (E1) (3 g L ⁻¹), citral (20 mg L ⁻¹), geraniol (20 mg L ⁻¹), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L ⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L ⁻¹ e para o controle clonazepam 0,75 mg L ⁻¹	116
Figura 2.27	– Reação para detecção de NO.....	117
Figura 3.1	– Representação de uma célula “normal” e célula atacada por espécies reativas de oxigênio.....	120
Figura 3.2	– <i>Cannabis sativa</i> L.....	123
Figura 3.3	– Flores de <i>Cannabis sativa</i> L. (a) masculina e (b) feminina.....	124
Figura 3.4	– Estrutura química dos principais terpenos identificados na <i>Cannabis sativa</i> L.....	127
Figura 3.5	– Estrutura química dos flavonoides agliconas presentes nas espécies de <i>Cannabis</i> L.....	128
Figura 3.6	– Estrutura química dos principais ácidos derivados do ácido hidroxicinâmico na <i>Cannabis sativa</i> L.....	128
Figura 3.7	– Estrutura química dos derivados canabinóides presentes na <i>Cannabis sativa</i> L.....	130
Figura 3.8	– Estrutura química dos principais canabinóides presentes na <i>Cannabis sativa</i> L.....	130
Figura 3.9	– Estrutura química do (a) tetrahydrocannabinol e (b) canabidiol.....	132
Figura 3.10	– Biossíntese dos canabinóides na <i>Cannabis sativa</i> L.....	134
Figura 3.11	– Estrutura química dos canabinóides identificados nos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	144
Figura 3.12	– Reação de oxirredução entre o ácido gálico e o íon molibdato (VI) (um dos componentes do reagente de Folin-Ciocalteu).....	144
Figura 3.13	– Reação de complexação do flavonoide quercetina com o cloreto de alumínio (AlCl ₃).....	145
Figura 3.14	– Poder redutor dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> e dos controles ácido ascórbico (AA), resveratrol (Resv) e galato de epigallocatequina (EGCG). Os dados mostram a média ± desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata.....	146
Figura 3.15	– Estrutura química dos controles ácido ascórbico (AA), resveratrol (Resv) e epigallocatequina-3-galato (EGCG).....	148
Figura 3.16	– Porcentagem de inibição dos radicais DPPH• para (a) extratos de <i>Cannabis sativa</i> e (b) canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) e proporções CBD:THC. Os resultados apresentam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.....	149
Figura 3.17	– Reação genérica entre o radical DPPH• e um antioxidante (A-H) genérico (ArOH).....	150
Figura 3.18	– Estabilização do radical DPPH• por meio da ressonância.....	150
Figura 3.19	– Porcentagem de inibição dos radicais ABTS ^{•+} para (a) extratos de <i>Cannabis sativa</i> e (b) canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) e proporções CBD:THC. Os resultados apresentam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.....	151

Figura 3.20	–	Oxidação do ABTS com $K_2S_2O_8$ para a geração do radical $ABTS^{\bullet+}$	152
Figura 3.21	–	Porcentagem de inibição do HOCl para (a) extratos de <i>Cannabis sativa</i> e (b) canabidiol (CBD), tetrahidrocanabinol (THC) e proporções CBD:THC. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.....	153
Figura 3.22	–	Reação de detecção colorimétrica de ClO^- pela oxidação de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).....	154
Figura 3.23	–	Célula eletroquímica com os três eletrodos conectados ao potenciostato/galvanostato μ -Autolab conectados a um computador para aquisição de dados.....	155
Figura 3.24	–	Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de carbono vítreo (ECV) na ausência e na presença de $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CBD ou THC em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em metanol 30% (v/v) (velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}).....	156
Figura 3.25	–	Mecanismo de oxidação do THC.....	157
Figura 3.26	–	Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 mV s^{-1} a 250 mV s^{-1}) em um eletrodo de carbono vítreo (ECV) na presença de $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ de (a) CBD e (b) THC (eletrólito: solução tampão BR pH 7,0 contendo 30% (v/v) de metanol). Relações de I_{pa} vs. v para o (c) CBD e (d) THC.....	158
Figura 3.27	–	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo de carbono vítreo (ECV) na ausência e na presença de (a) $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos diferentes extratos de <i>Cannabis sativa</i> e (b) $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ das proporções CBD:THC (amplitude de potencial: 50 mV , tempo do pulso de potencial: 50 ms , intervalo: 500 ms) em meio de tampão BR (pH 7.0) contendo 30% (v/v) de metanol.....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	– Valores de DL ₅₀ para os extratos, frações e óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol frente a <i>Artemia salina</i>	50
Tabela 1.2	– Viabilidade celular da <i>Cymbopogon citratus</i> , citral, e geraniol em leucócitos humanos após 3 horas de exposição a 37 °C.....	53
Tabela 2.1	– Estágios comportamentais semelhantes a convulsões em peixe-zebra induzido por pentilenotetrazol (PTZ).....	86
Tabela 3.1	– Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	143
Tabela 3.2	– Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> provenientes da Lupos (Canadá).....	143
Tabela 3.3	– Atividade antioxidante (CI ₅₀) das diferentes proporções de CBD:THC obtida pelos métodos de DPPH [•] , ABTS ^{•+} e HOCl.....	147
Tabela 3.4	– Atividade antioxidante (CI ₅₀) de extratos de <i>Cannabis sativa</i> e para os controles (ácido ascórbico, resveratrol e epigallocatequina-3-galato) obtida pelos métodos de DPPH [•] , ABTS ^{•+} e HOCl.....	148
Tabela 3.5	– Valores dos potenciais de picos anódicos (E_{pa}) obtidos por análises de voltametria de pulso diferencial (VPD) para os extratos de <i>Cannabis sativa</i>	159
Tabela 3.6	– Valores dos potenciais de picos anódicos (E_{pa}) obtidos por análises de voltametria de pulso diferencial (VPD) para o CBD, THC e para as diferentes proporções	160
Tabela 3.7	– Correlação de Pearson entre o conteúdo de compostos fenólicos totais, conteúdo de flavonoides totais e atividade antioxidante dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> obtida por métodos espectrofotométricos e eletroquímicos.....	161
Tabela 3.8	– Correlação de Pearson entre a atividade antioxidante obtida pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos para as proporções entre CBD:THC.....	162

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HTR	Antagonista do receptor de serotonina
AA	Ácido ascórbico
ABTS ^{•+}	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
BR	Britton-Robinson
CAT	Catalase
CB1	Receptor endocanabinóide tipo 1
CB2	Receptor endocanabinóide tipo 2
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido canabidiólico
CBDV	Canabidivarina
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido canabigerólico
CBN	Canabinol
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CIT	Citral
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLZ	Clonazepam
COVID-19	Novo coronavírus
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMAPP	Dimetialil pirofosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
DP	Desvio padrão
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EGCG	Galato de epigallocatequina
EP	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FMZ	Flumazenil
FPP	Farnesil difosfato
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Pirofosfato de geranila
GSH	Glutathione
HCOR	Aldeídos
HUPG	Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IPP	Pirofosfato de isopentenila
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação da serotonina
MDA	Malondialdeído
MEP	Metileritritol fosfato
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MPO	Mieloperoxidase
MVA	Ácido mevalônico
NADPH	Fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO [•]	Peroxinitrito
PTZ	Pentilenotetrazol
RESV	Resveratrol
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peróxil
ROOH	Peróxidos orgânicos
RNA	Ácido ribonucleico
SH	Grupos sulfidríla
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SS	Pontes dissulfeto
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Ácido tetrahydrocannabinólico
THCV	Tetrahydrocannabivarina
THF	Tetraidrofurano
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNB	ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
TOC	Transtorno obsessivo compulsivo
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	22
CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E DOS COMPOSTOS CITRAL E GERANIOL DE <i>Cymbopogon citratus</i>.....	24
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1.1.1 Plantas medicinais.....	24
1.1.2 Metabólitos primários e secundários de plantas medicinais	25
1.1.3 Terpenos.....	27
1.1.4 Compostos fenólicos.....	29
1.1.5 <i>Cymbopogon citratus</i>	31
1.1.5.1 Composição química da <i>Cymbopogon citratus</i>	32
1.1.5.2 Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	34
1.1.6 Citral e geraniol.....	36
1.1.7 Citotoxicidade de <i>Cymbopogon citratus</i> e compostos relacionados.....	38
1.2 OBJETIVOS.....	40
1.2.1 Objetivo Geral.....	40
1.2.2 Objetivos Específicos.....	40
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
1.3.1 Reagentes e Soluções.....	41
1.3.2 Coleta do material vegetal.....	41
1.3.3 Obtenção dos extratos e frações de <i>Cymbopogon citratus</i>	41
1.3.4 Avaliação da toxicidade de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol frente à <i>Artemia salina</i>	45
1.3.5 Viabilidade celular em leucócitos humanos.....	46
1.3.6 Fragilidade osmótica em eritrócitos humanos.....	46
1.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)..	47
1.3.8 Análise Estatística.....	47
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
1.4.1 Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	47
1.4.2 Citotoxicidade em leucócitos humanos.....	51
1.4.3 Fragilidade osmótica em eritrócitos humanos.....	54
1.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)..	61
1.5 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	66
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO E ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS COMPOSTOS CITRAL E GERANIOL DE <i>Cymbopogon citratus</i> EM PEIXE-ZEBRA.....	67
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	67
2.1.1 Distúrbios de Ansiedade.....	67
2.1.2 Epilepsia.....	68

2.1.3	Produtos naturais com propriedades ansiolítica e anticonvulsivante.....	71
2.1.4	Receptor GABA.....	73
2.1.5	Peixe-zebra.....	75
2.1.6	Utilização do peixe-zebra na avaliação do efeito ansiolítico e anticonvulsivante de plantas medicinais.....	77
2.1.7	Pentilenotetrazol como modelo indutor da epilepsia.....	79
2.2	OBJETIVOS.....	80
2.2.1	Objetivo Geral.....	80
2.2.2	Objetivos Específicos.....	81
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
2.3.1	Equipamentos e reagentes.....	81
2.3.2	Obtenção do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	82
2.3.3	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i>	82
2.3.4	Manutenção do peixe-zebra.....	83
2.3.5	Avaliação do efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol em peixe-zebra.....	83
2.3.5.1	Tratamentos.....	83
2.3.5.2	Envolvimento dos receptores GABA _A no efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol.....	84
2.3.5.3	Teste claro/escuro.....	84
2.3.6	Avaliação da atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol em peixe-zebra.....	85
2.3.6.1	Tratamentos.....	85
2.3.6.2	Envolvimento dos receptores GABA _A na atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol.....	86
2.3.7	Ensaio bioquímicos.....	87
2.3.7.1	Preparação do homogenato de cérebro.....	87
2.3.7.2	Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	87
2.3.7.3	Determinação dos níveis de glutathione (GSH).....	87
2.3.7.4	Atividade da enzima catalase (CAT).....	88
2.3.7.5	Determinação do conteúdo de óxido nítrico (NO).....	88
2.3.8	Análise Estatística.....	88
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
2.4.1	Avaliação do efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol em peixe-zebra.....	89
2.4.2	Investigação do envolvimento dos receptores GABA _A no efeito ansiolítico de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol.....	96
2.4.3	Avaliação da atividade anticonvulsivante de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol em peixe-zebra.....	102
2.4.4	Investigação do envolvimento dos receptores GABA _A no efeito anticonvulsivante de <i>Cymbopogon citratus</i> , citral e geraniol.....	109

2.4.5	Parâmetros bioquímicos.....	110
2.4.5.1	Quantificação de MDA nos homogenatos de cérebro.....	111
2.4.5.2	Níveis de GSH nos homogenatos de cérebro.....	113
2.4.5.3	Atividade da enzima catalase (CAT).....	114
2.4.5.4	Conteúdo de óxido nítrico nos homogenatos de cérebro.....	115
2.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	117
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE <i>Cannabis sativa</i> E DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES POR MEIO DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ELETROQUÍMICOS.....		119
3.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	119
3.1.1	Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.....	119
3.1.2	<i>Cannabis sativa</i> L.....	123
3.1.3	Composição química da <i>Cannabis sativa</i> L.....	126
3.1.4	Canabinóides.....	129
3.1.5	Tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD).....	131
3.1.6	Biossíntese de canabinóides nas espécies de <i>Cannabis</i>	133
3.1.7	Atividade antioxidante do tetrahydrocannabinol, canabidiol e da <i>Cannabis sativa</i> L.....	135
3.2	OBJETIVOS.....	137
3.2.1	Objetivo Geral.....	137
3.2.2	Objetivos Específicos.....	137
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	138
3.3.1	Reagentes e Solventes.....	138
3.3.2	Obtenção dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	138
3.3.3	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	139
3.3.4	Determinação do conteúdo de flavonoides totais dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	139
3.3.5	Avaliação do poder redutor dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	139
3.3.6	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> , CBD e THC pelo método de DPPH*.....	140
3.3.7	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> , CBD e THC pelo método de ABTS* ⁺	141
3.3.8	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Cannabis sativa</i> , CBD e THC pelo método de HOCl.....	141
3.3.9	Avaliação da atividade antioxidante por métodos eletroquímicos.....	142
3.3.10	Análise Estatística.....	142
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	142
3.4.1	Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	142
3.4.2	Avaliação do poder redutor dos extratos de <i>Cannabis sativa</i>	145
3.4.3	Determinação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH*, ABTS* ⁺ e HOCl.....	146

3.4.4	Determinação da atividade antioxidante por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.....	154
3.4.5	Correlação entre os resultados de atividade antioxidante obtidos pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos.....	161
3.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	162
	CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES FINAIS & PERSPECTIVAS.....	164
4.1	CONCLUSÕES FINAIS.....	164
4.2	PERSPECTIVAS.....	164
	REFERÊNCIAS.....	166
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	195

APRESENTAÇÃO

O emprego de plantas medicinais para o tratamento e prevenção de doenças é registrado desde a antiguidade. São mundialmente consumidas como medicamento de baixo custo principalmente em países em desenvolvimento, devido às suas propriedades farmacológicas. Entretanto, muitas são empregadas sem a comprovação de seus possíveis efeitos toxicológicos e adversos para os seres humanos. A *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecida como capim-limão ou capim-santo, é consumida na forma de chá devido às suas propriedades terapêuticas, principalmente no tratamento e prevenção de doenças gástricas e relacionadas ao sistema nervoso central. Esta planta é constituída por uma gama de compostos bioativos, em que se pode destacar os polifenóis e os terpenos presentes nos seus extratos e no óleo essencial. Desta forma, considerando-se as propriedades terapêuticas exibidas por esta planta e o seu amplo uso pela população, estudos relacionados à investigação da toxicidade e dessas propriedades terapêuticas são de grande importância.

A presente tese está dividida em 4 capítulos, cujo conteúdo será brevemente apresentado a seguir. Em nosso estudo anterior [1], demonstrou-se que frações obtidas em acetato de etila a partir do extrato hidroalcoólico de folhas secas de *Cymbopogon citratus* são constituídas por polifenóis, e exibem promissora atividade antioxidante por diferentes métodos *in vitro*. Entretanto, outros estudos são necessários para avaliar o possível efeito toxicológico destas amostras a fim de se comprovar a sua segurança em futuras aplicações. Neste sentido, o Capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre plantas medicinais, com destaque para *C. citratus*. São apresentados estudos para avaliação da citotoxicidade de extratos, frações e do óleo essencial desta planta, assim como para o citral e geraniol (principais terpenos presentes no óleo essencial) em células humanas (leucócitos e eritrócitos). Além disso, apresenta-se resultados relacionados à avaliação da toxicidade de tais amostras empregando *Artemia salina* como modelo *in vivo*. É também apresentado o efeito da remoção do óleo essencial das folhas secas da planta na extração de compostos bioativos para as frações clorofórmicas e acetato de etila (obtidas em meio ácido e básico). Além disso, são descritos estudos para avaliação de eventuais alterações morfológicas causadas em eritrócitos causadas por todas as amostras.

O Capítulo 2 apresenta uma introdução geral ao transtorno de ansiedade e à epilepsia, além do emprego do peixe-zebra na investigação das propriedades ansiolítica e anticonvulsivante de plantas medicinais e compostos relacionados. Neste mesmo capítulo é abordada a avaliação do efeito ansiolítico e anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, assim como de seus constituintes químicos, citral e

geraniol (isoladamente ou em associação), em peixe-zebra como modelo *in vivo*. Também se avaliou o efeito destes compostos em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo na convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) nos animais, assim como o envolvimento dos receptores gabaérgicos em tais efeitos. Neste sentido, este estudo corroborou o uso etnofarmacológico da *C. citratus* para doenças relacionadas ao sistema nervoso central, e a eficácia do peixe-zebra como modelo animal na avaliação de propriedades farmacológicas desta planta e seus compostos relacionados.

O Capítulo 3 apresenta uma introdução geral sobre a planta *Cannabis sativa*, canabinóides e ação antioxidante destes compostos. Também relata o estudo da avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Cannabis sativa* e de seus principais constituintes químicos, canabidiol (CBD) e tetrahidrocanabinol (THC) isolados (e em associação) por métodos espectroscópicos (poder redutor e sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e HOCl). A ação antioxidante destes compostos também foi investigada por meio de métodos eletroquímicos, como a voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VDP). Foi demonstrado que estes canabinóides atuam como antioxidantes devido às suas propriedades de doação de elétron e de átomos de hidrogênio. Além disso, foram evidenciadas boas correlações entre os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos para os extratos de *Cannabis sativa* e para as diferentes misturas entre CBD e THC, o que sugeriu que estas técnicas podem ser empregadas na avaliação da atividade antioxidante de amostras constituídas por canabinóides.

O Capítulo 4 apresenta as conclusões finais do trabalho e perspectivas para estudos futuros.

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTOS CITRAL E GERANIOL DE *Cymbopogon citratus*

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Plantas medicinais

Nos tempos antigos, os remédios caseiros a base de plantas medicinais compreendiam os tratamentos e prevenções mais conhecidos para diversos tipos de doenças [2,3]. Por exemplo, o uso da papoula (*Papaver somniferum*) e da maconha (*Cannabis sativa*) é reportado há mais de 4.000 anos. Atualmente, as plantas medicinais ainda são utilizadas no tratamento de várias doenças comuns, como as infecções gastrointestinais e respiratórias, doenças de pele, na cicatrização de feridas, diarreia, hipertensão, anemia, malária, doenças neurodegenerativas, etc [4]. As ervas fitoterápicas incluem as folhas, flores, raízes, cascas, frutas, sementes, caules ou outras partes de plantas que são utilizadas na forma de chá (infusão ou decocção) [2]. As plantas medicinais têm sido recomendadas como alternativa eficaz para o tratamento e prevenção de doenças devido a algumas vantagens como o baixo custo, acessibilidade e menos efeitos colaterais em comparação com outros medicamentos [2,3].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como planta medicinal “*todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas como fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos*”. As estatísticas atuais da OMS reportaram aproximadamente 250.000 espécies de plantas identificadas das quais 70.000 possuem propriedades medicinais. Estima-se que 80% da população dos países em desenvolvimento dependa de preparações a partir de plantas para atender às suas necessidades básicas de saúde [5]. As plantas medicinais são ingredientes significativos na formulação de medicamentos de origem natural e na fabricação de produtos farmacêuticos, além de serem importantes na síntese de moléculas mais complexas [6]. Neste contexto, as informações obtidas a partir de conhecimentos de comunidades tradicionais sobre o uso das plantas medicinais são comprovados com pesquisas farmacológicas [2,3].

No Brasil, as plantas medicinais são consumidas com pouca comprovação de suas propriedades terapêuticas ou toxicológicas, além de serem consideradas “remédios de baixo custo”. Estima-se que aproximadamente 30% dos medicamentos terapêuticos existentes, são derivados de fontes naturais (plantas e microorganismos). Por exemplo, em algumas áreas, os medicamentos derivados das plantas chegam a 60% [6]. A riqueza de espécies vegetais, e dos

biomas brasileiros, associada à diversidade étnico-cultural, implicou no uso extensivo de plantas medicinais para fins curativos. Fatores como a facilidade de acesso e a compatibilidade cultural são de extrema relevância para o avanço do uso de fitoterápicos [7].

Apesar de suas notáveis propriedades farmacológicas e terapêuticas, as plantas medicinais são consumidas em todo o mundo com poucas evidências de seus possíveis efeitos toxicológicos [2,8,9]. Foi comprovado em estudos *in vivo* e *in vitro* que extratos brutos e compostos bioativos podem exibir alguma toxicidade e causar alterações na forma e fisiologia das células humanas, como por exemplo nos leucócitos e eritrócitos [10,11]. Algumas plantas medicinais também podem causar alterações no material genético nas células vivas e induzir danos a longo prazo em pacientes [4,12]. Além disso, de acordo com a classe e concentração de fitoquímicos presentes nas plantas, estas podem produzir efeitos neurotóxicos, citotóxicos, hepatotóxicos e carcinogênicos [13]. Neste sentido, pesquisas têm sido realizadas para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos de extratos vegetais que são utilizados principalmente para fins medicinais [3,14].

As plantas medicinais e seus componentes químicos vêm sendo amplamente investigados com relação às suas atividades farmacológicas devido à interação dos últimos com o Sistema Nervoso Central (SNC) [2]. Vários estudos comprovaram a eficácia da utilização de produtos naturais e fitoterápicos no tratamento de doenças devido às suas ações psicoterapêuticas como antidepressivo, ansiolítico, sedativo, hipnótico e analgésico [15,16]. As propriedades farmacológicas das plantas medicinais são atribuídas à sua composição química, que incluem os metabólitos secundários presentes em seus extratos brutos [17,18]. Estes compostos atuam de forma independente ou em sinergia, e podem interagir com os componentes do tecido vivo [19].

1.1.2 Metabólitos primários e secundários de plantas medicinais

A incapacidade de locomoção das plantas favoreceu o desenvolvimento de mecanismos de defesa, o que é considerada uma capacidade adaptativa para lidar com situações estressantes durante o seu crescimento e desenvolvimento [20]. As plantas respondem a estresses e distúrbios bióticos que levam ao início de respostas de defesa mediadas por processos de sinalização e vias, as quais envolvem a produção de moléculas, para desempenhar funções celulares essenciais para os processos fisiológicos [20]. Estes processos impactam o metabolismo primário que fornece intermediários biossintéticos para o metabolismo secundário, com a produção de compostos bioativos [21].

Os metabólitos primários (açúcares, aminoácidos, lipídeos e proteínas) exercem as funções essenciais para as plantas e estão diretamente relacionados a respiração, fotossíntese, crescimento e formação de novos tecidos [22]. O metabolismo primário é semelhante em todas as espécies de plantas, visto que derivam de um precursor comum, do qual algumas características são conservadas [23]. Além disso, estes compostos são essenciais como intermediários nas vias catabólica e anabólica da planta, assim como na produção de metabólitos secundários [22,24].

Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas sintetizadas por plantas que não estão envolvidas diretamente no seu crescimento e desenvolvimento [23]. São produzidos a partir dos metabólitos primários por uma sequência de reações químicas catalisadas por enzimas [21]. Estes compostos podem ser detectados em todas as partes das plantas, porém o local da biossíntese é restrito a um órgão, tal qual eles são posteriormente transportados para diferentes regiões [25].

Os metabólitos secundários desempenham importantes funções ecológicas nas plantas, como a proteção contra herbívoros e patógenos, além de servirem como atrativos (aroma, cor e sabor) para polinizadores [24]. Cada família de plantas produz uma gama de compostos químicos, os quais são utilizados como marcadores taxonômicos na classificação botânica da planta [24]. Além disso, diversos estudos já comprovaram que estes compostos podem exercer algum efeito biológico e terapêutico para os seres humanos [2,26].

A produção de metabólitos secundários em plantas medicinais pode ser influenciada por fatores ambientais, que incluem as mudanças geoclimáticas e sazonais, além das condições externas, como a temperatura, luz, umidade, radiação ultravioleta e nutrientes do solo [27,28]. A condição de coleta, secagem e armazenamento do material vegetal também influenciam no teor destes compostos e, conseqüentemente, nos efeitos biológicos e farmacológicos apresentados pelas plantas [27,28].

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos e terpenóides (aproximadamente 25.000 tipos), alcalóides (aproximadamente 12.000 tipos) e compostos fenólicos (aproximadamente 8.000 tipos) [29]. Existem quatro vias principais para a síntese de metabólitos secundários ou compostos bioativos nas plantas: (1) via do ácido chiquímico; (2) via do ácido malônico; (3) via do ácido mevalônico; e (4) via do não mevalonato. Os alcalóides são produzidos por aminoácidos aromáticos (provenientes da via do ácido chiquímico) e por aminoácidos alifáticos (provenientes do ciclo do ácido tricarboxílico). Os compostos fenólicos são sintetizados por

meio da via do ácido chiquímico e da via do ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir da via do ácido mevalônico e da via do não mevalonato [20,30,31].

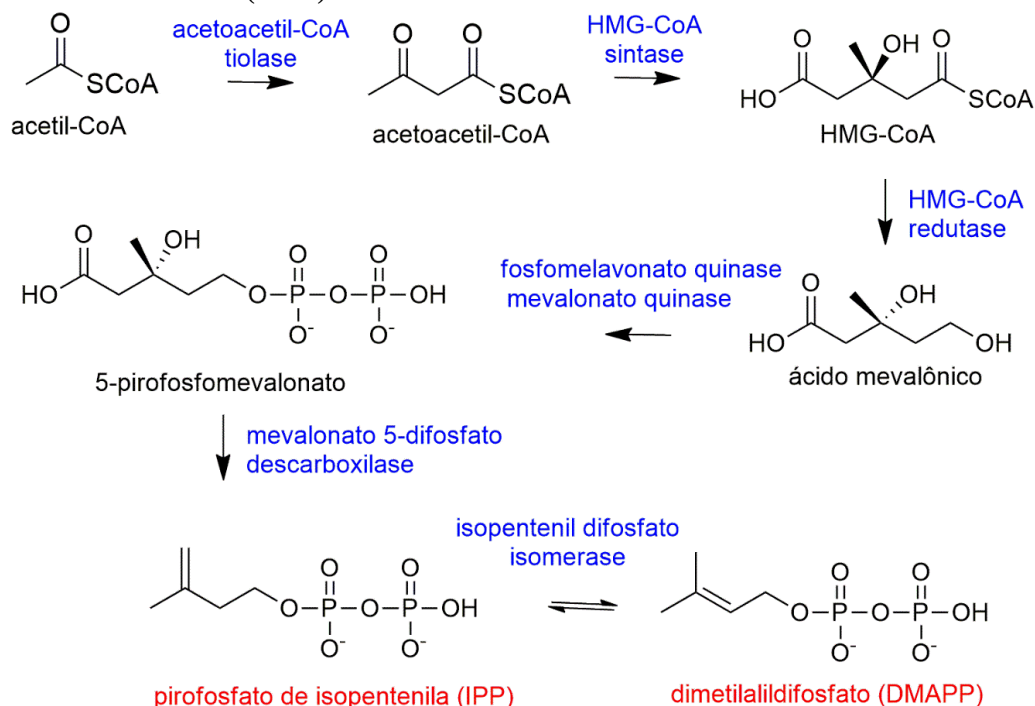
1.1.3 Terpenos

Os terpenos são hidrocarbonetos naturais produzidos pelas plantas medicinais, e são os principais constituintes dos óleos essenciais. Este grupo é representado por aproximadamente 55.000 moléculas, e é o mais complexo de produtos naturais, com uma diversidade de estruturas químicas e propriedades biológicas [32,33]. São classificados em diferentes subgrupos com base no número de unidades de isopreno (C5) como: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) [33].

Os monoterpenos e diterpenos são produzidos nos plastídeos, enquanto os sesquiterpenos, triterpenos e tetraterpenos são produzidos no citosol [33]. Entretanto, alguns sesquiterpenos e diterpenos também podem ser produzidos na mitocôndria. O peso molecular e a estrutura química destes compostos determinam as propriedades físicas, como a volatilidade e as interações entre diferentes organismos [33].

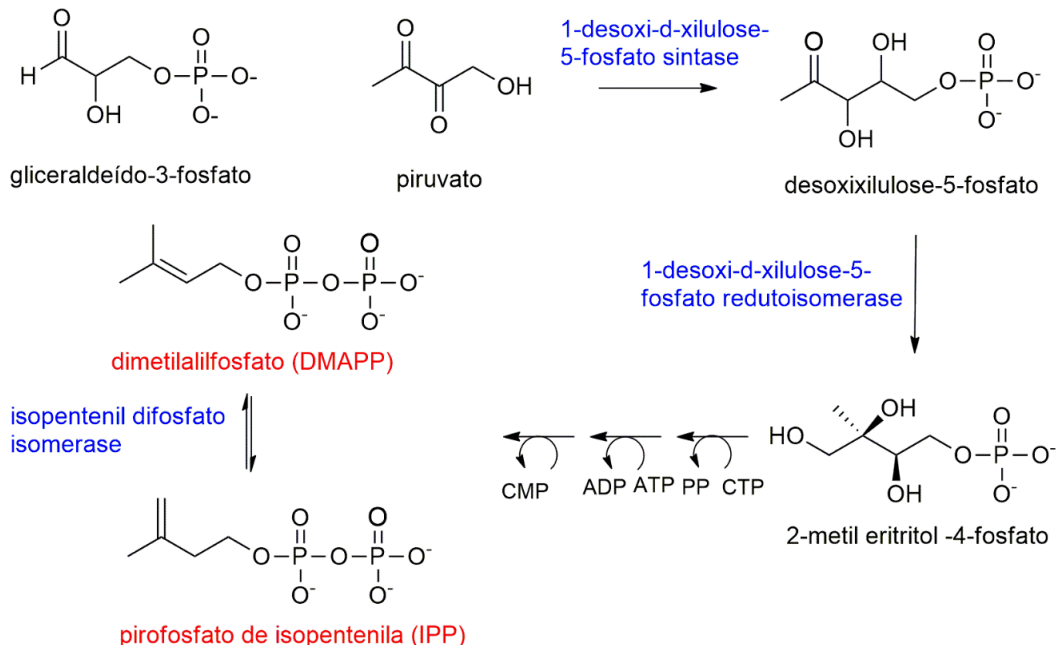
Os terpenos são sintetizados a partir dos metabólitos primários por meio de duas rotas principais: a rota do ácido mevalônico (MVA) e a rota do metileritritol fosfato (MEP) (Figuras 1.1 e 1.2) [31,34]. Na rota do MVA, três moléculas de acetil-CoA são necessárias para formar o ácido mevalônico. Esta molécula é pirofosforilada, descarboxilada e posteriormente desidratada por uma sequência de reações enzimáticas, para produzir o IPP (pirofosfato de isopentenila), o qual é a unidade básica para a formação dos terpenos (Figura 1.1). Na rota do MEP, o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono do piruvato, se condensam para formar um intermediário de cinco carbonos, a desoxixilulose-5-fosfato. Por fim, ocorre a redução desta molécula a MEP, que é eventualmente convertido por uma sequência de reações em DMAPP (dimetialil pirofosfato), um isômero do IPP (Figura 1.2) [33,35].

Figura 1.1 – Biossíntese dos precursores de terpenos, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalilfosfato (DMAPP) pela rota do ácido mevalônico (MVA).



Fonte: Adaptado de [35].

Figura 1.2 – Biossíntese dos precursores de terpenos, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalilfosfato (DMAPP) pela rota do metileritritol fosfato (MEP).

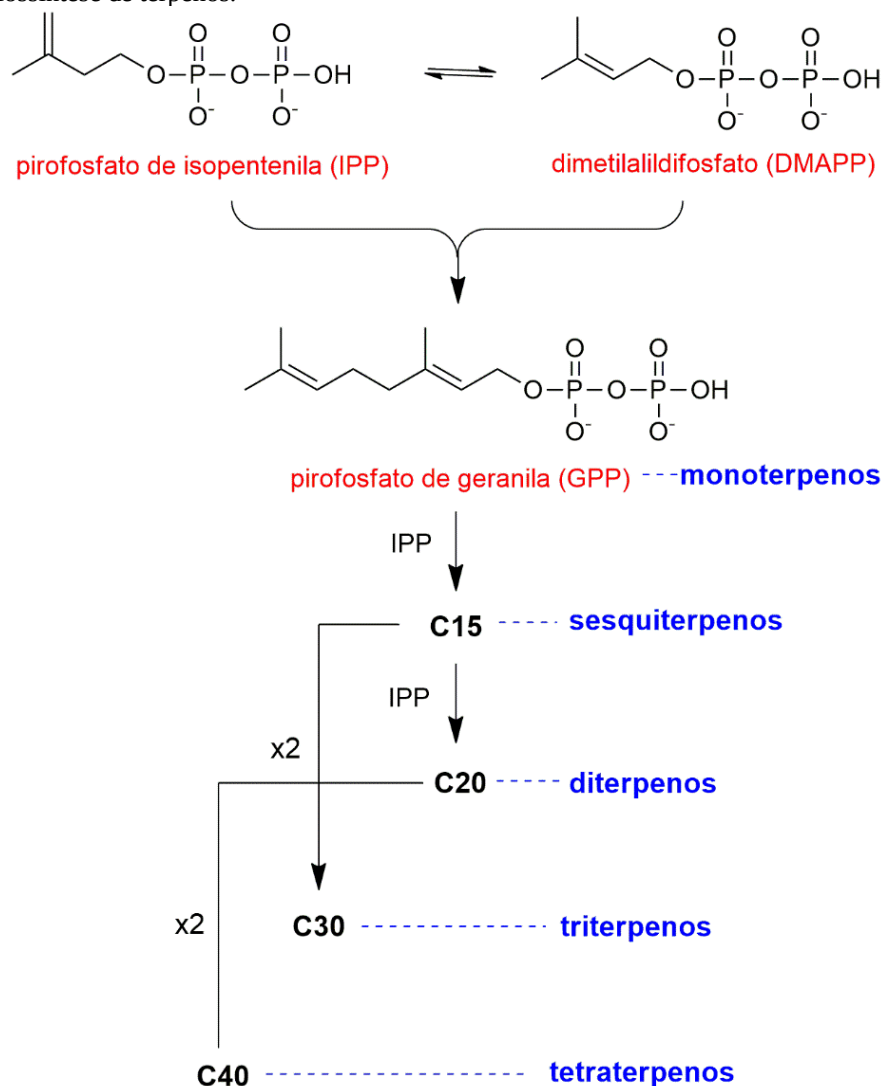


Fonte: Adaptado de [35].

O IPP e o DMAPP são unidades pentacarbonadas que se unem para formar moléculas maiores. A união do IPP com DMAPP forma uma molécula de 10 carbonos denominada GPP (pirofosfato de geranila), responsável pela formação dos monoterpenos, como demonstrado na Figura 1.3. O GPP pode se ligar a outra molécula de IPP e formar um composto de 15 carbonos,

o farnesil difosfato (FPP), precursor de sesquiterpenos. A união a mais uma molécula de IPP leva à formação do GGPP (geranilgeranil difosfato) com 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Por fim, o FPP e GGPP podem dimerizar e formar os triterpenos e tetraterpenos (Figura 1.3) [34].

Figura 1.3 – Biossíntese de terpenos.



Fonte: Adaptado de [35] e [36].

1.1.4 Compostos fenólicos

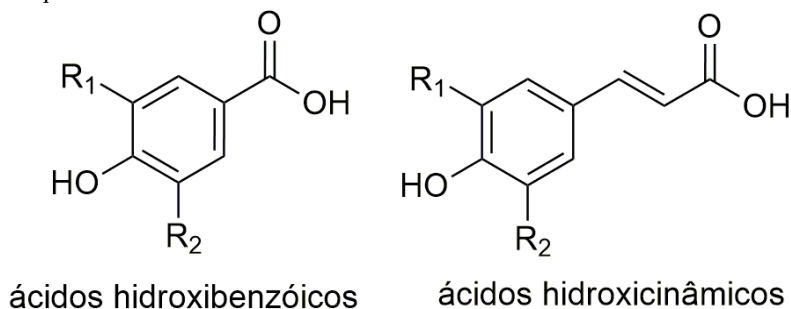
Os compostos fenólicos são um grupo heterogêneo de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas. Estruturalmente, possuem pelo menos um anel aromático ao qual um ou mais grupos hidroxila (OH) estão diretamente ligados a esta estrutura [37,38]. Englobam desde moléculas simples até aquelas com alto grau de polimerização e atuam como sequestradores dos radicais livres e quelante de metais [26,38]. Os produtos formados pela

reação destes compostos com os radicais livres são relativamente estáveis devido à ressonância com o anel aromático apresentada por eles [39].

Estes compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico, esta última menos significativa [35]. A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em três aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano [35,40], e é a principal conexão entre o metabolismo primário e secundário nas plantas [41]. Os aminoácidos formados não são apenas componentes cruciais da biossíntese de proteínas, mas servem também como precursores para diversos metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, que são importantes para o crescimento e desenvolvimentos das plantas [41].

Os compostos fenólicos podem ser classificados como ácidos fenólicos, aqueles derivados do ácido hidroxicinâmico ou do ácido hidroxibenzóico, e flavonoides. Os compostos originados a partir do ácido hidroxibenzóico são caracterizados pelo grupo carboxílico substituído no fenol e são representados pelos ácidos gálico, protocatecuico, vanílico e elágico [42,43]. Entretanto, os compostos derivados do ácido hidroxicinâmico possuem uma cadeia hidrocarbônica de três átomos diretamente ligada ao anel aromático e são representados pelos ácidos cafeico, ferúlico, cinâmico, sinapínico e clorogênico (Figura 1.4) [44].

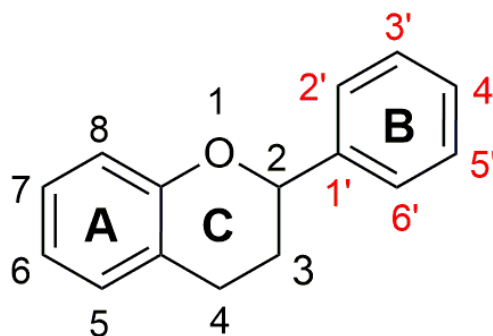
Figura 1.4 – Estrutura química do ácido hidroxicinâmico e hidroxibenzóico.



Fonte: A autora.

Os flavonoides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal e apresentam uma variedade de estruturas fenólicas [42,45]. São constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) conectados por um anel pirano (C) (Figura 1.5). De acordo com o grau de hidrogenação e substituição do heterociclo, podem ser subclassificados como flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas e flavanonas [44,46].

Figura 1.5 – Estrutura geral dos flavonoides (2-fenil-benzopirano).



Fonte: A autora.

Devido às cores atraentes apresentadas pelas flavonas e antocianinas, elas podem atuar como sinais visuais para a atração de insetos para a polinização. Devido à sua adstringência, as catequinas e flavonóis atuam como um sistema de defesa contra os insetos que são prejudiciais às plantas [44]. Além disso, exibem uma variedade de propriedades terapêuticas e farmacológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e neuroprotetora [42]. As principais fontes de compostos fenólicos são as frutas, vegetais, bebidas como o café, chás, vinho, sucos de frutas e as plantas medicinais [46].

1.1.5 *Cymbopogon citratus*

A *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*) (Figura 1.6), popularmente conhecida como capim-limão, capim-santo ou capim-cidreira, é uma planta nativa da Índia e pode ser cultivada em diversos países de clima tropical e subtropical [47]. Pertence à família Gramineae, que compreende aproximadamente 500 gêneros e 8.000 espécies essencialmente herbáceas. É uma gramínea perene, de alto porte, que apresenta folhas em forma de tiras, com cerca de 1,3 – 2,5 cm de largura e 0,9 m de comprimento. Possui coloração verde-pálida e odor aromático característico de limão quando moídas, devido à presença do citral [48]. Desenvolve-se preferencialmente em climas quentes e úmidos com chuvas bem distribuídas [49] e cresce em touceiras que podem atingir aproximadamente 1,2 e 1,8 m de altura e largura, respectivamente. A folha seca contém 1 – 2 % de óleo essencial, o que agrega valor econômico à planta [49].

Figura 1.6 – *Cymbopogon citratus*.



Fonte: A autora.

A *C. citratus* é utilizada devido às suas propriedades terapêuticas na medicina popular, como na prevenção e no tratamento da gripe, febre, pneumonia e problemas digestivos, além de apresentar atividades analgésica, anti-inflamatória e anti-depressiva [50,51]. Alguns autores demonstraram que esta planta também possui efeitos que podem prevenir a diabetes e a obesidade, além de poder ser empregada na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares [52–54]. Ochwang'i e colaboradores [55] e Bidinotto e colaboradores [56] comprovaram que a *C. citratus* exibe atividade anticarcinogênica. Outros estudos revelaram que esta planta é eficaz como agente antifúngico, antibacteriano e antiprotozoário [48,57,58]. Recentemente, Simões e colaboradores [59] comprovaram a atividade vasorrelaxante de extratos da *C. citratus* em artérias de seres humanos, efeito que pode estar relacionado à presença de taninos.

Estudos de experimentos *in vivo* e *in vitro* já comprovaram que as propriedades benéficas da *C. citratus* podem estar relacionadas com a sua ação antioxidante [1,60–62]. Por exemplo, Campos e colaboradores [63] demonstraram que o extrato metanólico rico em polifenóis inibiu a produção de EROs induzida por H_2O_2 em células endoteliais de seres humanos. Em outro trabalho, foi verificado que as células que foram previamente tratadas com o extrato aquoso de *C. citratus* reduziram significativamente a frequência de aberrações cromossômicas induzidas por H_2O_2 . Os autores atribuíram este efeito principalmente à presença de flavonoides, que possuem ação antioxidante [64]. Pereira e colaboradores [62] demonstraram que extratos das folhas de *C. citratus* atenuaram a peroxidação lipídica induzida por diferentes pró-oxidantes em homogenatos de cérebro de ratos.

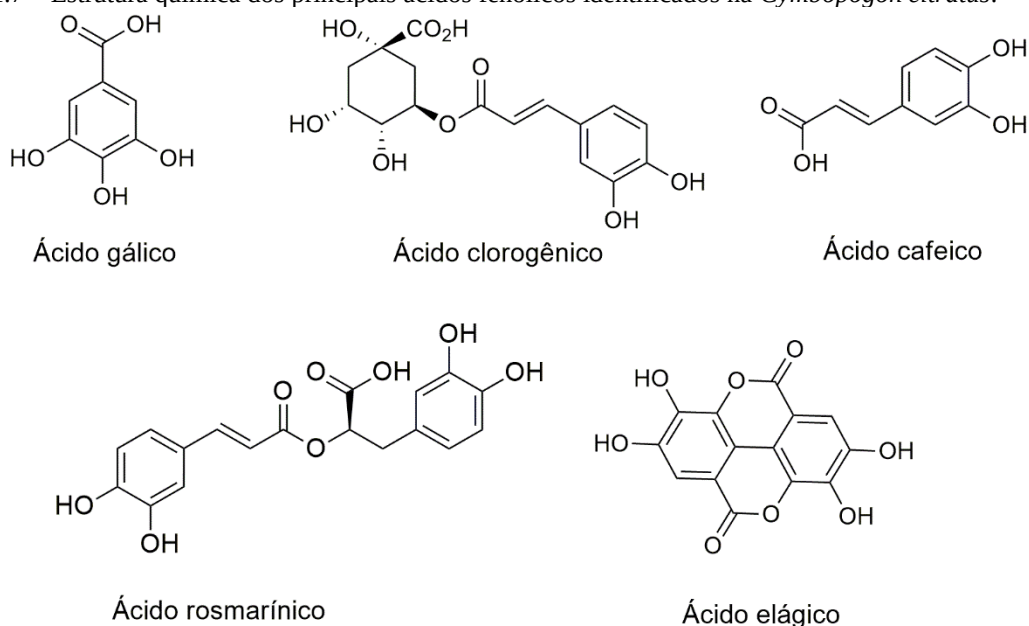
A *C. citratus* também exibe valor nutritivo devido à presença de alguns minerais e vitaminas. O fósforo e o potássio estão presentes em maiores quantidades na planta, que

também exibe traços de zinco e magnésio que podem ter efeitos neuroprotetores [48]. Além disso, a planta contém as vitaminas A, C e E que possuem propriedades antioxidantes. Segundo Ekpenyong, Akpan e Nyoh [47] a ação neuroprotetora da planta pode estar relacionada à ação sinérgica dos seus componentes nutritivos, e dos seus constituintes voláteis que estão presentes no óleo essencial.

1.1.5.1 Composição química da *Cymbopogon citratus*

A composição química da *C. citratus* é bastante diversificada já que apresenta vários compostos bioativos pertencentes às diferentes classes [48,65]. Estudos da literatura identificaram compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) nos extratos brutos de *C. citratus* [1,66–68]. Na Figura 1.7 estão apresentadas as estruturas dos ácidos fenólicos presentes nas folhas de *C. citratus*.

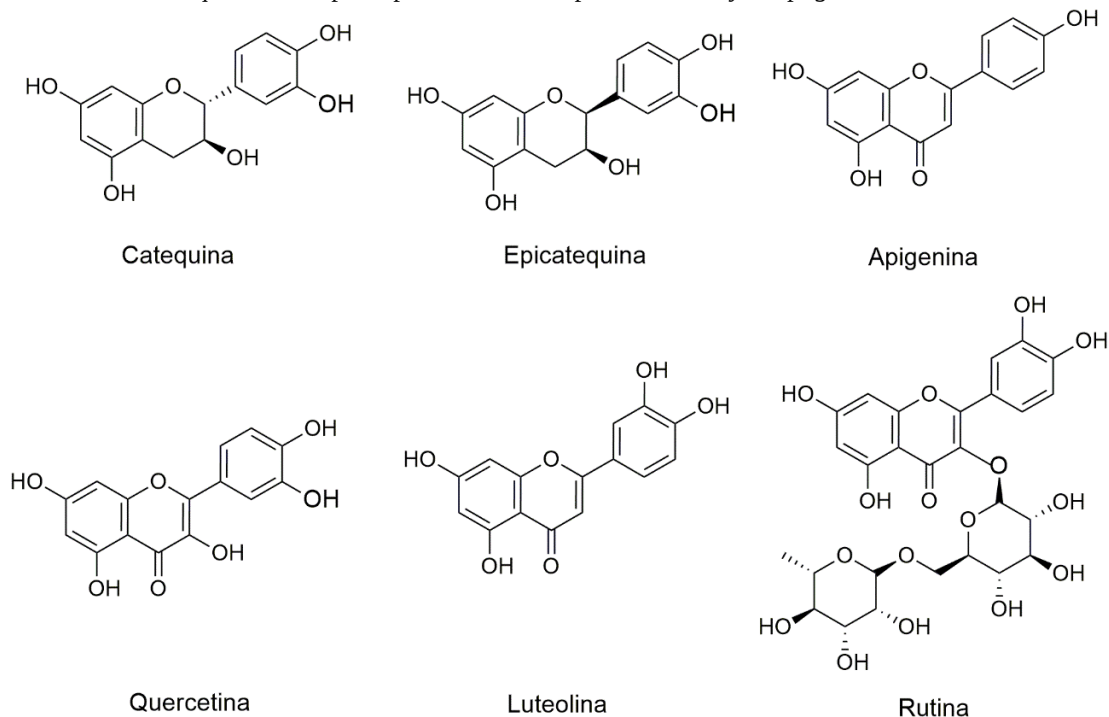
Figura 1.7 – Estrutura química dos principais ácidos fenólicos identificados na *Cymbopogon citratus*.



Fonte: A autora.

Além dos ácidos fenólicos, é reportado que os extratos brutos de *C. citratus* são constituídos por flavonoides [47,69]. Por exemplo, luteolina, luteolina 6-O-glicosídeo, isoorientin, quercetina, kaempferol e apigenina foram identificados nos extratos da planta [60] (Figura 1.8).

Figura 1.8 – Estrutura química dos principais flavonoides presentes na *Cymbopogon citratus*.



Fonte: A autora.

Cheel e colaboradores [68] identificaram os flavonoides isoorientina, isoscoparina, swertiajaponina e isoorientina 2"-O-ramnosídeo nos extratos aquoso e metanólico das folhas secas de *C. citratus*. Em outro estudo, foi revelada a presença de estruturas flavanona heterodiméricas, as quais consistem em unidades de apigeniflavana ou luteoliflavana conectadas a uma flavanona (naringenina ou eriodictiol), que podem ocorrer nas formas de aglicona ou glicosilada [67].

Além dos compostos fenólicos, na literatura é reportada a presença de taninos, saponinas, antraquinonas, xantonas, alcalóides e esteróides em extratos de *C. citratus* [67,70]. Estes compostos juntamente com os componentes presentes no óleo essencial também são conhecidos por contribuir para os efeitos farmacológicos apresentados pela *C. citratus* [47].

1.1.5.2 Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Os óleos essenciais são misturas de compostos lipofílicos extraídos de plantas comumente por destilação por arraste de vapor, porém, podem ser extraídos também com solventes orgânicos. São constituídos majoritariamente por terpenóides, e outros compostos voláteis de baixo peso molecular, tais como os monoterpenos e sesquiterpenos [71,72]. De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), o termo óleo essencial se

refere a “*um produto obtido a partir da matéria-prima vegetal, seja por destilação com água ou vapor, ou do epicarpo de frutas cítricas por processo mecânico, ou por destilação a seco*” [73].

Os terpenos são os principais responsáveis pelo aroma característico e propriedades terapêuticas dos óleos essenciais [74]. São líquidos de aspecto oleoso e de coloração amarela, laranja ou incolor, em geral, pouco estáveis na presença de ar, calor e luz [75]. Nas plantas, o óleo essencial é produzido e armazenado em estruturas especializadas, como os idioblastos, cavidades, canais e tricomas [74].

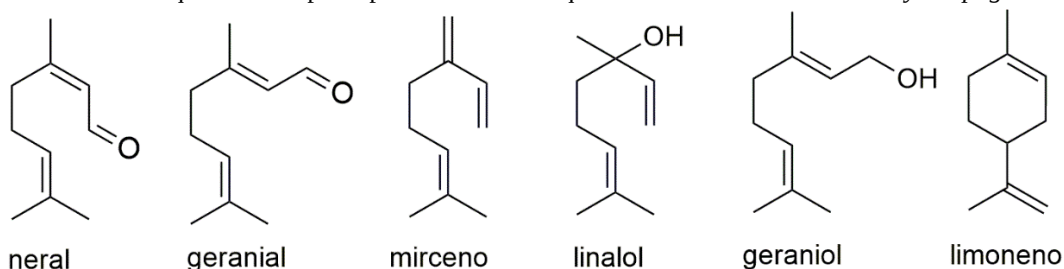
Os óleos essenciais são estudados por apresentarem promissores efeitos biológicos, como antioxidante, anti-inflamatório, analgésico, anticolinesterásico, dentre outros [74]. Além disso, têm sido amplamente utilizados em aplicações bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitárias, inseticidas e cosméticas pelas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentícia [75].

A composição química dos óleos essenciais das plantas medicinais varia consideravelmente de espécie para espécie em função de parâmetros climáticos e fatores agrônômicos, como a fertilização, irrigação e a fase de desenvolvimento da planta durante a coleta [75,76]. Além disso, o tipo de material vegetal utilizado, e o método de extração empregado determinam o rendimento e a composição química do óleo essencial e, conseqüentemente, as suas propriedades biológicas [74]. Ainda, após o isolamento do óleo essencial, o armazenamento deve ser cuidadoso (ausência de luz, calor e umidade), a fim de reduzir as reações de degradação dos componentes químicos presentes [73]. Estes compostos se convertem facilmente em outros, por meio de reações de oxidação, isomerização, ciclização ou desidrogenação, desencadeadas enzimaticamente ou quimicamente [73].

Diferentes métodos podem ser eficientemente empregados para a extração do óleo essencial da *C. citratus*, como a extração por solventes, destilação a vapor, hidrodestilação, hidrodestilação assistida por micro-ondas e extração por fluido supercrítico [77]. Entretanto, o método mais utilizado é a destilação a vapor, utilizado principalmente para materiais sensíveis a temperatura e insolúveis em água, que podem se decompor no ponto de ebulição [73]. Neste método, o vapor passa através do material vegetal seco ou fresco, o que amolece as células e permite que o óleo essencial seja extraído na forma de vapor. A temperatura do vapor deve ser alta o suficiente para que o óleo possa vaporizar mas que não danifique o material vegetal e degrade os componentes químicos presentes. O óleo essencial juntamente com o vapor é posteriormente resfriado em um condensador e coletado [77].

Na literatura é reportada a presença de uma variedade de terpenos presentes no óleo essencial das folhas de *C. citratus* coletada em diferentes regiões [77]. Estes compostos exibem propriedades biológicas e terapêuticas, como por exemplo, o mirceno, linalol e o geraniol, que apresentam efeitos analgésicos, antibacteriano e antifúngico [32]. O neral, geranial, limoneno, mirceno e o geraniol são compostos marcadores (compostos químicos responsáveis pela atividade biológica) do óleo essencial de *C. citratus* [78] (Figura 1.9).

Figura 1.9 – Estrutura química dos principais constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.



Fonte: A autora.

Na literatura é relatada a utilização do óleo essencial de *C. citratus* como conservante alimentar, anti-inflamatório, diurético, antioxidante, anti-carcinogênico, antidiabético e antimicrobiano [47]. Também é reportado seu uso em formulações farmacêutica e cosmética, devido às suas propriedades conservante e repelente [77].

Estudos clínicos e pré-clínicos comprovaram que o óleo essencial da *C. citratus* produz diversas respostas farmacológicas no SNC, que resultaram em efeitos ansiolítico, analgésico, antidepressivo, anticonvulsivante e sedativo [50,79–81]. Desta forma, o óleo essencial pode ser eficaz em terapias complementares, como por exemplo na aromaterapia, em que a administração do óleo é realizada por inalação [82].

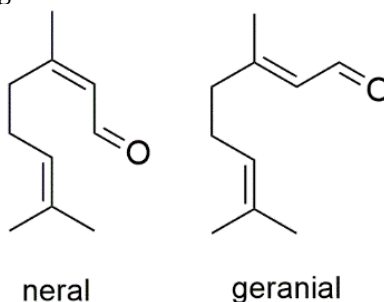
Alguns estudos da literatura sugeriram que as propriedades farmacológicas apresentadas pelo óleo essencial da *C. citratus* se deve principalmente à presença do citral na sua composição química. Entretanto, o sinergismo entre este monoterpene e os demais componentes do óleo essencial também contribuem para os efeitos reportados da planta [67,83,84].

1.1.6 Citral e geraniol

O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é uma mistura dos terpenóides, aldeídos isoméricos, neral (isômero-Z) e geranial (isômero-E) (Figura 1.10). Este aldeído α,β -insaturado

volátil presente abundantemente em várias plantas medicinais e frutas cítricas e é o principal constituinte químico do óleo essencial de *C. citratus* e da casca de limão [77]. O intenso odor apresentado pelo citral o tornou um aditivo popular para uma variedade de detergentes, alimentos e cosméticos [85].

Figura 1.10 – Estrutura química do neral e geranial.

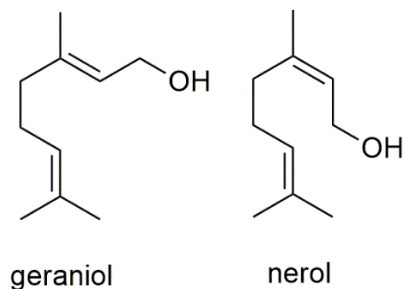


Fonte: A autora.

O citral possui propriedades terapêuticas e farmacológicas, como antiespasmódica, analgésica, anti-inflamatória, antipirética, diurética e sedativa [86–88]. Estudos comprovaram o potencial deste composto no tratamento de doenças causadas por bactérias, fungo e protozoários [85]. Além disso, também já foram relatados efeitos no SNC em estudos *in vivo*, como ansiolítico, anticonvulsivante e antidepressivo [86,88].

O geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadienol) é um importante constituinte químico de vários óleos essenciais, juntamente com o seu estereoisômero nerol (Figura 1.11). O geraniol puro é um óleo transparente ou amarelo claro que se dissolve na maioria dos solventes orgânicos [89]. É um dos ingredientes mais comuns presentes em fragrâncias, e foi detectado em aproximadamente 76% dos desodorantes, 41% dos detergentes e limpadores, e em 33% dos cosméticos à base de ingredientes naturais [89,90].

Figura 1.11 – Estrutura química do geraniol e nerol.

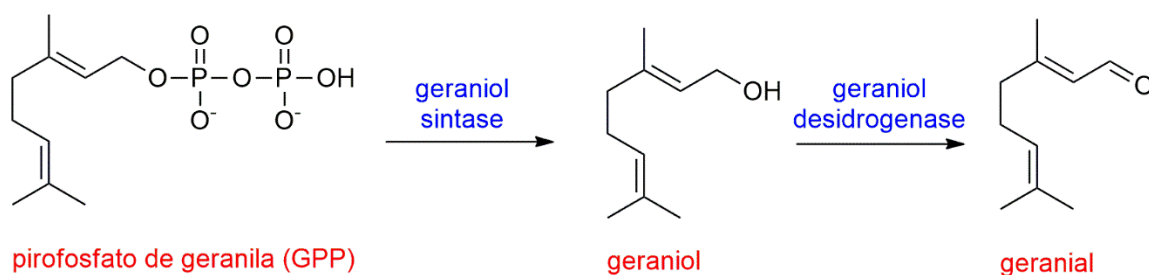


Fonte: A autora.

Estudos da literatura reportaram que o geraniol está presente em aproximadamente 250 óleos essenciais de diversas plantas, como por exemplo na *C. citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon winterianus* e *Cymbopogon nardus* [91]. Além disso, este terpeno possui interessantes propriedades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e anti-helmíntica. Também é descrita a atividade anticâncer deste composto contra alguns tipos de cânceres em humanos [91]. O geraniol apresentou efeito neuroprotetor, e protegeu contra os danos oxidativos induzido por rotenona na Doença de Parkinson [92].

A biossíntese do geraniol em espécies de *Cymbopogon* ocorre em uma etapa a partir do GPP (Figura 1.12). Primeiramente, ocorre a formação do geraniol mediada pela enzima geraniol sintase. Posteriormente, o geraniol é oxidado pela enzima geraniol desidrogenase para produzir o geranial [93,94].

Figura 1.12 – Biossíntese do geraniol e citral em espécies de *Cymbopogon*.



Fonte: Adaptado de [93].

1.1.7 Citotoxicidade de *Cymbopogon citratus* e compostos relacionados

Apesar das propriedades terapêuticas e farmacológicas apresentadas por plantas medicinais, estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram a toxicidade de extratos, óleos essenciais e de seus constituintes químicos [17,95,96]. Os fitoterápicos são frequentemente utilizados em conjunto com medicamentos convencionais e as interações cinéticas podem ser citotóxicas, desenvolvendo efeitos colaterais indesejáveis para os seres humanos [96,97]. A toxicidade de plantas medicinais está diretamente relacionada com a sua composição química, a qual é influenciada por alguns fatores, como a época de coleta do material vegetal, nutrientes de solo e estágio de desenvolvimento [98]. Os componentes de uma mistura, como extratos de plantas podem interagir por meio de efeitos sinérgico e antagônico e podem aumentar a penetração ou absorção de outros compostos [99].

Nos sistemas de cultura celular, uma amostra é considerada citotóxica se interferir na fixação das células, alterar significativamente a sua morfologia, afetar a taxa de crescimento

celular ou causar a morte celular [99]. Portanto, estudos relacionados à citotoxicidade de produtos naturais têm sido realizados por pesquisadores, como um primeiro passo na avaliação da toxicidade. O mecanismo de ação da maioria dos compostos tóxicos está associado a processos bioquímicos básicos comuns a todas as células, como por exemplo, a manutenção da integridade da membrana celular, atividade mitocondrial e síntese de proteínas [12,99].

Alguns estudos comprovaram que as bicamadas lipídicas da membrana celular são potenciais alvos para extratos de plantas medicinais constituídos por polifenóis e terpenos [100,101]. Estes compostos alteram a funcionalidade destas bicamadas devido às interações com seus componentes [101–103]. Os compostos fenólicos podem induzir quebras no DNA, mutações e aberrações cromossômicas. Os flavonoides podem interagir com as mitocôndrias, interferir nas vias do metabolismo intermediário e/ou regular negativamente a expressão de moléculas de adesão [95].

Várias espécies de plantas medicinais demonstraram toxicidade em diferentes estudos, dentre as quais pode-se destacar a *C. citratus* e seus principais constituintes químicos [17,96]. Por exemplo, Sinha e colaboradores [104] demonstraram que altas concentrações do óleo essencial de *C. citratus*, assim como do seu principal constituinte químico citral, foram genotóxicas a linfócitos humanos, devido a uma redução na viabilidade celular das células tratadas com estas amostras. Em outro estudo, Koba e colaboradores [105] verificaram que o óleo essencial extraído da *C. citratus* coletada na África foi citotóxico a células epidérmicas no ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio).

Chiamenti e colaboradores [106] avaliaram o efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* a células de adenocarcinoma de pulmão humano e células de rim. Os autores observaram que o extrato causou alterações em ambas as células, e sugeriram que os compostos químicos, como os polifenóis e os taninos interferiram na função celular. Outros estudos sugeriram que a presença de cumarinas, taninos, antraquinonas e saponinas contribuíram para os efeitos toxicológicos apresentados pela *C. citratus* [47].

Kpoviessi e colaboradores [107], verificaram que o óleo essencial de *C. citratus* foi citotóxico para as células de ovário de camundongas e moderadamente tóxico para as células de fibroblastos humanos. O citral, principal componente deste óleo, também foi tóxico para estas mesmas células. Entretanto, o pineno, que também estava presente em abundância, não apresentou toxicidade para essas células. Desta forma, os autores atribuíram à presença do citral na citotoxicidade apresentada pelo óleo essencial de *C. citratus*. Em outro estudo, foi demonstrado que o citral induziu a uma alta citotoxicidade e genotoxicidade a leucócitos humanos quando presente em altas concentrações [108].

O geraniol também foi considerado citotóxico e genotóxico quando presente em altas concentrações, em estudos *in vitro*, para células humanas mononucleares do sangue periférico e células de hepatoma humano [109]. Outros terpenos presentes no óleo essencial como o linalol, mirceno, timol, limoneno, eugenol e carvacrol exibiram efeitos toxicológicos em estudos *in vitro* e *in vivo* [110].

Neste sentido, em nosso estudo anterior [1], foi demonstrado que o óleo essencial de *C. citratus* era constituído por citral e geraniol, presentes também nas frações clorofórmicas obtidas por diferentes métodos de extração a partir do extrato hidroalcoólico. Além disso, as frações em acetato de etila (obtidas em meios ácido e básico) desta planta são ricas em polifenóis e apresentaram considerável atividade antioxidante por diferentes mecanismos químicos. Portanto, considerando-se o amplo uso popular da *C. citratus* no tratamento e prevenção de doenças, mais estudos são necessários para a avaliação da toxicidade desta planta e seus derivados para futuras aplicações.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a toxicidade de extratos, frações e do óleo essencial de *C. citratus*, além dos compostos isolados citral e geraniol em *Artemia salina* e em células sanguíneas humanas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade de extratos e frações de *C. citratus*, obtidas por diferentes métodos de extração, óleo essencial, citral e geraniol em *Artemia salina*;
- Avaliar a citotoxicidade de extratos e frações de *C. citratus*, obtidas por diferentes métodos de extração, óleo essencial, citral e geraniol em leucócitos e eritrócitos humanos;
- Identificar as possíveis alterações morfológicas causadas pelas amostras de *C. citratus*, citral e geraniol nos eritrócitos humanos.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia. O citral (95%), geraniol (98%), *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), Azul de Trypan, foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os cistos de *A. salina* (*Artemia* sp., *Artemiidae*) foram obtidos da Artêmia Salina do Rio Grande do Norte (Brasil).

A solução tampão PBS foi preparada a partir da dissolução dos sais NaCl 136 mmol L⁻¹, KCl 2,68 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 1,47 mmol L⁻¹ e NaHPO₄ 8,1 mmol L⁻¹ em água deionizada, e o pH foi ajustado para 7,4. A solução tampão Hank's foi preparada a partir da dissolução dos compostos KCl 5,4 mmol L⁻¹; NaHPO₄ 0,3 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 0,4 mmol L⁻¹, NaHCO₃ 4,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,5 mmol L⁻¹, NaCl 122,6 mmol L⁻¹, d-glucose 0,01 mmol L⁻¹, Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 1,3 mmol L⁻¹, em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,4. A solução de lise de hemácias foi preparada a partir da dissolução dos compostos NH₄Cl 150 mmol L⁻¹, NaHCO₃ 10 mmol L⁻¹ e EDTA 1 mmol L⁻¹, e o pH foi ajustado para 7,4. A solução tampão TFK foi preparada a partir da dissolução dos sais K₂HPO₄ 6,1 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 6,1 mmol L⁻¹ e NaCl 150 mmol L⁻¹, e o pH foi ajustado para 7,4. As soluções de dextrana e glutaraldeído foram preparadas a partir da dissolução e da diluição, respectivamente, da quantidade apropriada do composto em solução tampão PBS. A solução Azul de Trypan foi preparada a partir da dissolução da quantidade apropriada do reagente em solução tampão Hanks.

1.3.2 Coleta do material vegetal

As folhas de *C. citratus* foram coletadas no município de Ponta Grossa-PR (25° 05' 42" S; 50° 09' 43" W), no período de Março a Maio de 2017, secas a temperatura ambiente na ausência de luz até peso constante e cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm. Uma amostra de referência da planta está depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob o registro HUPG-21025.

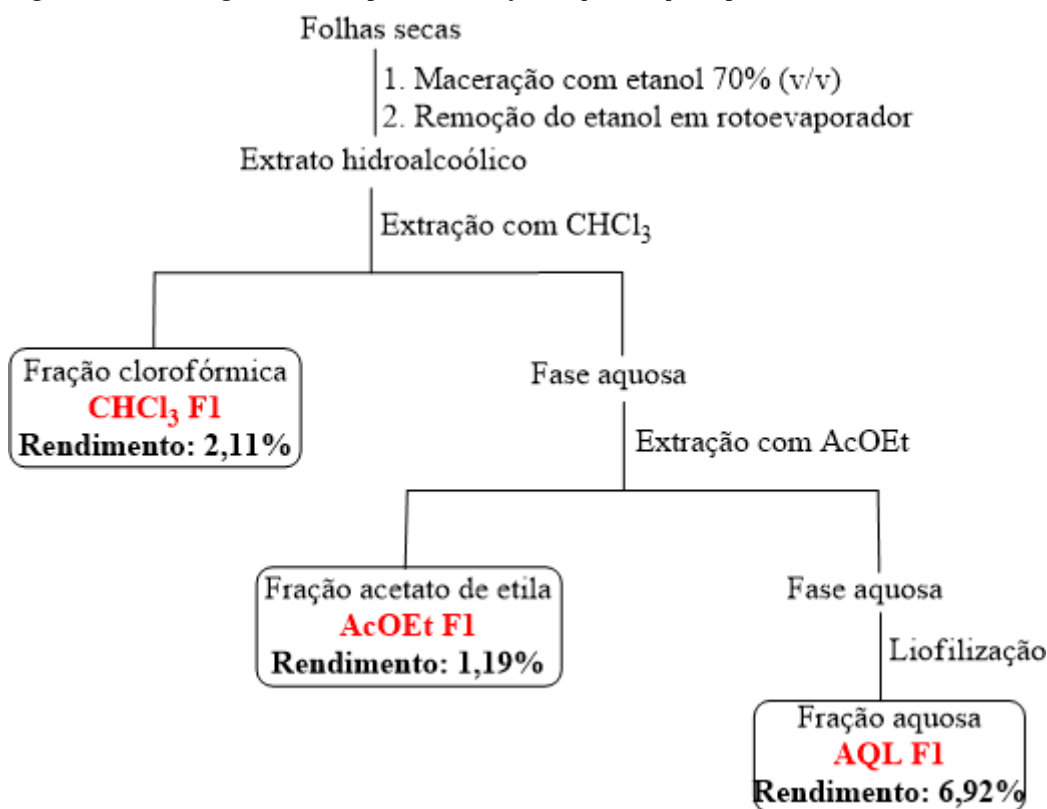
1.3.3 Obtenção dos extratos e frações de *Cymbopogon citratus*

O extrato aquoso (INF) foi preparado a partir da infusão das folhas secas de *C. citratus* por 15 minutos antes das análises. Os extratos etanólico (EtOH) e hidroalcoólico (HEtOH)

foram preparados a partir da maceração das folhas previamente secas durante 7 dias em frasco âmbar com os solventes etanol 99,9 % (v/v) e etanol 70 % (v/v), respectivamente. Devido aos resultados obtidos de composição química e atividade antioxidante obtidos em nosso estudo anterior [1], o extrato HEtOH foi selecionado para os procedimentos de fracionamento (1 – 4) descritos abaixo.

Fracionamento 1: Para a obtenção das frações, 70 g das folhas previamente secas de *C. citratus* foram maceradas em frasco âmbar com 1 L de etanol 70 % (v/v). O etanol foi removido em rotoevaporador e o resíduo aquoso remanescente foi filtrado a vácuo e extraído com clorofórmio (6 × 50 mL) para a obtenção da fração CHCl_3 F1, e em seguida, com acetato de etila (6 × 50 mL) para a obtenção da fração AcOEt F1. A fase aquosa remanescente foi liofilizada (AQL F1). Um esquema da extração está apresentado na Figura 1.13.

Figura 1.13 – Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 1.

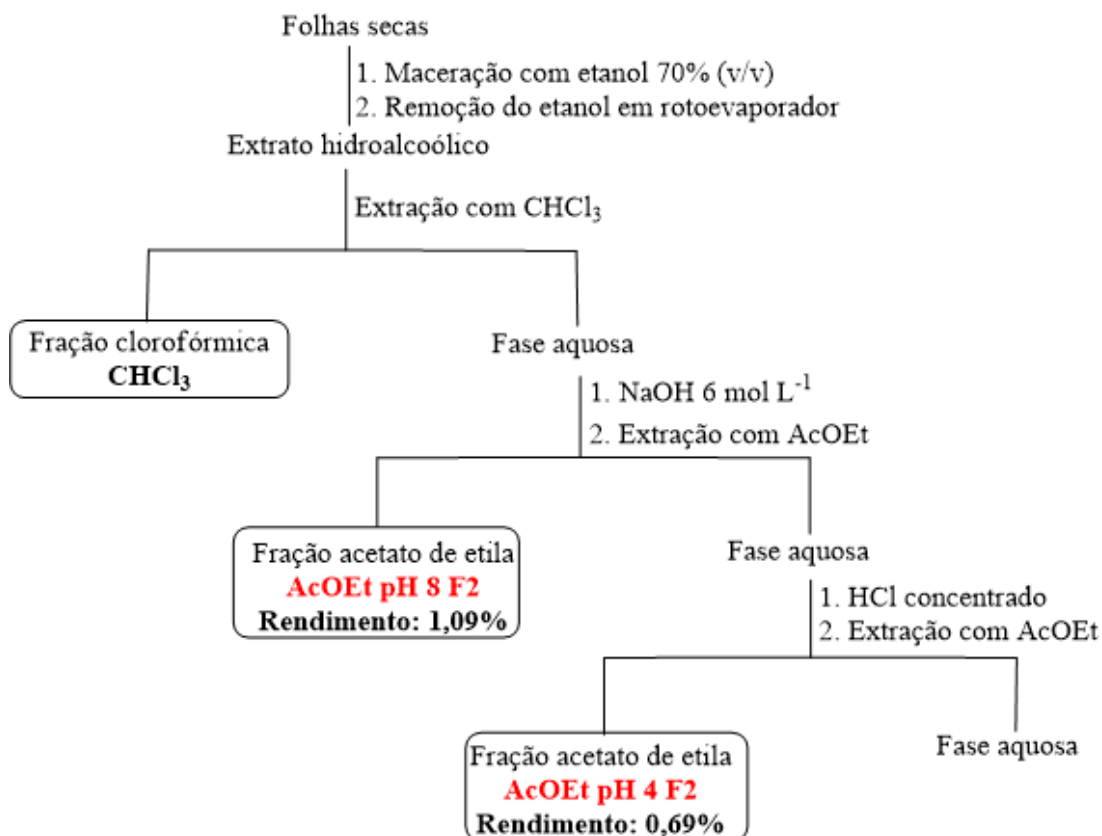


Fonte: A autora.

Fracionamento 2: As folhas secas de *C. citratus* foram maceradas com etanol 70 % (v/v) e o extrato obtido foi concentrado em rotoevaporador. A fase aquosa foi filtrada à vácuo e extraída com clorofórmio. Em seguida, o pH da fase aquosa remanescente foi ajustado para 8 com uma solução aquosa de NaOH 6 mol L^{-1} e extraída com acetato de etila para a obtenção da

fração (AcOEt pH 8 F2). Posteriormente, o pH da solução aquosa resultante foi ajustado para 4 com HCl concentrado, e extraída com acetato de etila (AcOEt pH 4 F2). Um esquema de extração está apresentado na Figura 1.14.

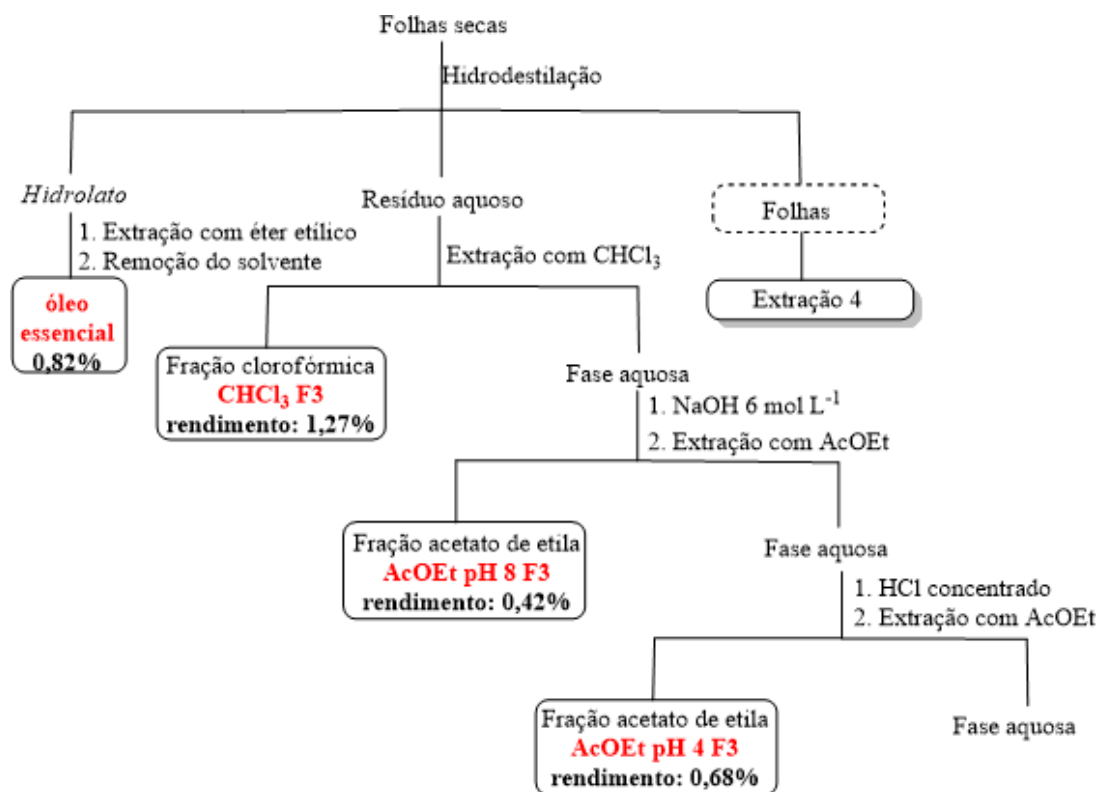
Figura 1.14 – Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 2.



Fonte: A autora.

Fracionamento 3: Primeiramente, o óleo essencial foi removido das folhas secas de *C. citratus* por meio de uma hidrodestilação em Clevenger. O hidrolato obtido a partir deste procedimento foi extraído com éter etílico (4 × 20 mL) para a obtenção do óleo essencial. O resíduo aquoso remanescente do processo de hidrodestilação foi submetido às mesmas extrações descritas no fracionamento 2. Os solventes foram removidos e obtiveram-se as frações denominadas CHCl₃ F3, AcOEt pH 8 F3 e AcOEt pH 4 F3. Um esquema de extração está apresentado na Figura 1.15.

Figura 1.15 – Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 3.

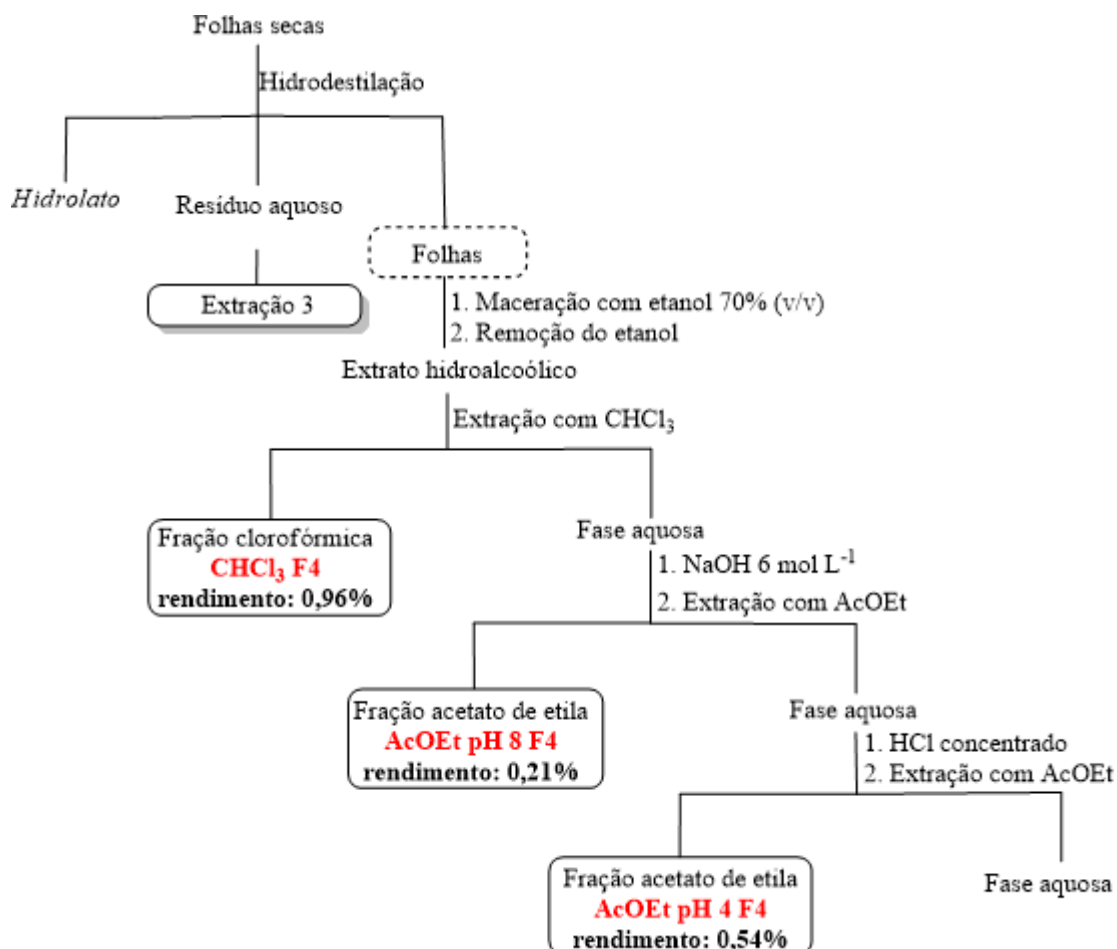


Fonte: A autora.

Fracionamento 4: As folhas da planta remanescentes do fracionamento 3 foram maceradas com etanol 70 % (v/v), filtrada e concentrada em rotoevaporador. O resíduo aquoso foi extraído como descrito no fracionamento 2. Os solventes foram removidos em rotoevaporador para a obtenção das frações CHCl_3 F4, AcOEt pH 8 F4, AcOEt pH 4 F4. Um esquema de extração está apresentado na Figura 1.16.

Todas as fases orgânicas obtidas nos processos de extração foram secas com Na_2SO_4 anidro e filtradas. Os solventes orgânicos foram removidos a pressão reduzida em rotoevaporador (a aproximadamente 40 °C), e as frações foram ressuspensas em solvente apropriado para as análises de toxicidade.

Figura 1.16 – Fluxograma das etapas das extrações líquido-líquido para o fracionamento 4.



Fonte: A autora.

1.3.4 Avaliação da toxicidade de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol frente à *Artemia salina*

Para a determinação da toxicidade dos extratos, das frações e do óleo essencial de *C. citratus*, além dos padrões citral e geraniol, foram empregadas larvas de *A. salina* de acordo com o método proposto por Meyer e colaboradores [111]. Inicialmente, as larvas de *A. salina* foram cultivadas em um aquário com solução saturada de água salina a 25 °C (19 g de sal marinho em 1L de água destilada). Após 48 horas da eclosão dos cistos, os microcrustáceos foram transferidos com auxílio de uma micropipeta para uma microplaca de 24 cavidades com solução marinha. Em seguida foram adicionados 20 µL das amostras de *C. citratus* e dos padrões citral e geraniol, diluídos em etanol, a diferentes concentrações (25 – 1.000 µg mL⁻¹). A placa foi incubada a temperatura ambiente por 24 horas e, posteriormente, foram contados os números de microcrustáceos mortos. A DL₅₀ foi calculada a partir da curva da porcentagem de mortalidade em função das concentrações avaliadas. Como controle positivo foi utilizada

solução aquosa de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($25 - 1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e como controle negativo etanol 99.5% (v/v). As análises foram realizadas em triplicata.

1.3.5 Viabilidade celular de leucócitos humanos

Inicialmente, o sangue foi coletado em tubos heparinizados de doadores voluntários da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CAAE 98156118.2.0000.0105). Os leucócitos foram separados a partir de 8 mL de sangue e posterior repouso, por 1 hora a temperatura ambiente, com 2 mL de uma solução de dextrana 0,5% (m/v), diluída em solução tampão PBS 1% (m/v). O sobrenadante foi descartado e, em seguida foi realizada uma centrifugação a $2.000 \times g$ por 10 minutos. A fase superior foi removida, e o *pellet* remanescente foi lavado com uma solução para lise de hemácias. O tubo foi homogeneizado, deixado em repouso por 5 minutos, centrifugado a $2.000 \times g$ por 2 minutos e o *pellet* foi novamente lavado com a solução para lise de hemácias. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de solução tampão Hanks pH 7,4 e a concentração de leucócitos foi ajustada para 2×10^6 leucócitos mL^{-1} .

A viabilidade celular dos extratos, frações e óleo essencial de *C. citratus*, e para os padrões citral e geraniol foi avaliada em leucócitos humanos de acordo com o método descrito por Mischell e Shiingi [112]. Inicialmente, foram adicionados 2,5 μL das amostras na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 497,5 μL da suspensão celular de leucócitos e as misturas foram incubadas em banho termostático por 3 horas a 37°C . Após a incubação, 50 μL de cada suspensão celular foi adicionada a um volume de 50 μL de uma solução Azul de Trypan 0,4% (m/v) e novamente deixada em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. A viabilidade celular foi determinada microscopicamente em uma câmara de Neubauer. O número de células viáveis foi dividido pelo número total de células e multiplicado por 100. Uma solução aquosa de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) a 1 mmol L^{-1} foi utilizado como controle positivo, enquanto etanol 99,9% (v/v) ou água destilada como controle negativo. As análises foram realizadas em triplicata.

1.3.6 Fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

O sangue foi coletado em tubos com EDTA de doadores voluntários da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os eritrócitos foram separados a partir da centrifugação do sangue a $2.500 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente e o plasma foi descartado. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução tampão TFK e centrifugados a $2.500 \times g$.

A fragilidade osmótica dos eritrócitos foi estimada por meio da medida da resistência a lise por aumento na concentração de soluções salinas de acordo com o método proposto por Godal e Heisto [113]. Inicialmente, foram misturados 500 μL da suspensão de eritrócitos, 100 μL dos extratos, frações, óleo essencial, citral e geraniol ($1 - 400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 900 μL de solução tampão TFK $6,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Em seguida, estas misturas foram incubadas por 3 horas a 37°C em banho termostatizado. Após este período de incubação, os tubos com os eritrócitos previamente tratados e não tratados foram homogeneizados, centrifugados a $2.500 \times g$ por 10 minutos, e os sobrenadantes foram descartados. Os eritrócitos foram lavados por mais duas vezes com 1 mL de solução tampão TFK $6,1 \text{ mmol L}^{-1}$, centrifugados a $2.500 \times g$ por 2 minutos e a fase superior foi descartada. Em seguida, 7,5 μL dos eritrócitos tratados e não tratados foram adicionados a tubos contendo 1,5 mL de soluções aquosas de NaCl 0 – 0,9% (m/v). Estas misturas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente, homogeneizadas e centrifugadas a $2.500 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços e o teor de hemoglobina foi determinado a 540 nm em leitora de placas. O valor de 100% da lise foi determinado para o sobrenadante do tubo que continha apenas os eritrócitos e água destilada. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como porcentagem em relação ao controle.

1.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)

Após 3 horas de incubação a 37°C (como descrito no item 1.3.6), os eritrócitos tratados e não-tratados com as amostras de *C. citratus* e com os padrões citral e geraniol foram fixados com solução de glutaraldeído 3 % (v/v) durante 1 hora a 4°C , e os tubos foram periodicamente homogeneizados. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $2.000 \times g$ durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução tampão PBS para remover o glutaraldeído remanescente. Em seguida, os eritrócitos foram desidratados com soluções de etanol (25 – 99,9 %) (v/v). Por fim, as amostras foram adicionadas em *stubbs* de alumínio, secas e revestidas com uma fina camada de ouro por pulverização catódica, seguida por análise de FESEM em um microscópio TESCAN MIRA 3 a 10 kV.

1.3.8 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (D.P). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e

as médias dos grupos foram comparadas pelo teste Tukey e $p < 0,05$ foi considerado significativo para todos os casos. O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Toxicidade frente a *Artemia salina*

Diversas plantas medicinais são popularmente consumidas devido aos seus efeitos benéficos, dos quais muitos já foram comprovados cientificamente. Contudo, são poucos os estudos que avaliam os seus possíveis efeitos toxicológicos. Desta forma, os ensaios que avaliam a toxicidade são importantes para garantir a segurança na utilização de extratos vegetais, principalmente, aqueles que são usados para fins medicinais. Além disso, estudos demonstraram que compostos bioativos presentes em altas concentrações nos extratos, podem apresentar certa toxicidade [114,115].

Um método bastante utilizado na avaliação da toxicidade de extratos vegetais é a partir do ensaio com *A. salina* (Figura 1.17), pois é um método simples, rápido, e requer pouca quantidade de amostra para os testes [116–118]. Estudos da literatura demonstraram que os resultados obtidos por este ensaio exibiram uma elevada correlação com aqueles realizados em ratos [119,120]. Este modelo pode ser utilizado como um ensaio preliminar na avaliação de extratos que podem apresentar alguma atividade biológica, como anticâncer e antifúngica [111]. Além disso, foi demonstrado que extratos obtidos de diferentes plantas medicinais foram considerados tóxicas por meio deste método [121–123]. As membranas da *A. salina* são constituídas por fosfolipídios, como a cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, dentre outros lipídios [124]. Desta forma, os compostos presentes em amostras de produtos naturais podem interagir com estes componentes das membranas destes microcrustáceos [120].

Figura 1.17 – *Artemia salina*.



Fonte: [125].

Na Tabela 1.1 estão apresentados os valores da DL_{50} no ensaio de toxicidade frente à *A. salina* obtidos para os extratos, frações e óleo essencial de *C. citratus*, e para os compostos isolados citral e geraniol. De acordo com Meyer e colaboradores [111] e Bussman e colaboradores [126], valores de DL_{50} na faixa de 500 – 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados de baixa toxicidade, valores entre 100 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de moderada toxicidade, e valores inferiores à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como de alta toxicidade. Entretanto, uma amostra é considerada atóxica quando o valor de DL_{50} é superior a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1.1, os extratos INF e EtOH, e as frações CHCl_3 F1, AQL F1, CHCl_3 F3, AcOEt pH 8 F3, AcOEt pH 8 F4, não apresentaram toxicidade frente a este método, pois os valores da DL_{50} foram superiores a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, foi observado que o extrato HEtOH e as frações AcOEt F1, AcOEt pH 8 F2, AcOEt pH 4 F2, AcOEt pH 4 F3, CHCl_3 F4, e AcOEt pH 4 F4 exibiram uma moderada toxicidade para a *A. salina* ($p < 0,05$), com valores de DL_{50} que variaram de 146,12 – 433,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1.1).

Alguns compostos presentes em plantas medicinais, como os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, alcaloides, esteroides e as saponinas, são considerados tóxicos para a *A. salina* e podem ser os responsáveis pelo efeito citotóxico apresentado por extratos [127]. Em nosso trabalho anterior, foi verificado que as frações obtidas em acetato de etila eram constituídas por uma alta concentração de compostos fenólicos [1], o que pode justificar a toxicidade observada neste ensaio. O efeito sinérgico dos constituintes químicos presentes nestas misturas também pode estar relacionado com a toxicidade das amostras de *C. citratus*. Além disso, é reportado que estes microcrustáceos são altamente vulneráveis a toxinas nos primeiros estágios de desenvolvimento [128].

Tabela 1.1 - Valores de DL₅₀ para os extratos, frações e óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol frente a *Artemia salina*.

Amostras	DL ₅₀ (µg mL ⁻¹)*
Controle (água)	>1000
Controle (etanol)	>1000
K ₂ Cr ₂ O ₇	26,38±12,09 a
INF	>1000
EtOH	>1000
HEtOH	433,15±30,75 b
CHCl ₃ F1	>1000
AcOEt F1	440,64±60,18 b
AQL F1	>1000
AcOEt pH 8 F2	313,06±6,49 c
AcOEt pH 4 F2	146,12±22,05 d
CHCl ₃ F3	>1000
AcOEt pH 8 F3	>1000
AcOEt pH 4 F3	281,93±2,43 c
CHCl ₃ F4	400,09±52,60 b
AcOEt pH 8 F4	>1000
AcOEt pH 4 F4	255,86±14,88 e
Óleo essencial	61,19±18,66 f
Citral	37,62±9,83 a
Geraniol	71,03±11,76 f

* Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3).

Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem pelo teste Tukey a $p < 0,05$.

Alguns estudos demonstraram uma correlação positiva entre a citotoxicidade e a lipofilicidade de flavonoides [129,130]. O número de grupos hidroxila no anel B dos flavonoides é inversamente correlacionado com a lipofilicidade destes compostos. A alta afinidade pelas bicamadas lipídicas pode ser parcialmente atribuída às suas estruturas rígidas e coplanares devido ao seu sistema conjugado [131]. Portanto, a passagem por meio das membranas celulares, de natureza lipídica ou proteica, é determinada por sua lipossolubilidade. Substâncias hidrofílicas (como a rutina) têm mais dificuldade em atravessar a barreira imposta pela membrana celular, ao contrário de substâncias lipofílicas que são mais facilmente incorporadas por ela [131].

A partir dos dados contidos na Tabela 1.1, foi possível verificar que o óleo essencial de *C. citratus*, assim como o citral e o geraniol (componentes majoritários presentes no óleo essencial) [1] foram considerados tóxicos neste ensaio, com valores de DL₅₀ inferiores a 100 µg mL⁻¹. Portanto, o efeito sinérgico destes terpenos com os compostos minoritários pode justificar a toxicidade do óleo essencial neste modelo [127], visto que estes podem atravessar as membranas celulares e penetrar no interior da célula. Na literatura é relatado que os óleos essenciais de diferentes plantas medicinais também exibiram toxicidade neste ensaio [123,127] e que os monoterpenos podem interagir com os componentes das membranas celulares da *A. salina* [132]. Sabe-se que a toxicidade exibida por óleos essenciais de plantas medicinais depende diretamente da sua composição química, a qual é influenciada pela posição geográfica,

variações sazonais e ecológicas, método de extração empregado e a parte da planta utilizada nas extrações [126].

No entanto, vale ressaltar que os dados obtidos no ensaio da *A. salina* são preliminares para a investigação do potencial toxicológico de plantas medicinais e, portanto, não podem ser correlacionados com o potencial toxicológico para humanos. Este invertebrado possui um sistema orgânico primitivo e não possui sistema imunológico adaptativo, o que limita o seu uso para avaliar a toxicidade em seres humanos [133]. Assim, testes citotóxicos *in vitro* com células humanas podem ser realizados para validar os resultados de toxicidade para amostras de plantas em *A. salina* [134,135]. Desta forma, a citotoxicidade dos extratos, frações e do óleo essencial de *C. citratus*, assim como do citral e do geraniol foi investigada em células humanas (leucócitos e eritrócitos).

1.4.2 Citotoxicidade em leucócitos humanos

O ensaio da citotoxicidade em leucócitos por meio do método da exclusão com o corante Azul de Trypan é frequentemente empregado na avaliação da toxicidade de extratos provenientes de plantas [136–138]. Neste ensaio, é possível determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão celular. O seu princípio é o de que as células vivas possuem membranas celulares intactas, que excluem certos corantes como o Azul de Trypan, enquanto nas células mortas, este corante pode adentrar nas células devido a perda da seletividade da membrana [139].

Na Tabela 1.2 estão apresentados os resultados da porcentagem de leucócitos viáveis expostos aos extratos, frações e ao óleo essencial obtidos a partir das folhas de *C. citratus*, e para os compostos isolados citral e geraniol. Não foi observada uma redução significativa na viabilidade celular após 3 horas de exposição dos leucócitos aos extratos (INF, EtOH e HEtOH), e às frações obtidas nos fracionamentos 1, 2 e 3 na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparada ao controle, exceto para a fração clorofórmica CHCl_3 F1. A não toxicidade dos extratos pode ser justificada devido à alta hidrofiliabilidade dos componentes presentes e, com isso, baixa incorporação na membrana celular lipídica.

No entanto, após o tratamento dos leucócitos com a fração CHCl_3 F1 e o óleo essencial na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi verificada uma redução no número de células viáveis ($p < 0,05$). Foi demonstrado que estas amostras eram constituídas pelos terpenos citral e geraniol [1], que também reduziram o número de leucócitos viáveis na suspensão celular (Tabela 1.2). Assim, pode-se inferir que a presença destes compostos podem ser os responsáveis pela

citotoxicidade exibida por esta fração e pelo óleo essencial. Entretanto, estas amostras na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ exibiram citotoxicidade comparável ao controle *t*-BHP (Tabela 1.2), enquanto na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não houve diferença estatística com o controle.

Além disso, a viabilidade celular dos leucócitos também foi diminuída para todas as frações obtidas no fracionamento 4 (CHCl_3 F4, AcOEt pH 8 F4 e AcOEt pH 4 F4), na qual o óleo essencial foi previamente removido das folhas (Tabela 1.2). Em nosso estudo anterior, foi demonstrado que estas frações apresentaram um maior teor de compostos fenólicos, comparado com aquelas obtidas nos fracionamentos 1, 2 e 3 [1]. Desta forma, as frações que exibiram um maior teor destes compostos também foram citotóxicas para os leucócitos (Tabela 1.2). Neste caso, sugere-se que a prévia remoção do óleo essencial das folhas de *C. citratus* facilitou a extração de compostos que interagem com os componentes da membrana celular [1]. Na literatura é demonstrado que uma alta concentração destes compostos pode levar à citotoxicidade de extratos, devido à sua interação com os componentes da membrana, como os lipídios e as proteínas [102,114,130,140].

Na Tabela 1.2 também estão apresentados os resultados da viabilidade celular para as frações CHCl_3 F4, AcOEt pH 8 F4 e AcOEt pH 4 F4, em diferentes concentrações (100 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$), os quais exibiram citotoxicidade na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi possível observar que houve um aumento no número de células inviáveis com o aumento da concentração destas amostras ($p < 0,05$). No entanto, na concentração mais baixa (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para as frações CHCl_3 F4, AcOEt pH 8 F4, AcOEt pH 4 F4, o número de células viáveis foi comparável ao controle.

Tabela 1.2 – Viabilidade celular da *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol em leucócitos humanos após 3 horas de exposição a 37 °C.

Amostras	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Viabilidade celular (%)
Controle (água)	-	98,00 $\pm$ 1,20 a
Controle (etanol)	-	97,33 $\pm$ 0,60 a
<i>t</i> -BHP	1 mmol L ⁻¹	56,60 $\pm$ 1,73 c
INF	200	97,33 $\pm$ 1,15 a
EtOH		97,67 $\pm$ 0,58 a
HEtOH		97,67 $\pm$ 0,58 a
CHCl ₃ F1	100	83,67 $\pm$ 5,34 a
	200	62,33 $\pm$ 8,72 b
	400	52,53 $\pm$ 7,94 c
AcOEt F1	200	92,30 $\pm$ 3,60 a
AQL F1		95,67 $\pm$ 4,04 a
AcOEt pH8 F2	200	96,33 $\pm$ 1,53 a
AcOEt pH4 F2		97,33 $\pm$ 1,16 a
CHCl ₃ F3	200	96,67 $\pm$ 1,53 a
AcOEt pH8 F3		89,33 $\pm$ 9,10 a
AcOEt pH4 F3		96,67 $\pm$ 2,33 a
CHCl ₃ F4	100	83,67 $\pm$ 5,34 a
	200	71,20 $\pm$ 4,36 b
	400	25,00 $\pm$ 3,61 d
AcOEt pH8 F4	100	94,67 $\pm$ 5,67 a
	200	80,34 $\pm$ 1,15 b
	400	63,67 $\pm$ 11,93 c
AcOEt pH4 F4	100	95,10 $\pm$ 7,80 a
	200	79,00 $\pm$ 6,51 b
	400	66,34 $\pm$ 3,52 c
Óleo essencial	100	89,30 $\pm$ 3,61 a
	200	72,67 $\pm$ 10,70 b
	400	49,40 $\pm$ 6,93 c
Citral	100	96,45 $\pm$ 4,30 a
	200	75,65 $\pm$ 2,87 b
	400	55,67 $\pm$ 3,70 c
Geraniol	100	93,00 $\pm$ 3,42 a
	200	62,84 $\pm$ 1,00 b
	400	43,34 $\pm$ 5,92 c

*Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (D.P) de três experimentos independentes (n=3) realizados em duplicata. Médias seguidas por letras diferentes (a – d) diferem estatisticamente na mesma coluna no teste Tukey a $p < 0,05$.

Neste estudo, o *t*-BHP foi utilizado como controle positivo devido à sua citotoxicidade bem conhecida [141,142]. Os efeitos citotóxicos deste composto são atribuídos a dois principais mecanismos: i) a sua decomposição em radicais alcóxila (RO[•]) e peróxila (ROO[•]), os quais podem induzir a produção de EROs (como o H₂O₂ e OH⁻) na presença de Fe²⁺ celular, que acelerará as reações em cadeia de peroxidação lipídica e danos ao DNA e ii) a alteração no metabolismo da glutatona (GSH) que leva a altas concentrações de cálcio citosólico e, consequentemente, lesão da membrana [142]. Estes radicais livres depletam as reservas

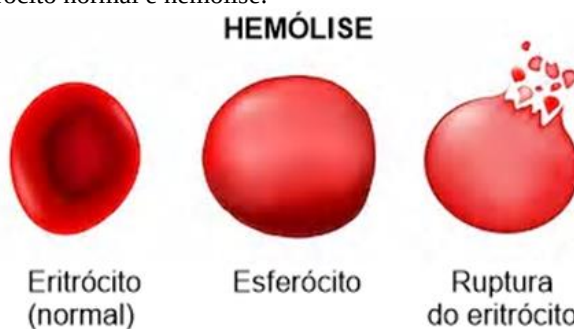
intracelulares de tióis e GSH e os sistemas antioxidantes, o que por sua vez, leva à morte celular [141].

1.4.3 Fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

Neste trabalho, a citotoxicidade das amostras de *C. citratus* e dos padrões citral e geraniol também foi avaliada em eritrócitos humanos, que são as células responsáveis pelo transporte de oxigênio no organismo [143]. O ensaio da fragilidade osmótica também é bastante utilizado para avaliar a citotoxicidade de extratos provenientes de plantas medicinais [137,144,145], pois alguns trabalhos da literatura demonstraram que estes podem levar a alterações na estrutura e na fisiologia dos eritrócitos [146,147].

Os eritrócitos foram utilizados para avaliar a estabilidade de membranas, uma vez que a sua lise libera a proteína hemoglobina, cuja concentração pode ser medida espectrofotometricamente [148]. Esta estabilidade osmótica está correlacionada com a sua resistência à lise, devido à variação na tonicidade de soluções aquosas, e pode ser medida por meio da liberação da hemoglobina após um determinado período de incubação do sangue [148]. Nas soluções salinas hipotônicas, os eritrócitos absorvem a água do meio externo e incham, com a consequente desintegração da membrana celular e liberação da hemoglobina intracelular (Figura 1.18). Em soluções de NaCl nas concentrações de 0,5% e acima, a membrana plasmática dos eritrócitos normalmente permanece estável e nenhuma hemólise detectável ocorre [149]. Entretanto, se algum composto ou agente externo ao qual os eritrócitos estão expostos desestabilizar de alguma forma a membrana celular, é esperado que as células sofram hemólise nas concentrações salinas acima do normal [148].

Figura 1.18 – Estrutura de um eritrócito normal e hemólise.

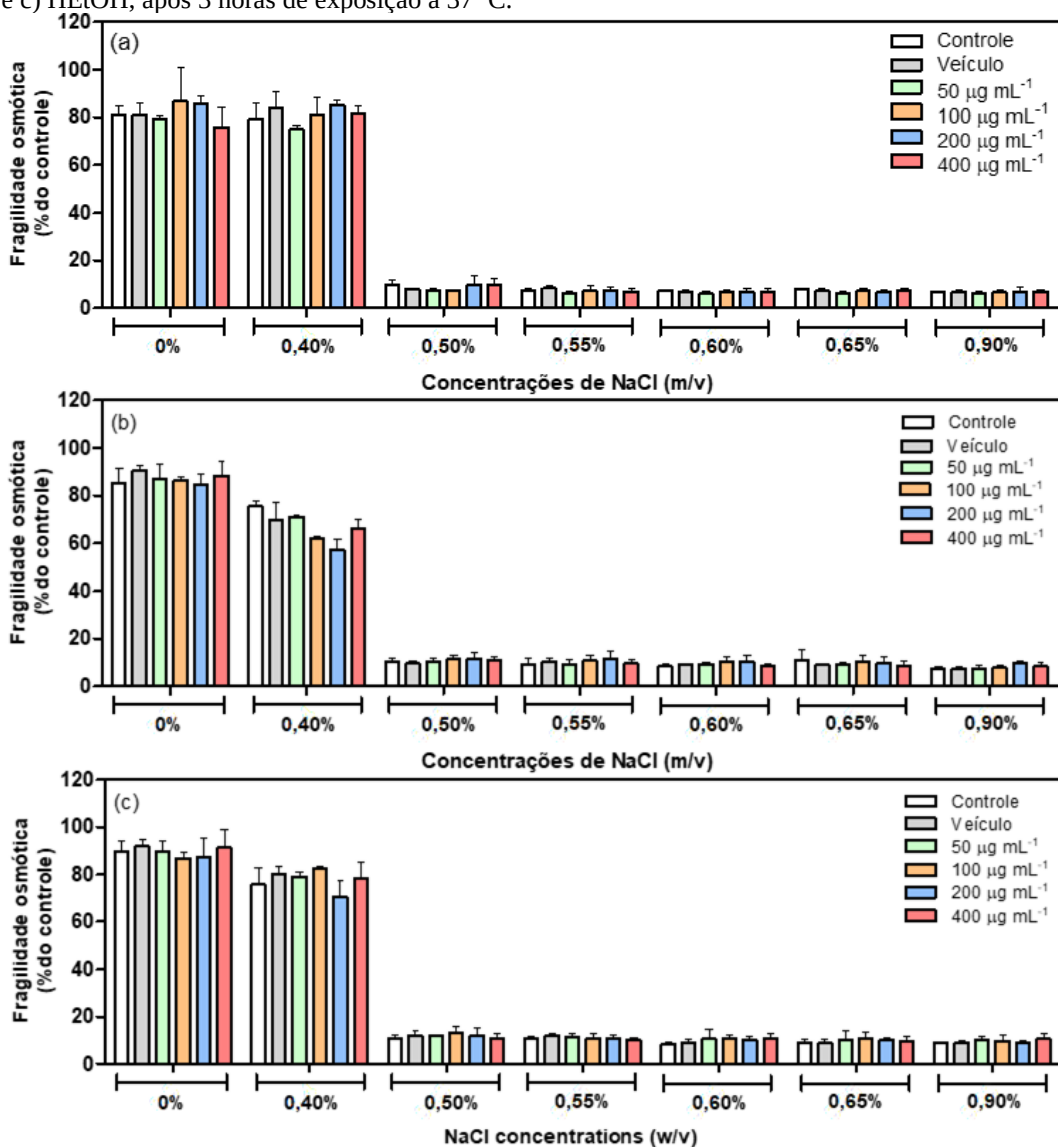


Fonte: Adaptado de [150].

A influência dos extratos, frações e do óleo essencial de *C. citratus* na fragilidade osmótica dos eritrócitos é demonstrada nas Figuras 1.19, 1.20, 1.21, 1.22 e 1.23. De maneira

geral, após 3 horas de exposição aos extratos e frações, a fragilidade osmótica não foi induzida a diferentes concentrações de NaCl (0 – 0,9%) (m/v), quando comparado ao seu respectivo controle. Ou seja, não foram detectadas alterações na integridade das membranas dos eritrócitos. Estes resultados indicaram que os compostos químicos dos extratos de *C. citratus* não causaram alterações extensas na proteína das membranas e na estrutura lipídica das células. Contudo, pode-se perceber que a concentração mais alta (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) das frações CHCl_3 F3, CHCl_3 F4, AcOEt pH 8 F3 e AcOEt pH 8 F4 (Figuras 1.22 e 1.23) ocasionaram um leve aumento na fragilidade osmótica nas soluções de NaCl (0,50 – 0,60%) (m/v) ($p < 0,05$). Estas alterações na integridade da membrana podem estar relacionadas aos compostos presentes nas frações, que são capazes de interagir com os constituintes da membrana, e podem modificar o transporte de íons ou o equilíbrio de transporte osmótico.

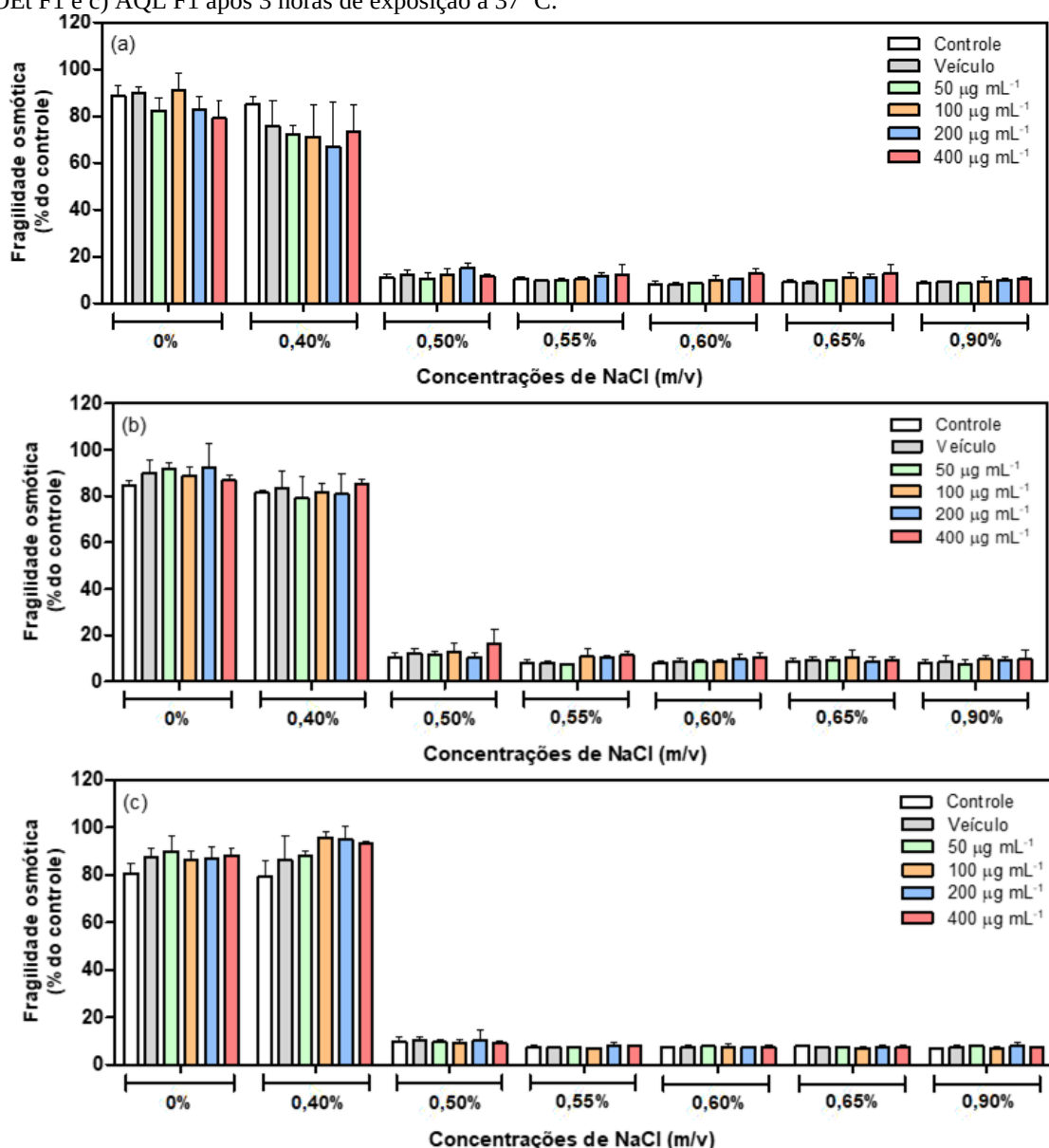
Figura 1.19 – Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com os extratos de *Cymbopogon citratus* a) INF; b) EtOH e c) HEtOH, após 3 horas de exposição a 37 °C.



Fonte: A autora.

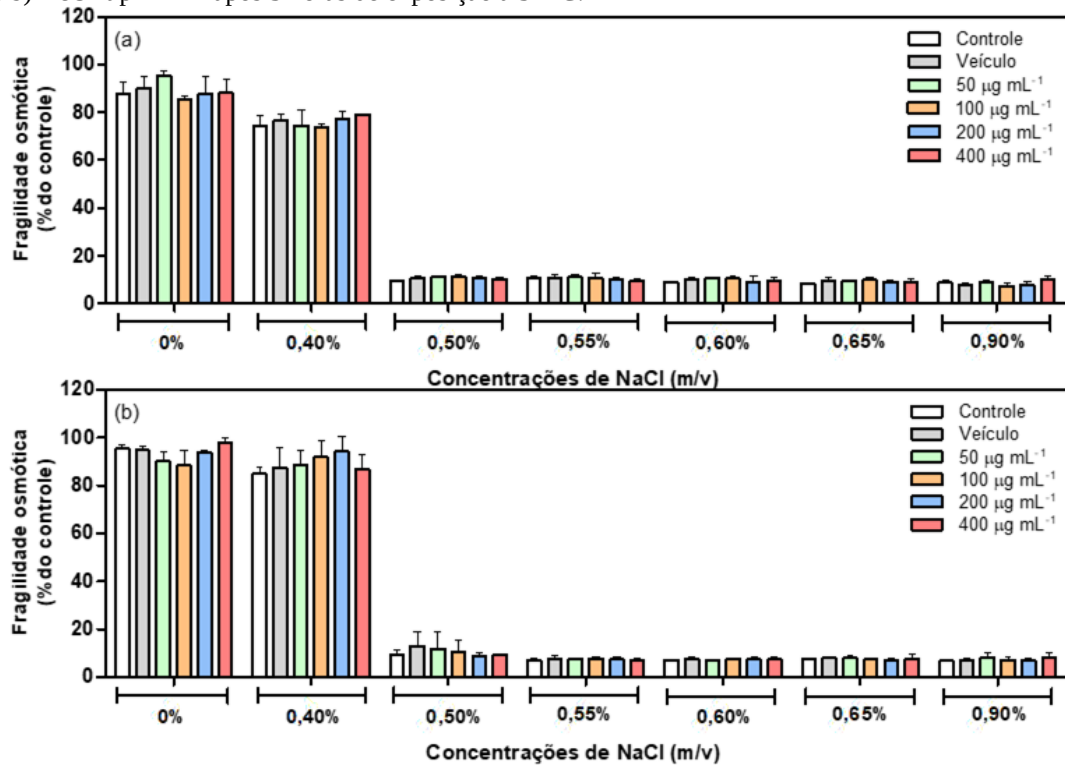
Como já mencionado, a presença dos terpenos (cital e geraniol) nas frações clorofórmicas pode ser responsável pelo efeito observado. Além disso, os polifenóis podem ter contribuído para a citotoxicidade apresentada pelas frações acetato de etila, pois estes compostos possuem afinidade com a camada lipídica da membrana celular [103]. Estes compostos podem formar ligações de hidrogênio com os componentes da membrana plasmática, com os grupos hidroxila (OH) como doadores de átomos de hidrogênio e os átomos de oxigênio presentes no fosfolipídio como aceitadores de hidrogênio [103].

Figura 1.20 – Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com frações de *Cymbopogon citratus* a) CHCl₃ F1; b) AcOEt F1 e c) AQL F1 após 3 horas de exposição a 37 °C.



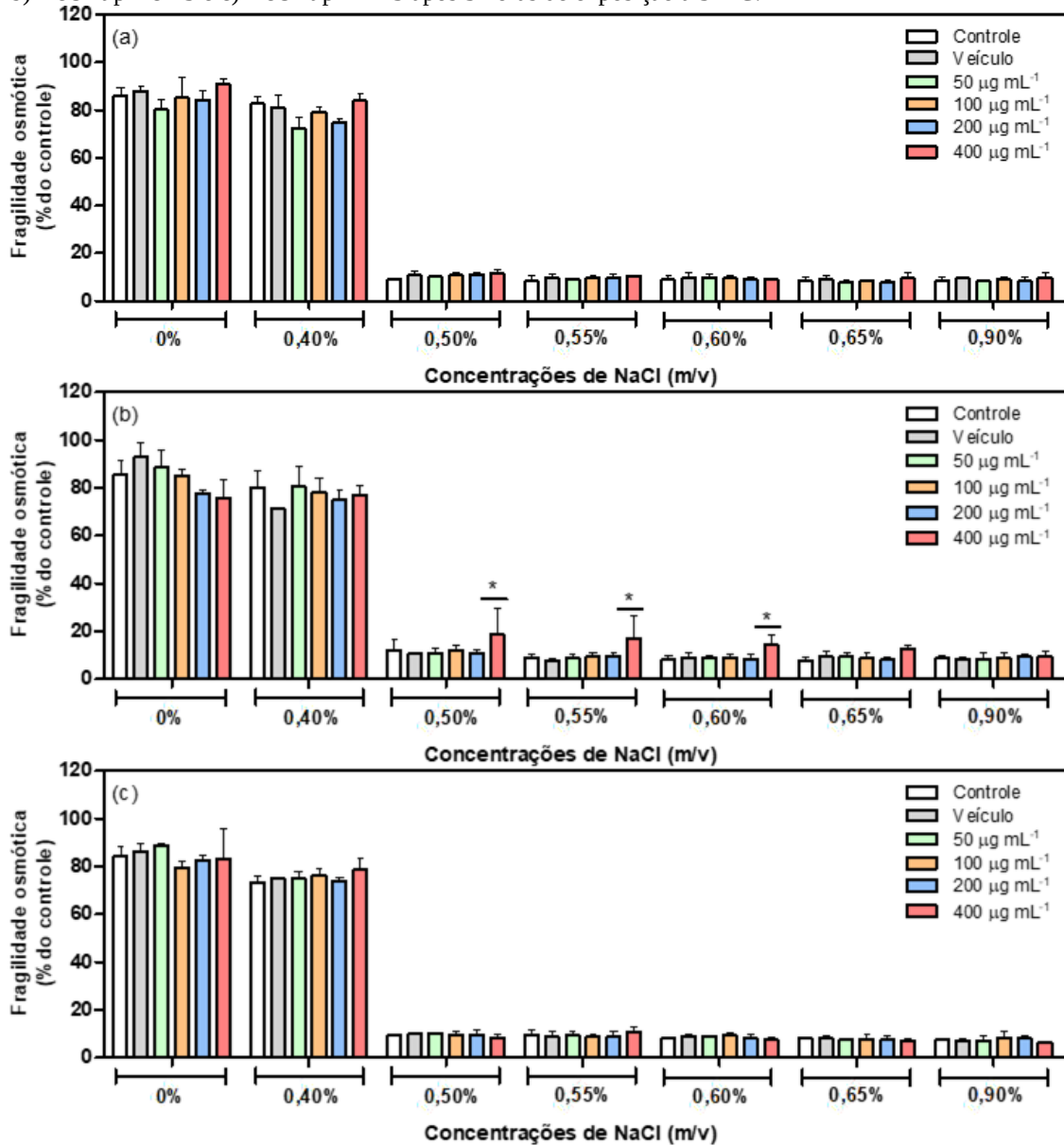
Fonte: A autora.

Figura 1.21 – Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com as frações de *Cymbopogon citratus*. a) AcOEt pH 8 F2 e b) AcOEt pH 4 F2 após 3 horas de exposição a 37 °C.



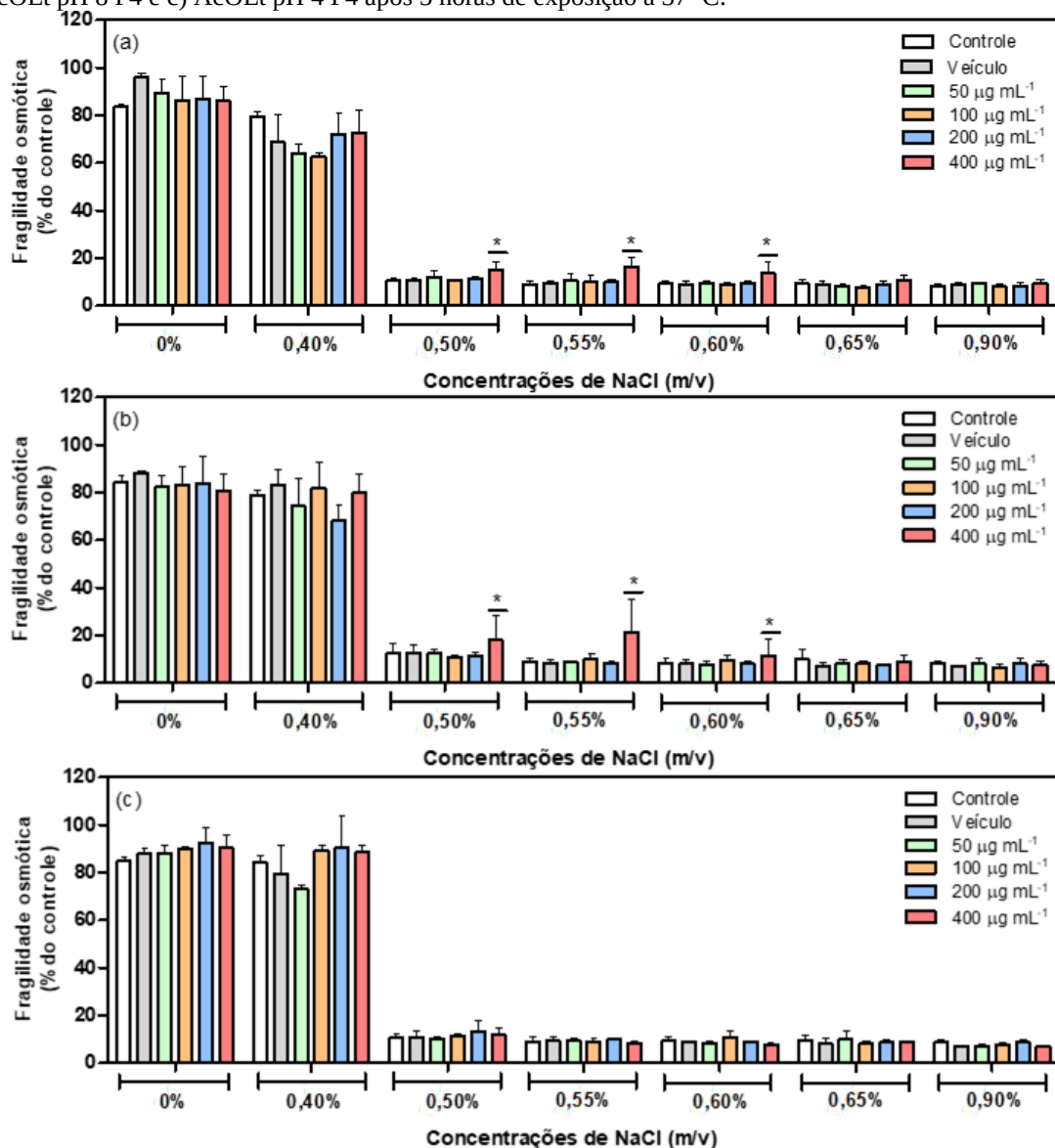
Fonte: A autora.

Figura 1.22 – Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com as frações de *Cymbopogon citratus*. a) CHCl_3 F3; b) AcOEt pH 8 F3 e c) AcOEt pH 4 F3 após 3 horas de exposição a 37 °C.



Fonte: A autora.

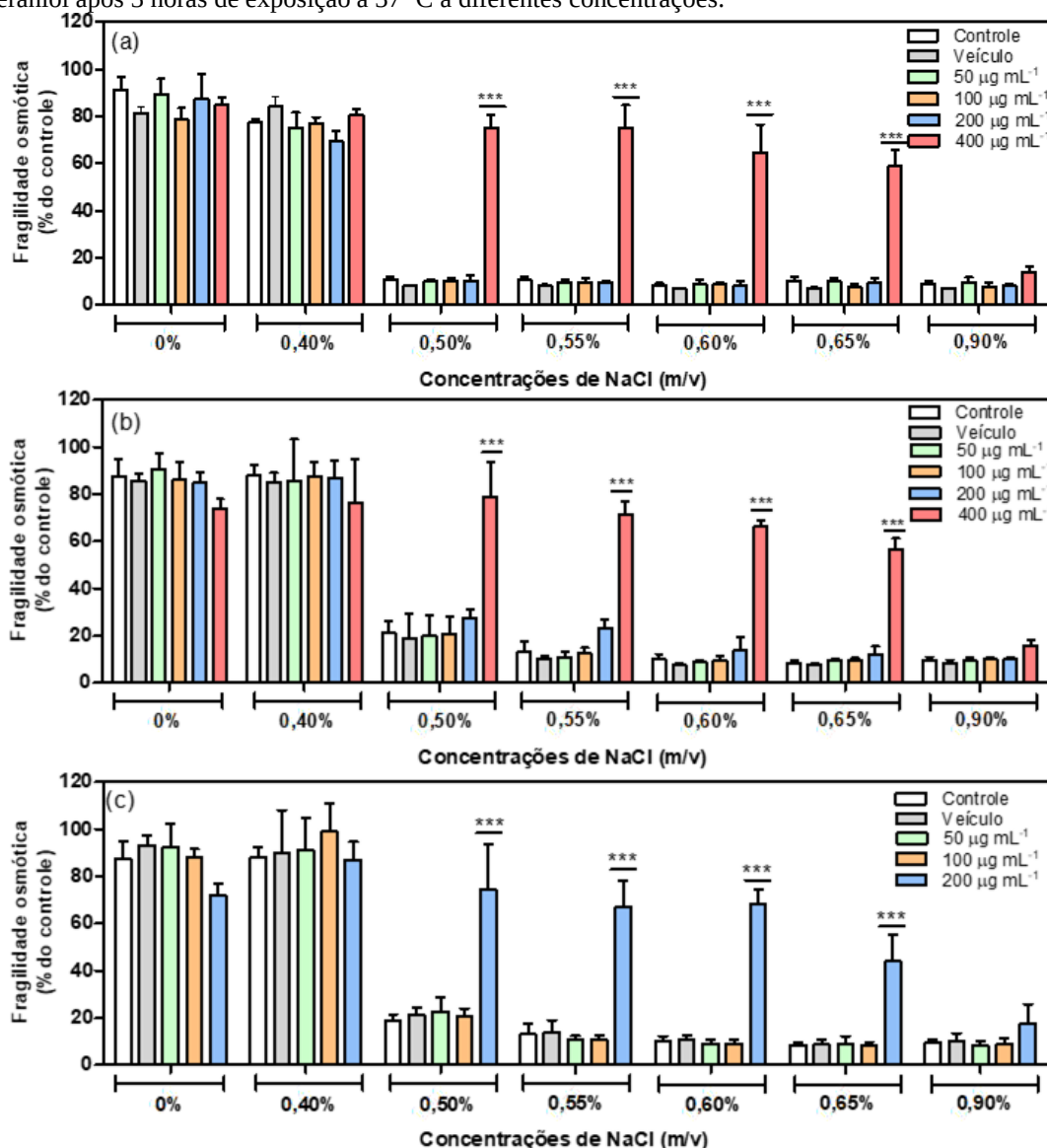
Figura 1.23 – Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com as frações de *Cymbopogon citratus*. a) CHCl_3 F4; b) AcOEt pH 8 F4 e c) AcOEt pH 4 F4 após 3 horas de exposição a 37 °C.



Fonte: A autora.

A partir do gráfico apresentado na Figura 1.24a, foi possível observar que após 3 horas de exposição dos eritrócitos às concentrações mais baixas de óleo essencial (50 – 200 µg mL⁻¹), não houve a indução da fragilidade osmótica. Um baixo valor na fragilidade osmótica se deve aos baixos danos ocasionados na integridade das membranas. No entanto, na concentração mais alta empregada (400 µg mL⁻¹) foi possível verificar que houve a liberação da hemoglobina para as soluções de NaCl nas concentrações de 0 – 0,65% (m/v). O aumento da hemólise na curva da fragilidade osmótica (Figura 1.24) pode estar relacionada à interação do óleo essencial na regulação e difusão através da membrana dos eritrócitos. Desta forma, na concentração de 400 µg mL⁻¹ as substâncias passaram pela membrana e alteraram a homeostase celular [151].

Figura 1.24 – Fragilidade osmótica dos eritrócitos tratados com a) óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; b) citral e c) geraniol após 3 horas de exposição a 37 °C a diferentes concentrações.



Fonte: A autora.

Alguns estudos observaram alterações morfológicas quando avaliaram o efeito da exposição dos eritrócitos a óleos essenciais de plantas medicinais [152]. No trabalho conduzido por Barros e colaboradores [152] foi demonstrado que os óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Cinnamomum zeylanicum* interagiram com as substâncias das membranas, o que alterou as estruturas das células e comprometeu a difusão celular. Além disso, os óleos essenciais também podem levar a uma perda dos fosfolípidios, os quais formam a estrutura básica da bicamada lipídica, o que resulta em uma dissolução da membrana [152].

Foi observado também que após a exposição dos eritrócitos ao citral e geraniol nas concentrações mais baixas, não há um aumento na fragilidade osmótica (Figura 1.24b e 1.24c). Estes resultados sugeriram que estes compostos nestas concentrações causaram poucos danos

nas membranas celulares dos eritrócitos. Por outro lado, nas concentrações mais altas de citral ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e geraniol ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi observado um aumento pronunciado na fragilidade osmótica ($p < 0,05$). Sugere-se que a reatividade química do citral leva à sua capacidade de iniciar a hemólise em eritrócitos, um efeito que foi atribuído ao aumento da produção de radicais livres associada à uma redução nos níveis de glutathione (GSH) [153].

1.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)

Sabe-se que a estrutura e a função das membranas dos eritrócitos podem ser alteradas por sua interação com espécies exógenas, as quais podem estar associadas à hemólise [151,154]. Como mencionado anteriormente, os extratos e compostos isolados de plantas medicinais podem interagir com os componentes da bicamada lipídica presente na membrana dos eritrócitos, como por exemplo os fosfolipídios [101]. Desta forma, análises de MEV-FEG foram realizadas a fim de se observar se os extratos, frações e o óleo essencial de *C. citratus*, assim como o citral e o geraniol, poderiam promover alterações na morfologia dos eritrócitos humanos nas concentrações mais altas utilizadas no teste da fragilidade osmótica.

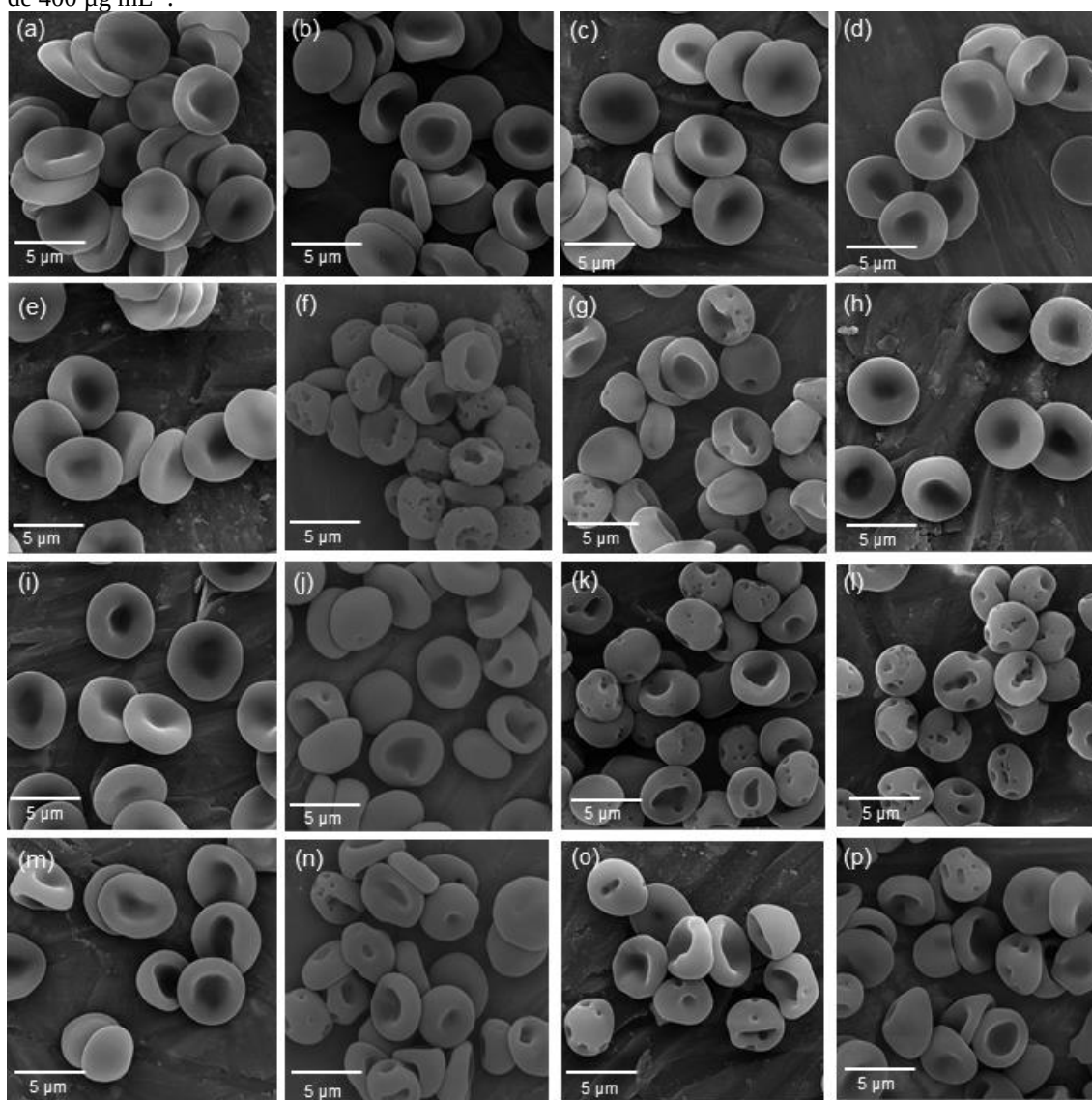
A Figura 1.25a apresenta a forma bicôncava padrão exibida pelos eritrócitos não tratados e para o controle, que foi incubado com etanol (veículo) (Figura 1.25b). Além disso, observou-se que os extratos, INF, EtOH e HEtOH na concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ não alteraram a morfologia padrão dos eritrócitos após a sua exposição durante 3 horas a 37°C (Figura 1.25).

Entretanto, as imagens obtidas pelas análises de MEV-FEG revelaram alterações morfológicas na estrutura bicôncava dos eritrócitos após a sua exposição durante 3 horas às frações de *C. citratus*. Foi observado que as frações em clorofórmio e acetato de etila induziram a formação de estomatócitos (caracterizados por protrusões arredondadas convexas ou espículas). Em nosso estudo anterior [1] foi verificado que a fração CHCl_3 F1 era constituída por monoterpenos, como o citral e o geraniol, que são compostos apolares, que podem interagir com os componentes da membrana plasmática. Desta forma, a presença destes compostos pode contribuir para as alterações na morfologia eritrocitária após os tratamentos com as frações clorofórmica (Figura 1.25). Entretanto, essas frações não induziram a hemólise no teste da fragilidade osmótica.

As frações acetato de etila de *C. citratus* são constituídas por polifenóis (flavonoides e ácidos fenólicos), como a quercetina, apigenina, catequina, luteolina e pelos ácidos clorogênico, gálico e cafeico [1]. Os flavonoides são compostos lipofílicos, que podem induzir

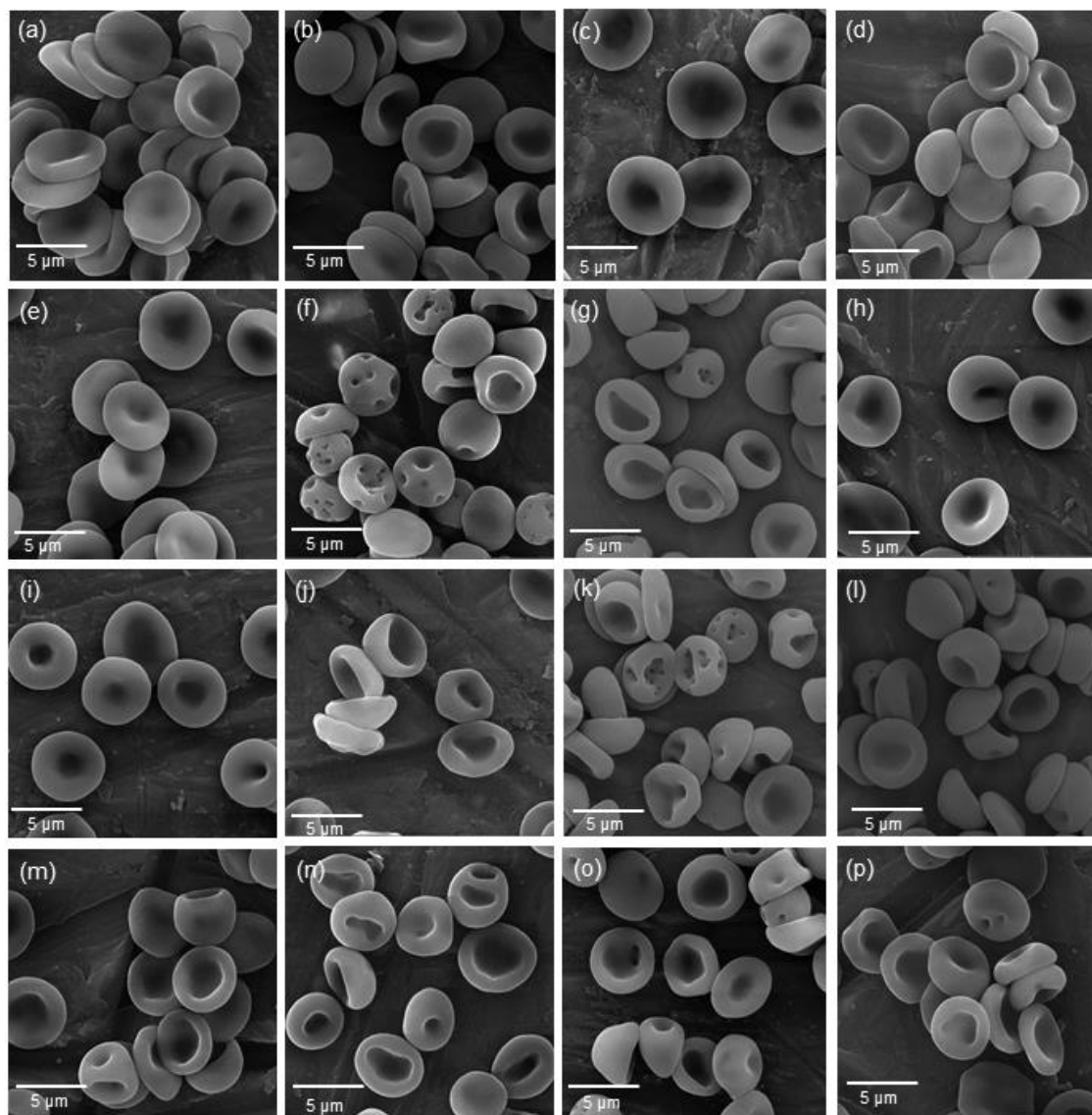
a alterações na morfologia dos eritrócitos, ao interagir com proteínas da membrana celular e, consequentemente, na formação de equinócitos. Além disso, as frações em acetato de etila obtidas em pH 8 apresentaram os maiores teores de flavonoides, quando comparadas com aquela obtidas em pH 4 [1], o que pode justificar as pronunciadas alterações na morfologia dos eritrócitos após a exposição a estas frações (Figura 1.25). Entretanto, foi possível verificar que quando os eritrócitos foram expostos às frações na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, não houve alterações na estrutura normal bicôncava, exceto para as frações clorofórmicas, CHCl_3 F1 e CHCl_3 F3.

Figura 1.25 – Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) dos eritrócitos humanos previamente tratados a 37°C durante 3 horas com (a) PBS; (b) etanol; (c) INF; (d) EtOH; (e) HEtOH; (f) CHCl_3 F1; (g) AcOEt F1; (h) AQL F1; (i) AcOEt pH 8 F2; (j) AcOEt pH 4 F2; (k) CHCl_3 F3; (l) AcOEt pH 8 F3; (m) AcOEt pH 4 F3; (n) CHCl_3 F4; (o) AcOEt pH 8 F4 e (p) AcOEt pH 4 F4 de *Cymbopogon citratus* na concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Figura 1.26 – Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) dos eritrócitos humanos previamente tratados a 37 °C durante 3 horas com (a) PBS; (b) etanol; (c) INF; (d) EtOH; (e) HEtOH; (f) CHCl₃ F1; (g) AcOEt F1; (h) AQL F1; (i) AcOEt pH 8 F2; (j) AcOEt pH 4 F2; (k) CHCl₃ F3; (l) AcOEt pH 8 F3; (m) AcOEt pH 4 F3; (n) CHCl₃ F4; (o) AcOEt pH 8 F4 e (p) AcOEt pH 4 F4 de *Cymbopogon citratus* na concentração de 200 µg mL⁻¹.

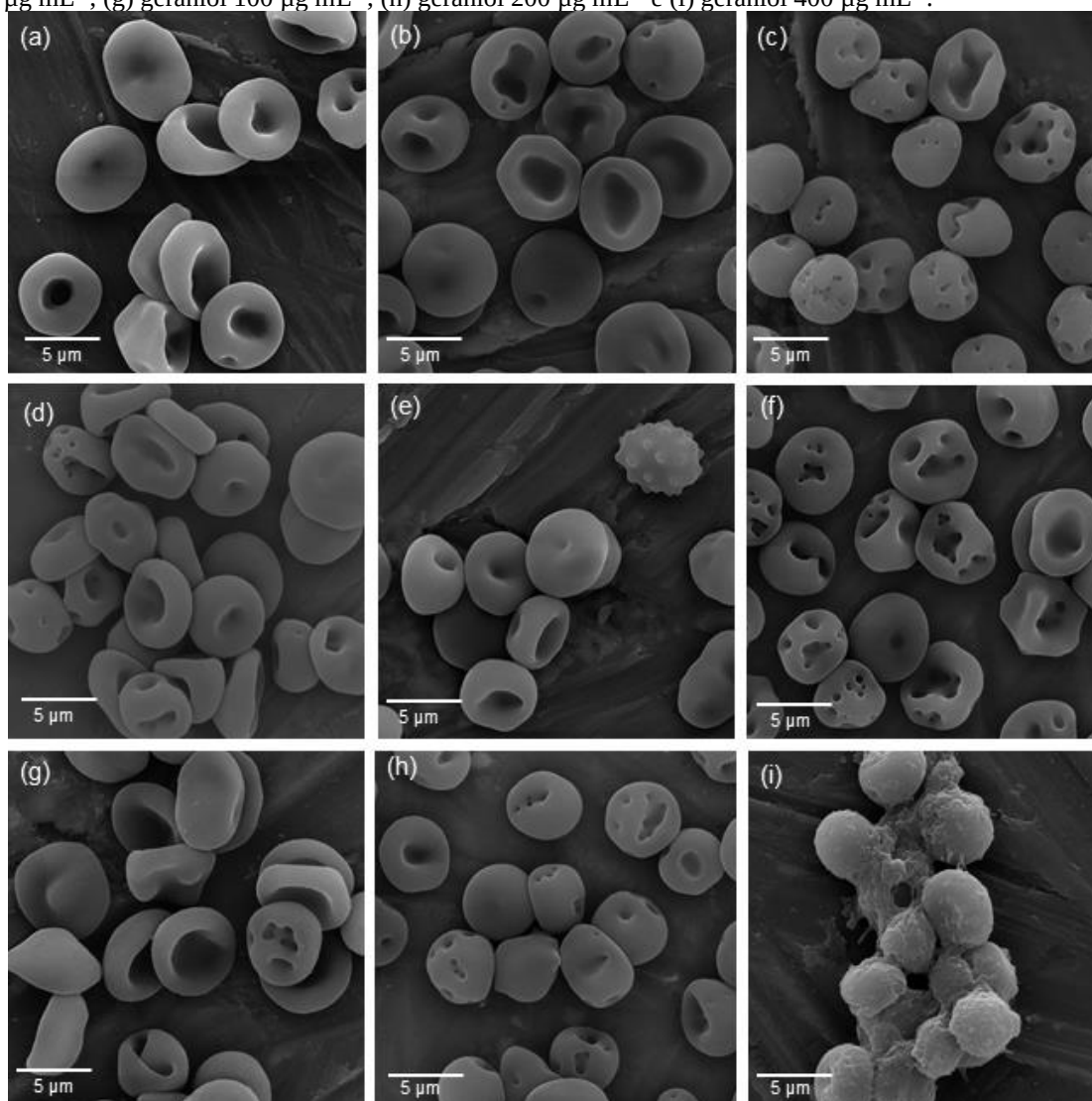


Fonte: A autora.

Após a exposição dos eritrócitos ao óleo essencial de *C. citratus* (Figura 1.27), foi observado orifício de ruptura, que resultou na formação de esferostomatócitos com múltiplos vacúolos intracelulares. Os óleos essenciais de plantas medicinais podem alterar a morfologia dos eritrócitos, devido à presença de uma mistura de compostos apolares em sua composição química. Além disso, o óleo essencial deste estudo é predominantemente constituído por citral e geraniol, os quais também ocasionaram alterações na morfologia dos eritrócitos (Figura 1.27). Portanto, o sinergismo entre estes compostos e outros terpenos presentes no óleo essencial de *C. citratus* pode ser o responsável pelos efeitos observados neste estudo.

Quando os eritrócitos foram expostos ao citral, foi visualizada a conversão em equinócito (forma esferoidal com espículas curtas e estreitas de tamanho semelhante e uniformemente espaçadas) (Figura 1.27). Segal e Milo-Golzweig [155] sugeriram que a hemólise causada pelo citral em eritrócitos está relacionada tanto à peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, quanto à depleção da glutathiona (GSH). Além disso, o geraniol ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) causou a lise e alterou a morfologia dos eritrócitos na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1.27). Estudos reportaram que a presença de grupo hidroxila (OH) nos terpenos promove os maiores efeitos hemolíticos e citotóxicos, quando comparados com os compostos que possuem apenas um grupo carbonila (C=O) [156]. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo concordam com os obtidos por Mendanha e colaboradores [156], que demonstraram que os álcoois terpienol e mentol foram altamente hemolíticos quando comparados às cetonas mentona e pulegona.

Figura 1.27 – Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) dos eritrócitos humanos previamente tratados a 37 °C durante 3 horas com (a) óleo essencial 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (b) óleo essencial 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (c) óleo essencial 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *Cymbopogon citratus* (d) citral 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (e) citral 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (f) citral 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (g) geraniol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (h) geraniol 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (i) geraniol 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: A autora.

Na hipótese apresentada por Alhanaty e Sheetz [151] foi sugerido que as mudanças na forma dos eritrócitos são devidas à expansão diferencial das duas monocamadas da membrana dos glóbulos vermelhos causada por moléculas exógenas. Desta forma, os estomatócitos são formados quando as moléculas se difundem na monocamada interna, enquanto os equinócitos espiculados são formados quando as moléculas interagem com a camada externa. Assim, como as amostras de *C. citratus* induziram a formação de equinócitos, pode-se sugerir que os compostos foram inseridos na membrana externa do eritrócito.

Foi proposto que antioxidantes de amostras de plantas podem atuar como pró-oxidantes. Esse comportamento dependerá de suas concentrações e da identidade de cada composto da amostra [104]. Os efeitos antioxidantes apresentados pelas frações de acetato de

etila [1] foram observados em menor concentração quando comparados aos utilizados nos ensaios de citotoxicidade neste estudo. Desta forma, os resultados obtidos sugeriram que os extratos, frações e o óleo essencial de *C. citratus* podem ser empregados em aplicações farmacêuticas e industriais em baixas concentrações, sem efeitos citotóxicos em células humanas.

1.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste trabalho, foi demonstrado que os extratos de *C. citratus* não foram considerados tóxicos no ensaio de letalidade frente à *A. salina*. Entretanto, algumas frações em acetato de etila obtidas em condições ácida e básica, e clorofórmicas obtidas por meio de diferentes métodos de extração, foram tóxicas devido aos baixos valores de DL₅₀. Além disso, o óleo essencial, assim como os seus principais constituintes químicos, citral e geraniol foram potencialmente tóxicos neste modelo *in vivo*.

De maneira geral, os extratos e as frações de *C. citratus* não reduziram a viabilidade celular de leucócitos humanos. No entanto, a prévia remoção do óleo essencial das folhas secas da planta potencializou a extração de compostos bioativos nas frações acetato de etila em condições ácida e básica, com consequente efeito toxicológico para estas células nas maiores concentrações utilizadas neste estudo. Além disso, o citral e o geraniol também foram citotóxicos para os leucócitos, o que sugere que estes compostos contribuíram no efeito apresentado pelo óleo essencial.

Foi demonstrado que algumas frações acetato de etila e clorofórmicas, assim como o óleo essencial de *C. citratus*, citral e geraniol na maior concentração avaliada aumentaram a fragilidade osmótica nos eritrócitos. Isto se deve à presença de compostos lipofílicos que podem interagir com os componentes das membranas celulares. Além disso, análises de MEV-FEG permitiram observar as alterações causadas pelas amostras estudadas na morfologia eritrocitária.

Como conclusão deste capítulo, mais estudos são necessários no tocante ao efeito toxicológico *in vivo* e propriedades biológicas destas frações, além da identificação dos compostos bioativos responsáveis pelo efeito observado pelas frações neste estudo.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO E ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS COMPOSTOS CITRAL E GERANIOL DE *Cymbopogon citratus* EM PEIXE-ZEBRA

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Distúrbios de ansiedade

Os distúrbios de ansiedade fazem parte das doenças psiquiátricas mais frequentes em humanos e podem ser o resultado da exposição ao estresse crônico [157]. Estes distúrbios se referem a um grupo de transtornos mentais caracterizados por sentimentos de ansiedade e medo, o que inclui o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de pânico, fobias, transtorno de ansiedade social, transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Assim como no caso da depressão, os sintomas podem variar de leves a graves e o tempo da ocorrência do transtorno é variável [158]. Contudo, estes distúrbios compartilham características comportamentais e fisiológicas comuns [159]. Em sua forma patológica, a ansiedade é um estado mal-adaptativo que prejudica a capacidade de um organismo em responder de maneira otimizada o seu ambiente [160]. Alguns sintomas da ansiedade são semelhantes aos da depressão, e a ansiedade pode dar origem à depressão. No entanto, os distúrbios de ansiedade são raramente autodiagnosticados, enquanto a depressão é frequentemente reconhecida pelos pacientes. Aproximadamente 50% dos pacientes reconheceram a depressão, enquanto que apenas 20% reconheceram a ansiedade [161].

De maneira geral, a principal característica dos transtornos de ansiedade é o medo excessivo, que pode incluir ataques de pânico. Na maioria dos casos, os transtornos de ansiedade se iniciam durante a infância, adolescência ou no início da idade adulta e são mais comum em mulheres [157]. Além disso, estudos relataram que o desenvolvimento dos distúrbios de ansiedade pode também depender de uma predisposição genética [159].

Os pacientes com transtorno de ansiedade generalizada relatam alguns sintomas físicos como a sudorese, taquicardia, tremores, opressão no tórax ou epigastro, tensão muscular, enxaqueca, doença gastrointestinal, condições alérgicas e respiratórias, dentre outras doenças crônicas [162]. Além disso, a ansiedade tem um considerável impacto econômico na sociedade, devido a um maior uso nos serviços de saúde e uma diminuição da produtividade no trabalho [161].

Alterações na transmissão neuronal dos sistemas gabaérgico, serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgicos são considerados importantes na fisiopatologia da ansiedade e depressão [159]. Várias regiões cerebrais estão envolvidas nestes transtornos, dentre as quais podem ser destacadas a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal, e o tratamento pode variar de acordo com o tipo de transtorno de ansiedade [163].

Os ansiolíticos são os fármacos empregados para o tratamento dos distúrbios de ansiedade em humanos. Os benzodiazepínicos, como o clonazepam, diazepam, lorazepam, e o bromazepam são as drogas mais utilizadas no tratamento da ansiedade [164]. Os benzodiazepínicos ligam-se ao receptor benzodiazepínico num local de ligação alostérico que fica situado entre as subunidades α e γ do receptor GABA_A, e modulam a condutância do íon Cl⁻ pelo canal central de cloro. Desta forma, aumentam o fluxo do Cl⁻ induzido pelo GABA e aumentam a função do GABA_A no cérebro [165].

Entretanto, o uso exacerbado de benzodiazepínicos nos tratamentos dos distúrbios de ansiedade assim como para outras doenças, induz ao desenvolvimento de tolerância, a qual se manifesta na forma de uma redução na eficácia destas drogas [165]. Estudos sugerem que a tolerância resulta da expressão diminuída dos receptores GABA_A nas sinapses. Uma interrupção abrupta do tratamento com os benzodiazepínicos após a sua administração crônica pode ocasionar abstinência, caracterizada por confusão, ansiedade, agitação e insônia [166]. Por exemplo, os efeitos colaterais do clonazepam estão relacionados à dose administrada no tratamento, e incluem a sonolência, letargia, ataxia e tontura. A sobredosagem deste fármaco pode levar ao desenvolvimento de confusão, redução dos reflexos ou coma [164].

2.1.2 Epilepsia

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns no mundo e, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas de todas as idades [167]. O risco de morte prematura é três vezes maior em pessoas com este distúrbio quando comparado com a população em geral, além de afetar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes [168]. Aproximadamente 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de renda baixa e média, e grande parte não tem acesso aos tratamentos [167]. Contudo, não existe uma causa específica para a epilepsia, porém, lesões no momento do nascimento, lesões cerebrais traumáticas, infecções cerebrais, como a meningite ou encefalite, parecem estar envolvidos no desenvolvimento desta doença [168,169].

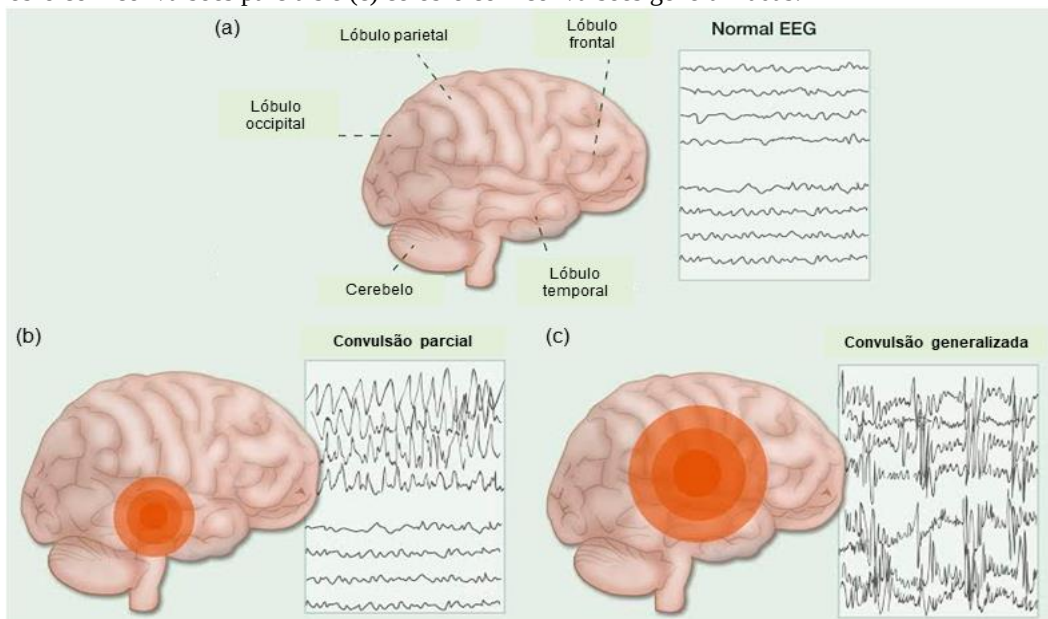
De acordo com a classificação da *International League Against Epilepsy* (ILAE) (2017), há alguns grupos etiológicos para a epilepsia: genética, estrutural, infecciosa, metabólica e desconhecida [169]. A genética se refere a epilepsia resultante de uma mutação genética definida ou presumida; a estrutural se refere a anormalidades visíveis em estudos de neuroimagem; a infecciosa se refere a um processo infeccioso que resulta em epilepsia; a metabólica quando a epilepsia é resultado direto de um distúrbio metabólico conhecido, o qual se refere a manifestações ou alterações bioquímicas, como erros inatos do metabolismo [170].

A epilepsia é caracterizada por convulsões espontâneas recorrentes não provocadas, que envolve neurônios hiperexcitáveis, e está associada a disfunções cerebrais, que ocasionam diversas comorbidades comportamentais [171]. Ainda, pode ser definida como um conjunto de diferentes tipos de convulsões, originadas por vários mecanismos, que têm em comum a descarga repentina, excessiva e sincronizada dos neurônios cerebrais [172]. Portanto, durante um episódio epilético há um desequilíbrio entre a neurotransmissão inibitória mediada por GABA, e a neurotransmissão mediada por glutamato excitatória [170]. Desta forma, esta atividade elétrica anormal pode ocasionar uma variedade de eventos, que incluem a perda da consciência, movimentos anormais, comportamento atípico ou desigual, ou percepção distorcida [172].

O fenótipo de cada crise epilética é determinado pelo ponto de origem da hiperexcitabilidade e do seu grau de disseminação no cérebro [171], ou seja, o local de origem dos disparos neuronais anormais é responsável pelos sintomas que serão produzidos nos pacientes [170]. Por exemplo, se o córtex motor estiver envolvido, o paciente poderá sofrer de movimentos anormais ou convulsão generalizada. Entretanto, as crises ocasionadas nos lobos parietal ou occipital podem incluir alucinações visuais, auditivas e olfatórias [172].

As crises epiléticas podem ser focais (início em uma região restrita do encéfalo) ou generalizada (as descargas se originam concomitantemente nos dois hemisférios) (Figura 2.1) [168]. As crises focais podem ser simples, em que a consciência é preservada durante a crise epilética, ou complexa generalizada, quando há a perda da consciência. [172].

Figura 2.1 – Representação das crises epiléticas. Eletroencefalograma (EEG) de um (a) cérebro sem convulsões; (b) cérebro com convulsões parciais e (c) cérebro com convulsões generalizadas.



Fonte: Adaptado de [173].

A classificação adequada das crises é de extrema importância para o tratamento correto da epilepsia, pois a eficácia dos medicamentos anticonvulsivantes depende do tipo de crise de cada paciente [170,172,174]. Dentre os fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento desta doença pode-se destacar, o fenobarbital, a fenitoína, a carbamazepina, o valproato e os benzodiazepínicos [170].

Os benzodiazepínicos se ligam aos receptores GABA inibitórios para reduzir a taxa de disparos durante as crises epiléticas agudas. São utilizados com maior frequência nas crises mioclônicas, nas crises parciais e tônico-clônicas generalizadas [175]. Os fármacos que reduzem as crises epiléticas atuam por diferentes mecanismos de ação, como no bloqueio dos canais voltagem-dependentes (Na^+ ou Ca^{2+}), potenciação dos impulsos inibitórios gabaérgicos, ou na interferência da transmissão excitatória do glutamato [176]. Entretanto, a maioria dos anticonvulsivantes possui múltiplos alvos no SNC e apresentam mais de um mecanismo de ação [177].

Estudos indicaram que aproximadamente 30% dos pacientes com epilepsia não respondem adequadamente às drogas antiepiléticas [178]. Contudo, este problema pode ser superado a partir da combinação de drogas antiepiléticas, principalmente aquelas que exibem sinergismo em modelos experimentais de epilepsia. Desta forma, esta falha terapêutica estimulou pesquisas intensivas sobre novos medicamentos antiepiléticos. Os fitoterápicos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes e ansiolíticos para pacientes farmacorresistentes [162,178–180].

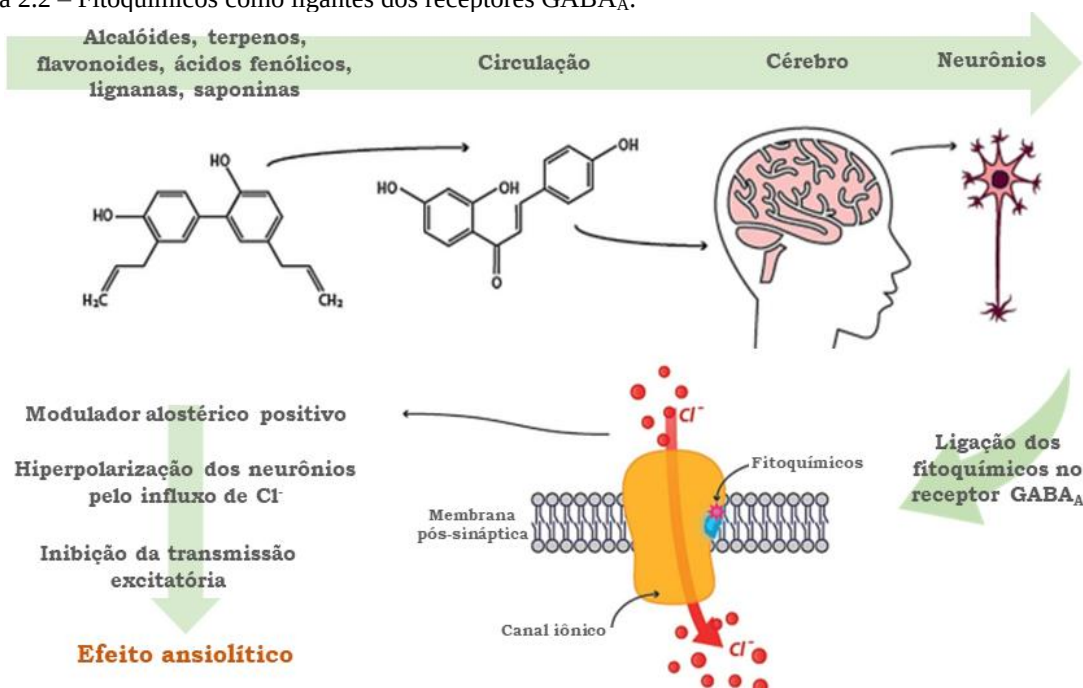
2.1.3 Produtos naturais com propriedades ansiolítica e anticonvulsivante

Na maioria dos casos, as drogas empregadas para os tratamentos dos transtornos de ansiedade e epilépticos podem ocasionar efeitos adversos, o que justifica a busca por fontes naturais de substâncias que sejam eficientes para estes tratamentos, de baixo efeito colateral [161,181]. Por exemplo, os benzodiazepínicos como o diazepam e o clonazepam podem causar amnésia, sedação, dependência, e interação com agentes depressores do SNC [182]. A longo prazo, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) podem levar ao choque cardiovascular que pode ser fatal, além de causar insônia, amnésia e agitação [183].

As plantas medicinais possuem diferentes classes de compostos bioativos que são responsáveis por suas atividades farmacológicas e, desta forma, são consideradas de grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos [184,185]. Estudos clínicos e pré-clínicos comprovaram que os alcalóides, terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, cinamatos e as saponinas possuem efeito ansiolítico e anticonvulsivante [178,180].

Na Figura 2.2 é ilustrado que diferentes classes de fitoquímicos são capazes de inibir a transmissão excitatória e reduzir a ansiedade devido à ligação no receptor $GABA_A$ [185,186]. Estes compostos causam uma hiperpolarização da membrana por permitir o influxo de ânions Cl^- , seguido por uma inibição na transmissão excitatória e, conseqüentemente, uma redução da ansiedade [161,180].

Figura 2.2 – Fitoquímicos como ligantes dos receptores $GABA_A$.



Fonte: Adaptado de [161].

Uma variedade de extratos e óleos essenciais provenientes das plantas medicinais possuem propriedades ansiolítica e anticonvulsivante [80,86,187–189]. Na literatura, é demonstrado que a *C. citratus* e seus constituintes químicos exerceram estes efeitos em diferentes modelos. Por exemplo, Costa e colaboradores [79] demonstraram que o óleo essencial apresentou atividade ansiolítica em ratos no teste de labirinto em cruz elevado. Além disso, quando os animais foram previamente tratados com o flumazenil, houve uma reversão da ansiólise causada pelo óleo essencial, o que sugeriu o envolvimento dos receptores GABA_A neste efeito. Estes dados corroboraram os reportados por Blanco e colaboradores [190], que também observaram que o óleo essencial potencializou o efeito ansiolítico do clonazepam quando os ratos foram tratados com uma mistura destes compostos. Em outro estudo, Goes e colaboradores [191] demonstraram a eficácia do óleo essencial da *C. citratus* como ansiolítico em aromaterapia. Recentemente, foi reportado que o extrato aquoso das folhas de *C. citratus* atenuou a ansiedade, de sintomas semelhantes à depressão, e o déficit de memória induzido por estresse de derrota social em camundongos [61].

No estudo conduzido por Silva e colaboradores [192], o óleo essencial de *C. citratus* exibiu atividade anticonvulsivante em três modelos de convulsão (PTZ, pilocarpina e estricnina), devido a um aumento no tempo de latência para a primeira convulsão em ratos que receberam o óleo. Além disso, este efeito foi bloqueado pelo tratamento com flumazenil, o que sugeriu o envolvimento dos receptores GABA_A no mecanismo de ação do efeito anticonvulsivante.

Além dos extratos de *C. citratus*, também é comprovado que os seus constituintes químicos, como os terpenos e compostos fenólicos, apresentam efeitos ansiolítico e anticonvulsivante [193]. Por exemplo, o citrônella aumentou o tempo de latência, inibiu a convulsão e mortalidade de camundongos na convulsão induzida por PTZ e picrotoxina [194]. O efeito anticonvulsivante deste monoterpene está relacionado à sua ação como agonista do receptor GABA_A, além de modular os receptores glutamatérgicos e bloquear o canal de Na⁺ dependente de voltagem [195]. Além disso, foi reportado que este composto atenuou a inflamação e o estresse oxidativo em camundongos [195]. O limoneno exibiu efeito ansiolítico no teste labirinto em cruz elevado, e os receptores GABA_A estão envolvidos no mecanismo de ação deste terpeno [196].

O citrônella aumentou o tempo de latência para a primeira convulsão, e reduziu a taxa de convulsão e mortalidade em camundongos, induzida por PTZ e eletrochoque máximo (EMC). Este efeito está relacionado a uma atenuação na excitabilidade neuronal e, consequentemente, na convulsão [197]. Quintans-Júnior e colaboradores [86] demonstraram

que o citral aumentou o tempo de latência para a primeira convulsão induzida por PTZ em ratos. Além disso, este terpeno também foi eficiente na prevenção de convulsões tônicas induzidas por EMC neste mesmo modelo animal. O geraniol reduziu a convulsão e a mortalidade em camundongos quando administrado por via intraperitoneal [198]. Este efeito pode ser explicado devido à capacidade deste terpeno em bloquear o receptor 5-HT [199]. Foi reportado também que a complexação do geraniol com a beta-ciclodextrina aprimorou o efeito anticonvulsivante do geraniol [198].

Estudos da literatura também reportaram que os flavonoides possuem atividade ansiolítica e anticonvulsivante [200]. Por exemplo, a apigenina se liga competitivamente ao sítio de ligação dos benzodiazepínicos do receptor GABA_A e apresentou atividade ansiolítica em camundongos quando administrada por via intraperitoneal [201]. A luteolina também apresentou efeito ansiolítico e antidepressivo neste mesmo modelo animal e está envolvido na modulação da sinalização do receptor GABA_A [202].

A naringenina juntamente com a fenitoína, um fármaco utilizado para o tratamento dos transtornos epilépticos, ofereceu uma proteção contra convulsões induzida por PTZ. Além disso, aumentou nos níveis de GABA e dopamina, diminuiu os níveis de glutamato e dos biomarcadores oxidativos (MDA), e elevou os níveis de GSH, SOD e CAT no hipocampo de camundongos [203].

Os ácidos fenólicos também demonstraram eficácia como ansiolítico e anticonvulsivante [204]. Por exemplo, o ácido elágico presente nas frutas e plantas medicinais apresentou efeito ansiolítico no teste labirinto em cruz elevado comparável ao efeito observado para o diazepam em ratos, e os receptores GABA_A estão envolvidos neste efeito [205]. Além disso, a ansiólise foi revertida quando os animais foram previamente tratados com picrotoxin (receptor não-competitivo do GABA_A) e pelo flumazenil [205].

O ácido rosmarínico apresentou atividade anticonvulsivante contra as convulsões induzidas por PTZ ou pilocarpina em camundongos. Neste estudo, foi observado um aumento na latência para espasmos mioclônicos e convulsões generalizadas quando os animais foram tratados com estes convulsivantes [206]. Em outro estudo, o ácido rosmarínico reduziu os níveis de radicais livres e danos aos DNA na epilepsia induzida por PTZ em camundongos [207].

2.1.4 Receptor GABA

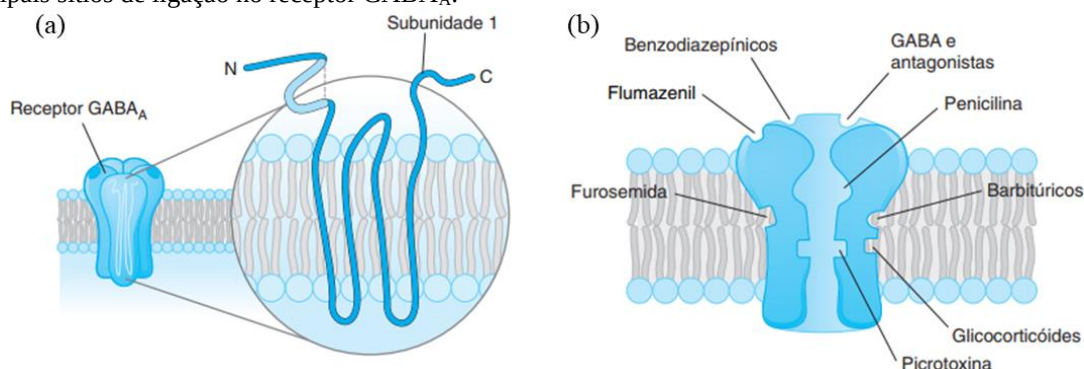
A função do sistema nervoso é governada por meio de um equilíbrio de sinalização excitatória e inibitória [175]. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e atua

por meio dos receptores GABA_A e GABA_B. Os receptores GABA_A estão presentes em 20 – 50% das sinapses no cérebro, e reagem em escala de milissegundos para ligar-se ao GABA, o qual abre um canal transmembrana permeável ao cloreto e suprime a atividade neuronal no cérebro [208]. Contudo, uma disfunção destes canais resulta em alguns distúrbios, como o de ansiedade, epilepsia e autismo [176,209].

Os receptores ionotrópicos GABA_A são membros da superfamília de canais iônicos regulados por neurotransmissores. São proteínas transmembrana pentaméricas, que consistem em cinco subunidades (classificadas como subtipos α , β , γ e δ) dispostas em torno de um poro central, cada uma constituída por quatro domínios que atravessam a membrana (Figura 2.3a) [210]. Existem vários subtipos de receptores GABA_A, cujas funções variam com base na combinação das unidades α , β , γ e δ em um determinado receptor [211]. Na Figura 2.3b estão representados os principais sítios de ligação no receptor GABA_A.

As cinco subunidades dos receptores GABA_A circundam um poro iônico central seletivo para o íon Cl⁻, que se abre na presença do GABA. O GABA e outros agonistas ligam-se a dois sítios, que estão localizados em porções extracelulares do complexo receptor-canal, na interface entre as subunidades α e β . Os receptores GABA_A também contêm vários sítios modulares, em que ocorre ligação de outros ligantes endógenos e/ou fármacos (Figura 2.3b) [212].

Figura 2.3 – Representação esquemática do receptor GABA_A. (a) Estrutura pentamérica do receptor GABA_A. (b) Principais sítios de ligação no receptor GABA_A.



Fonte: Adaptado de [212].

Os efeitos inibitórios do receptor GABA são mediados pelos receptores GABA_A, que são canais de cloro controlados por ligante que são ativados alostericamente por benzodiazepínicos e alguns neuroesteróides. Por exemplo, os benzodiazepínicos atuam como moduladores alostéricos positivos, potencializando a regulação dos canais na presença de GABA. Além disso, os benzodiazepínicos aumentam a frequência de abertura dos canais na

presença do GABA. O consequente influxo aumentado de Cl^- provoca a hiperpolarização da membrana e diminui a excitabilidade neuronal [212].

O mecanismo de ação de produtos naturais nos efeitos ansiolítico e anticonvulsivante não é completamente esclarecido, devido a uma infinidade de efeitos biológicos na ligação e na recaptação das monoaminas [161,180]. Entretanto, é reportado que muitos destes compostos possuem efeitos farmacológicos por apresentarem alta afinidade pelos sítios de ligação do receptor GABA_A , o que já foi comprovado em modelos animais, como os camundongos, ratos e peixes [189,213]

2.1.5 Peixe-zebra

O *Danio rerio* (Figura 2.4), conhecido popularmente como peixe-zebra ou peixe paulistinha, membro da família *Cyprinidae*, é um pequeno peixe teleósteo de água doce, de aproximadamente 3 – 4 cm [214]. Esta espécie é propensa a formar grupos (cardumes) por razões sociais, como por exemplo na busca por alimentos, proteção contra predadores e acasalamento [215]. Além disso, exibe vários comportamentos distintos, o que permite o desenvolvimento de estudos neuroquímicos e comportamentais [216,217]. Devido a este fato, nos últimos anos, o peixe-zebra vem sendo amplamente utilizado como modelo de experimentação animal em pesquisas de doenças, como a epilepsia, autismo, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, esquizofrenia, depressão e os distúrbios de ansiedade [218–222]. Ainda, este peixe tem sido utilizado como modelo para doenças genéticas que afetam os sistemas cardiovascular, nervoso e muscular. Além disso, pode ser empregado nos estudos de câncer e diabetes [223,224].

Figura 2.4 – Peixe-zebra.



Fonte: [225].

O peixe-zebra é sensível às principais classes de fármacos neurotrópicos, que incluem os ansiolíticos, anticonvulsivantes, antidepressivos, alucinógenos, analgésicos e estimulantes cognitivos, e responde de forma semelhante aos seres humanos [216]. Além disso, evidências

sugerem que vários aspectos dos distúrbios cerebrais que podem ser modelados nos roedores podem ser avaliados em peixe [222,226].

O peixe-zebra se tornou atrativo por ser útil como um modelo animal intermediário entre os invertebrados *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* em pesquisas [227]. É importante ressaltar que a utilização de peixes como modelo experimental apresenta algumas vantagens quando comparado a outros animais comumente empregados em pesquisas farmacológicas, triagens genéticas e ensaios de toxicidade [228–230]. Por exemplo, tanto as larvas quanto os peixes adultos são facilmente manipuláveis e podem ser mantidos em espaços reduzidos [229]. Além disso, o custo da aquisição e manutenção são relativamente baixos quando comparados com os equipamentos exigidos para o uso dos animais tradicionais utilizados em pesquisas, como os roedores [218]. A alta fecundidade, o curto tempo de gestação e o rápido desenvolvimento (a eclosão ocorre dois dias após a fertilização) dos embriões também favorecem a utilização destes animais em pesquisas [229].

Ainda, este teleósteo apresenta aproximadamente 70% de homologia genética com os seres humanos e possui uma barreira hematoencefálica com permeabilidade, o que leva a uma alta sensibilidade aos fármacos testados [215]. Além disso, é um modelo amplamente utilizado para pesquisas de drogas provenientes de fontes naturais em larga escala (*screening*) [231]. Isto se deve à facilidade de administração dos compostos nos peixes (imersão), na qual as drogas podem ser absorvidas por meio das brânquias ou da pele, e devido à pequena quantidade de amostra a ser utilizada quando comparada à empregada em ratos [217]. Outra vantagem da utilização deste animal consiste em sua transparência óptica, a qual possibilita a observação direta dos processos celulares e fisiológicos *in vivo* e em tempo real [230].

Sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie, como o glutamatérgico, colinérgico, glicinérgico, nitrérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, adenosinérgico, purinérgico e gabaérgico [223]. No entanto, existem diferenças notáveis entre a morfologia e a neurofisiologia do peixe-zebra com e a dos mamíferos. O circuito tri-sináptico hipocampal localizado nos roedores e utilizado para a aprendizagem espacial está ausente no cérebro do peixe, que é então mediada por outras regiões do cérebro [217]. O peixe-zebra possui visão tetracromática, o que permite o reconhecimento de uma gama de cores mais ampla comparado com os seres humanos e os mamíferos [232].

O peixe-zebra não possui córtex ou hipocampo definidos, porém as estruturas análogas no cérebro parecem ser bioquimicamente e funcionalmente semelhantes às dos mamíferos [217]. O mesencéfalo é uma estrutura relativamente pequena no cérebro, e as principais estruturas derivadas do mesencéfalo são o tectum e o tegmento. O peixe-zebra adulto apresenta

uma maior quantidade de comportamentos que podem ser testados quando comparados às larvas, especialmente aqueles envolvidos em interações sociais [219].

O peixe-zebra é descrito como uma espécie sociável e geralmente é encontrado em cardumes na natureza [233]. Estudos observaram que as larvas do peixe-zebra exibem comportamentos sociais após 10 dias da fertilização. A tendência e preferência naturais do peixe-zebra por estar em cardumes podem sugerir que a habitação em grupos é benéfica para este animal [234]. Estudos da literatura demonstraram que o isolamento do peixe-zebra pode levar a uma maior liberação do hormônio cortisol e, conseqüentemente, um aumento da ansiedade e hipersensibilidade quando comparado com os peixes que permaneceram em grupos [226].

Neste sentido, pelo fato de o peixe-zebra apresentar comportamentos semelhantes aos exibidos por roedores, este se mostrou um modelo animal bastante útil na avaliação de propriedades farmacológicas de compostos provenientes de fontes naturais [235].

2.1.6 Utilização do peixe-zebra na avaliação do efeito ansiolítico e anticonvulsivante de plantas medicinais

Na literatura, é reportada a utilização do peixe-zebra adulto e de suas larvas como modelo animal alternativo na avaliação do efeito ansiolítico de plantas medicinais e de seus constituintes químicos [204, 208–211]. Além disso, este modelo se mostrou promissor na investigação dos mecanismos envolvidos na ação destes compostos [240]. Desta forma, os testes comportamentais empregados na avaliação de efeitos farmacológicos em peixe-zebra são adaptações diretas daqueles amplamente utilizados em roedores [241].

Por exemplo, no estudo conduzido por Del Valle-Mojica e Ortiz [242], foi demonstrado que o extrato aquoso das folhas de *Valeriana officinalis* (Valerianaceae) e o ácido valerênico, aumentaram de forma semelhante ao clonazepam o tempo de permanência no lado claro do aquário no teste claro/escuro em peixe-zebra adulto. Os autores também verificaram que este mesmo extrato e seu constituinte químico interagiram com os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR I e mGluR II) [242].

Benneh e colaboradores [243] investigaram o efeito ansiolítico do extrato da casca do caule de *Maerua angolensis* DC (Capparaceae), obtido a partir de uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila (1:1), em peixe-zebra adulto. Neste estudo, os animais que foram expostos ao extrato exibiram um comportamento semelhante aos que receberam fluoxetina e desipramina, no teste de ansiedade induzida por abstinência de etanol. Além disso, também foi

observado que o efeito ansiogênico causado no teste de estresse crônico imprevisível foi atenuado nestes animais. A ansiólise causada pelo extrato deste estudo foi revertida com o pré-tratamento com flumazenil, granisetrona, ciproheptadina, metisergida e pizotifeno, o que sugeriu o envolvimento dos receptores GABA_A e 5-HT₁₋₃ neste efeito.

Melo e colaboradores [244] verificaram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Aloysia polystachya* (Verbenaceae), utilizada na medicina popular como antidepressivo e para problemas digestivos, exibiu efeito ansiolítico em peixe-zebra. Neste estudo, quando o extrato foi administrado na forma oral e por meio da imersão dos animais na solução, foi observado um aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário no teste claro/escuro. Além disso, este extrato também reverteu a ansiogênese induzida por cafeína, sem alterar a atividade locomotora dos peixes.

Em outro estudo, o extrato obtido a partir da polpa de *Artocarpus altilis* (fruta-pão) exibiu efeito ansiolítico no teste claro/escuro em peixe-zebra [245]. Entretanto, a ansiólise não foi bloqueada pelo tratamento prévio dos animais com o flumazenil. Porém, houve uma reversão do efeito quando os animais foram previamente expostos ao pizotifeno, granisetrom e ciproheptadina, os quais são antagonistas do receptor de serotonina (5-HTR). Portanto, o efeito ansiolítico exibido por este extrato é independente dos receptores GABA_A, e é mediado pelos receptores serotoninérgicos.

Em outro estudo, foi demonstrado que diferentes concentrações do extrato aquoso de *Sceletium tortuosum* (Aizoaceae) apresentaram efeito ansiolítico em larvas de peixe-zebra, devido a um aumento no percentual de tempo gasto pelas larvas na arena central do poço no teste de timotaxia reversa [246]. Recentemente, foi comprovado que o extrato metanólico das frutas *Seseli devenyese* (Apiaceae) apresentou efeito ansiolítico em larvas de peixe-zebra. Os autores atribuíram este efeito à presença das cumarinas, as quais exibiram atividade ansiolítica neste mesmo modelo animal [247].

Na literatura também é reportada a ampla utilização do peixe-zebra na avaliação do efeito anticonvulsivante de plantas medicinais e compostos relacionados, assim como dos mecanismos envolvidos na ação destes compostos [231,246]. Por exemplo, os extratos aquoso e etanólico de *Valeriana officinalis*, e o ácido valerênico apresentaram efeito anticonvulsivante quando administrados por imersão, em peixe-zebra adulto em um modelo de convulsão induzida por PTZ [237]. Além disso, foi reportado que estes extratos aumentaram significativamente o efeito anticonvulsivante do clonazepam e fenitoína, o que sugeriu a sua utilização na terapia dos pacientes com epilepsia [237].

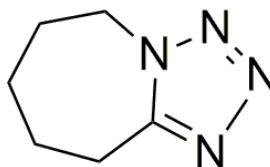
No estudo conduzido por Brillatz e colaboradores [248] foi avaliada a atividade anticonvulsivante dos extratos obtidos a partir dos rizomas de *Cyperus articulatus*, popularmente utilizada como decocção em Camarões no tratamento da epilepsia. Neste estudo, a convulsão foi induzida por PTZ em larvas de peixe-zebra, e o extrato hexânico exibiu o maior efeito quando comparado aos extratos metanólico e aquoso, com uma redução de 93% das convulsões induzidas por PTZ. Os autores o atribuíram à presença de sesquiterpenóides, os quais possuem efeito antiepilético em diferentes modelos animais [197,249].

Li e colaboradores [250] avaliaram o efeito anticonvulsivante dos extratos etanólico e acetônico de *Magnolia officinalis*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento da epilepsia. Estes extratos demonstraram atividade anticonvulsivante eficaz na convulsão induzida por PTZ e por etilcetopentenoato em peixe-zebra adulto. Os dois principais constituintes químicos da planta, o magnolol e o honokiol, também apresentaram efeito considerável nestes mesmos modelos. Os resultados dos testes com o peixe-zebra foram confirmados com os obtidos em camundongos.

2.1.7 Pentilenotetrazol como modelo indutor da epilepsia

O pentilenotetrazol (PTZ) (Figura 2.5) é um dos agentes convulsivos mais utilizados para a descoberta e desenvolvimento de drogas antiepiléticas, capaz de gerar crises agudas e crônicas [251,252]. O PTZ desenvolve efeitos convulsivos após a administração repetida ou em uma única dose, além de afetar os sistemas neurotransmissores, como o gabaérgico, adenosinérgico e o glutamatérgico em ratos, camundongos e peixe-zebra [253].

Figura 2.5 – Estrutura química do pentilenotetrazol (PTZ).



Fonte: A autora.

O mecanismo pelo qual o PTZ induz atividade convulsiva ainda não é bem definido, porém alguns estudos sugerem que ocorra principalmente pela interferência deste composto na neurotransmissão gabaérgica [254]. No receptor GABA_A, esta interação resulta no influxo de íons Cl⁻, o que contribui para a hiperpolarização neuronal rápida. O PTZ se liga ao domínio transmembrana que reveste o ionóforo, que aumenta o estado fechado do canal e,

consequentemente, acarreta em uma excitação neuronal e efeito convulsivante [252]. Contudo, seus efeitos a longo prazo (administração repetitiva), incluem a regulação da expressão e/ou afinidade do receptor GABA e glutamato, que gera um desequilíbrio entre a excitação e a inibição no cérebro e então desencadeia a epileptogênese. O PTZ também induz o estresse oxidativo e aumenta o conteúdo de MDA cortical que afeta o hipocampo, o que resulta em convulsões [214,255].

Modelos de convulsão induzida por PTZ tanto em larvas quanto em peixe-zebra adulto têm sido empregados na triagem e na identificação de pequenas moléculas e compostos naturais com potencial atividade anticonvulsivante [256]. Na literatura é demonstrada uma boa correlação entre os resultados obtidos em estudos que utilizam roedores e os observados em peixe-zebra, na avaliação da atividade anticonvulsivante de moléculas induzida por PTZ [254].

O peixe-zebra após 7 dias da fertilização exibe alterações comportamentais, eletrofisiológicas e moleculares semelhantes ao modelo de roedores em convulsões induzidas por PTZ [257]. Além disso, no peixe-zebra adulto é possível a caracterização de fenótipos comportamentais semelhantes aos de convulsão complexos, os quais são difíceis de avaliar nas larvas. Ainda, este modelo também permite o estudo das comorbidades relacionadas ao comportamento relacionado à epilepsia, como as dificuldades na aprendizagem, e na investigação de alterações celulares ou moleculares associadas à atividade convulsiva [235].

Comportamento semelhante à convulsão pode ser induzido a partir da imersão do peixe-zebra em uma solução de PTZ, o qual é absorvido pela pele, intestino ou pelas guelras e atinge o cérebro [235,254]. Alguns estudos demonstraram mudanças na atividade locomotora dos animais em intervalo de tempo de segundos a minutos, que são caracterizados por uma sequência de eventos convulsivos [235,258]. Na literatura é sugerido que o mecanismo ação das convulsões induzidas PTZ em peixe-zebra é semelhante ao modelo de roedor, visto que os neurônios gabaérgicos e GABA responsivos surgem em regiões discretas ao longo dos diferentes compartimentos cerebrais nos estágios embrionários iniciais [254,257].

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito ansiolítico e anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, e dos compostos isolados citral e geraniol em peixe-zebra (*Danio rerio*).

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito ansiolítico e anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. citratus* em peixe-zebra;
- Avaliar o efeito ansiolítico e anticonvulsivante dos compostos isolados citral e geraniol e em combinação em peixe-zebra;
- Investigar o envolvimento dos receptores gabaérgicos no efeito ansiolítico e anticonvulsivante das amostras estudadas;
- Avaliar os níveis dos marcadores bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo no efeito anticonvulsivante em cérebros de peixe-zebra.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Equipamentos e Reagentes

O citral (95%), geraniol (98%), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido nitrobenzóico (DTNB), malondialdeído (MDA), pentilenotetrazol (PTZ), glutationa reduzida (GSH), ácido gálico (AG), quercetina (QER) e o reagente de Folin-Ciocalteu, foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi adquirido da Merck®. O flumazenil (Flunexil®) e o clonazepam (Rivotril®) foram adquiridos da Teuto e da Roche, respectivamente.

A solução de TBA foi preparada a partir da dissolução do reagente em água deionizada e o pH foi ajustado para 5 - 6 com HCl concentrado. A solução tampão fosfato foi preparada a partir da dissolução dos sais Na₂HPO₄ 10 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 1,76 mmol L⁻¹ e NaCl 137 mmol L⁻¹ em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,4. O reagente de Folin-Ciocalteu foi preparado a partir da diluição do volume necessário em água deionizada. As soluções de ácido tricloroacético (TCA), sulfanilamida, cloreto de alumínio (AlCl₃), acetato de potássio (CH₃COOK), ácido fosfórico (H₃PO₄), N-(1-naftil) etilenodiamina e nitrito de sódio (NaNO₂) foram preparadas a partir da dissolução da quantidade apropriada em água deionizada. O corante azul de coomassie foi preparado a partir da sua dissolução em H₃PO₄ 85% (v/v) e água deionizada e posteriormente filtrado. A albumina de soro bovino foi dissolvida em água deionizada. A solução de quercetina (QER) foi preparada a partir da dissolução da quantidade apropriada em metanol. A solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi preparada a partir da diluição apropriada em solução tampão fosfato.

As absorbâncias das amostras foram registradas em um espectrofotômetro de placas Biotek µQuant® (Synergy H1 Hybrid Reader) e no espectrofotômetro PerkinElmer Lambda®.

2.3.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

As folhas de *C. citratus* foram coletadas no município de Ponta Grossa-PR (25° 05' 42'' S; 50° 09' 43'' W) no período de Março a Maio de 2017, secas a temperatura ambiente na ausência de luz até peso constante e cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm. Uma amostra de referência da planta está depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob o registro HUPG-21025.

O extrato hidroalcoólico de *C. citratus* foi obtido a partir da maceração das folhas previamente secas em etanol 70% (v/v) com agitações diárias com renovação do solvente a cada 7 dias. Este processo foi repetido por mais duas vezes e, posteriormente, o extrato foi concentrado em rotoevaporador e liofilizado. O óleo essencial das folhas de *C. citratus* previamente secas foi obtido a partir de uma hidrodestilação em Clevenger por 2 horas. O hidrolato obtido foi extraído com éter etílico e o solvente foi removido em rotoevaporador [1].

Para os testes comportamentais, o extrato hidroalcoólico, clonazepam e o flumazenil foram solubilizados em 300 mL de água declorinada. No entanto, o óleo essencial, o citral e o geraniol foram primeiramente solubilizados em 1 mL de Tween®80 0,5% (v/v) e o volume foi completado até 300 mL com água declorinada.

2.3.3 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus*

O conteúdo de compostos fenólicos totais no extrato hidroalcoólico de *C. citratus* foi determinado como descrito por Singleton e colaboradores [259]. Em uma microplaca de 96 cavidades foram adicionados o extrato, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 100 µL de solução aquosa de Na₂CO₃ 7,5% (m/v). A placa foi incubada a 45 °C por 15 minutos em estufa e a leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro de placas a 765 nm. O teor de compostos fenólicos foi calculado a partir de uma curva analítica de ácido gálico e o resultado foi expresso em mg AG g⁻¹.

A determinação do teor de flavonoides totais no extrato hidroalcoólico de *C. citratus* foi determinado como descrito por Kosalec e colaboradores [260]. Em uma microplaca de 96 cavidades foram adicionados o extrato, 4 µL de solução aquosa de CH₃COOK 0,10 mol L⁻¹, 4

μL de solução aquosa de AlCl_3 10% (m/v) e metanol. A leitura da absorbância foi registrada em um espectrofotômetro de placas a 420 nm. O teor de flavonoides foi calculado a partir de uma curva padrão de quercetina e o resultado foi expresso em mg QER g^{-1} .

2.3.4 Manutenção do peixe-zebra

Os peixes foram mantidos de acordo com o Instituto Nacional de Saúde Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (protocolo número 052/2016). Para o estudo foram utilizados peixe-zebra adultos (4 – 6 meses de idade) do tipo selvagem que foram adquiridos comercialmente (Aquarismo.com) na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Os peixes foram mantidos em aquários de vidro (100 L) com água decolorada, mantida sob aeração constante, filtração mecânica e química ($25 - 27^\circ\text{C}$; pH 7 – 8; amônia total $<0,01 \text{ mg L}^{-1}$; nitrito $<0,01 \text{ mg L}^{-1}$), ciclo claro/escuro 14:10 horas fornecido por lâmpadas fluorescentes (12 Watts; luzes acesas às 7:00 horas da manhã). Os animais foram ambientados em laboratório por 15 dias antes da realização dos experimentos. As condições químicas da água foram controladas com kits comerciais (pH, nitrito e amônia) (Alcon Basic, Alcon, Brasil). Além disso, os peixes eram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixe (Alcon).

2.3.5 Avaliação do efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol em peixe-zebra

2.3.5.1 Tratamentos

Para avaliar o efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. citratus*, e dos compostos isolados citral e geraniol, os peixes foram divididos nos seguintes grupos (N=14 animais por grupo): 1) controle negativo - água ou 1 mL de solução de Tween[®]80 0,5% (v/v) dissolvido em 300 mL de água decolorada (veículo); 2) controle positivo – clonazepam $0,75 \text{ mg L}^{-1}$; 3) extrato hidroalcoólico 1, 3 e 10 g L^{-1} , óleo essencial ou os compostos isolados citral e geraniol 1, 5 e 10 mg L^{-1} . Os peixes foram submersos por 10 minutos em 300 mL das respectivas soluções e posteriormente foram realizados os testes de atividade ansiolítica (teste claro/escuro) [261]. Todas as soluções foram preparadas com a água contida no aquário moradia. As concentrações do extrato, óleo essencial e dos padrões citral e geraniol

empregadas na execução deste trabalho foram escolhidas com base em experimentos piloto, que reduziram os níveis de ansiedade e não apresentaram efeitos letal ou sedativo no peixe-zebra durante o experimento.

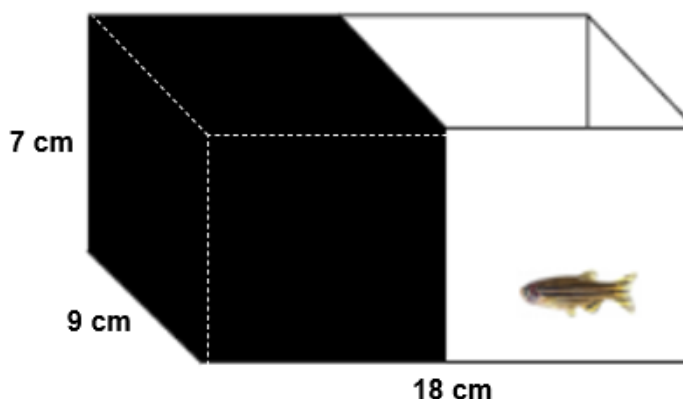
*2.3.5.2 Envolvimento dos receptores GABA_A no efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol*

Para investigar o mecanismo de ação no efeito ansiolítico das amostras de *C. citratus* e do citral e geraniol, os peixes foram previamente tratados com flumazenil. Primeiramente, os animais foram imersos na solução de 1,25 mg L⁻¹ de flumazenil por 20 minutos antes da administração do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* e do citral e geraniol por 10 minutos. As concentrações das amostras estudadas foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos nos testes descritos no item 2.3.5.1. O grupo controle foi exposto à solução de flumazenil por 20 minutos e em seguida na solução de 0,75 mg L⁻¹ de clonazepam. Posteriormente, cada animal foi individualmente analisado quanto à propriedade ansiolítica no teste claro/escuro.

2.3.5.3 Teste claro/escuro

A atividade ansiolítica do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. citratus* e dos padrões citral e geraniol foi avaliada pelo teste claro/escuro de acordo com o método descrito por Gebauer e colaboradores [261]. Para o teste foi utilizado um aquário (18 × 9 × 7 cm) dividido em duas partes iguais, uma parte clara e outra escura (Figura 2.6). Entre as duas partes havia uma comporta corrediça de coloração preta que era levantada do fundo do aquário. Este aquário foi preenchido a uma altura de aproximadamente 3 cm com água do aquário moradia. No momento do teste, o animal a ser avaliado foi colocado na parte clara do aquário e deixado por 300 segundos neste ambiente. Em seguida, a comporta foi aberta (aproximadamente 1 cm) de forma a permitir que o peixe passasse para o lado escuro. Foi avaliado o tempo gasto por cada animal na parte clara do aquário durante 300 segundos de observação. Além disso também foi registrado a latência para a primeira entrada no lado escuro do aquário e o número de cruzamento entre os compartimentos. Esses parâmetros foram selecionados para avaliar o efeito ansiolítico ao invés do efeito sedativo para as amostras.

Figura 2.6 – Aparato experimental para execução do teste claro/escuro em peixe-zebra.



Fonte: A autora.

2.3.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol em peixe-zebra

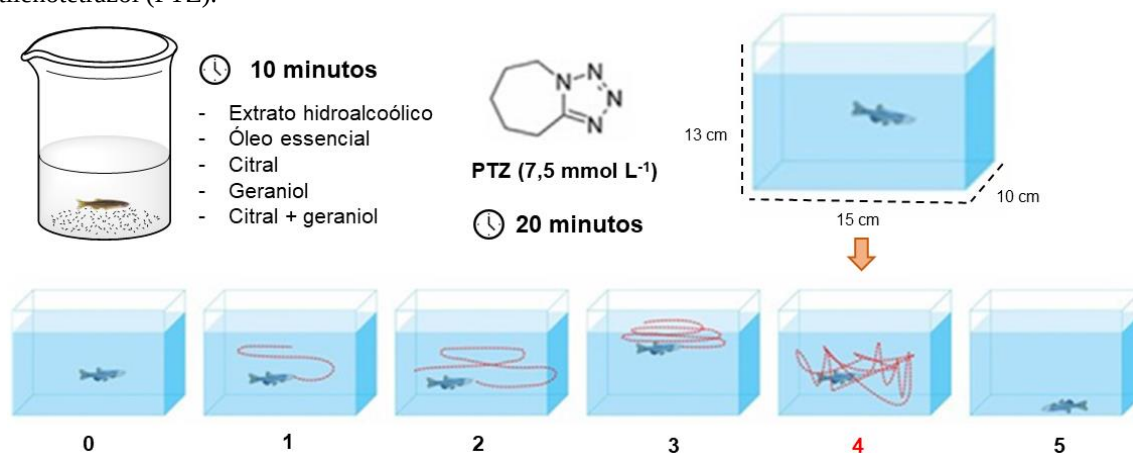
2.3.6.1 Tratamentos

A atividade anticonvulsivante do óleo essencial, e do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* e dos padrões citral e geraniol foi avaliada de acordo com o método descrito por Mussulini e colaboradores [258]. Primeiramente, cada animal foi imerso (N=12 animais por grupo) individualmente nas soluções de óleo essencial (5, 10 e 20 mg L⁻¹), extrato hidroalcoólico (1, 2 e 3 g L⁻¹), citral (5, 10 e 20 mg L⁻¹), geraniol (5, 10 e 20 mg L⁻¹) ou na associação citral + geraniol (5 mg L⁻¹) por 10 minutos. Em seguida, os peixes foram transferidos para o aquário (13 × 15 × 10 cm) preenchido com 1 L de solução aquosa de PTZ (7,5 mmol L⁻¹) previamente preparado com água decolorinada. A atividade anticonvulsivante foi registrada durante 20 minutos. Para este estudo, uma solução de clonazepam (0,75 mg L⁻¹) foi utilizada como controle positivo e o veículo (1 mL de 0,5% (v/v) Tween80 em água decolorinada) como controle negativo. As concentrações empregadas para a execução deste estudo foram escolhidas com base em experimentos piloto. A concentração e o tempo de exposição do PTZ foram escolhidos com base naquela em que não causou a mortalidade do peixe-zebra. Um esquema da realização dos testes está apresentado na Figura 2.7.

A atividade anticonvulsivante das amostras estudadas foi analisada pelo estágio de convulsão apresentado por cada peixe de acordo com o sistema de pontuação descrito por Fontana e colaboradores [255]. Na Tabela 2.1 estão apresentadas as descrições de cada estágio comportamental utilizado para a avaliação da atividade anticonvulsivante. Além disso, também foi medido o tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) [237]. O comportamento

de cada peixe foi registrado por uma câmera (Logitech® modelo C270) colocada a cerca de 30 cm do aquário teste.

Figura 2.7 – Esquema representativo do teste de atividade anticonvulsivante em peixe-zebra induzido por pentilenotetrazol (PTZ).



Fonte: Adaptado de [262].

Tabela 2.1 – Estágios comportamentais semelhantes a convulsões em peixe-zebra induzido por PTZ.

Estágio	Comportamento
1	Aumento da atividade de natação e movimento dos opérculos
2	Movimentos para a direita e esquerda e movimentos erráticos
3	Movimentos circulares
4	Comportamento semelhante a convulsão clônica (contração muscular anormal, natação em saca-rolhas)
5	Comportamento semelhante a convulsão tônica (perda da postura corporal no fundo do aquário)

Fonte: Adaptado de [255].

2.3.6.2 Envolvimento dos receptores GABA_A na atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol

Para investigar o envolvimento dos receptores GABA_A no efeito anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. citratus*, citral e/ou geraniol, os peixes foram previamente tratados com flumazenil. Primeiramente, os peixes (N = 12 animais por grupo) foram imersos individualmente em uma solução de flumazenil 1,25 mg L⁻¹ por 20 minutos antes da administração do extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *C. citratus*, citral e/ou geraniol por 10 minutos. O grupo controle foi exposto à solução de flumazenil por 20 minutos e à solução de clonazepam 0,75 mg L⁻¹ por 10 minutos. Os animais foram analisados individualmente

quanto à atividade anticonvulsivante como descrito no item 2.3.6.1 e foi registrado o tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4).

2.3.7 Ensaios bioquímicos

2.3.7.1 *Preparação do homogenato de cérebro*

Os cérebros dos peixes-zebra foram imediatamente dissecados sob anestesia com gelo após a exposição ao PTZ. Em seguida, quatro cérebros foram agrupados e posteriormente homogeneizados em um homogeneizador de vidro em uma solução tampão fosfato. Os homogenatos foram centrifugados a $700 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O teor de proteínas totais para cada amostra foi determinado por meio do método de Bradford a partir de uma curva padrão de albumina de soro bovino [263]. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para avaliar as defesas antioxidantes enzimática e não-enzimática.

2.3.7.2 *Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)*

Os níveis de MDA nos homogenatos de cérebro foram estimados como descrito por Wilbur e colaboradores [264]. Os homogenatos ($50 \mu\text{L}$) foram misturados com $100 \mu\text{L}$ de TCA 15% (m/v) e centrifugados a $2.500 \times g$ a 4°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado uma solução de TBA 0,6% (m/v) e as misturas foram incubadas em água em ebulição em banho termostaticado por 30 minutos. Os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, extraídos com n-butanol e centrifugados a $3.000 \times g$ por 10 minutos. Os níveis de MDA foram calculados a partir de uma curva analítica de MDA. Os valores de absorbância foram registrados em espectrofotômetro a 532 nm e os resultados foram expressos como $\mu\text{mol MDA mg}^{-1}$ de proteína.

2.3.7.3 *Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)*

Os níveis de GSH nos homogenatos foram estimados como descrito por Ellman [265]. Primeiramente, os homogenatos ($20 \mu\text{L}$) foram misturados com solução aquosa de TCA 10% (m/v) e centrifugados a $1.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Em seguida, os sobrenadantes obtidos foram misturados com solução de DTNB 10 mmol L^{-1} . Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, os valores de absorbância foram registrados em espectrofotômetro a 412

nm. Os níveis de GSH foram calculados a partir de uma curva analítica de GSH e os resultados foram expressos como nmol SH mg⁻¹ de proteína.

2.3.7.4 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi medida de acordo com o método proposto por Aebi [266] por meio da utilização do H₂O₂ como substrato. Inicialmente, uma solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹; pH 7,0) foi misturada com os homogenatos de cérebro (10 µL). Em seguida, foi adicionado H₂O₂ (3 mmol L⁻¹) e os valores de absorbância foram monitorados em espectrofotômetro a 240 nm por 2 minutos em intervalo de 30 segundos. Os resultados foram expressos como µmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.3.7.5 Determinação do conteúdo de óxido nítrico (NO)

O conteúdo de NO foi determinado com o reagente de Griess de acordo com o método descrito por Green e colaboradores [267]. O homogenato de cérebro (100 µL) foi misturado com o reagente de Griess (sulfanilamida 1% (m/v), H₃PO₄ 5% (v/v), N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1% (m/v)) em uma proporção 1:1 e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. A concentração de nitrito nos homogenatos foi estimada a partir de uma curva analítica de NaNO₂. Os valores de absorbância foram registrados em espectrofotômetro a 543 nm e os resultados foram expressos como µmol NO mg⁻¹ de proteína.

2.3.8 Análise Estatística

O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pela comparação múltipla de Dunn. Os resultados obtidos (tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência e número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro) foram apresentados como a média ± erro padrão da média (EP).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Avaliação do efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol em peixe-zebra

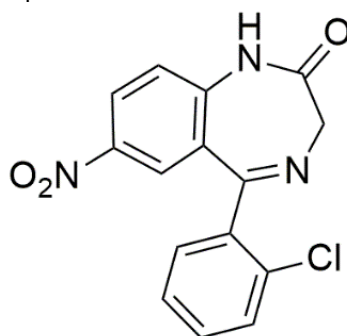
Neste trabalho, o efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *C. citratus*, assim como dos padrões citral e geraniol foi avaliado por meio do teste claro/escuro em peixe-zebra, visto que a preferência por ambientes escuros é uma reação típica deste animal e representa uma estratégia de defesa desta espécie [227,233]. Neste teste, quando os peixes são expostos individualmente à diferentes ambientes, é esperado que apresentem comportamentos ansiosos moderados [268]. Neste estudo, os peixes foram removidos do aquário moradia e colocados individualmente nas soluções das amostras estudadas, o que acarreta em um aumento do comportamento de ansiedade no teste claro/escuro [232]. Sabe-se que o isolamento social induz uma resposta estressante no peixe-zebra, o que reflete diretamente no comportamento relacionado à ansiedade quando em um ambiente novo [269]. Esse comportamento pode ser explicado ao se levar em consideração que esses animais consistem em uma espécie que vive em cardume e têm a tendência de formar e permanecer em grupos [218].

Neste trabalho, foi avaliado o comportamento associado ao efeito ansiolítico e à atividade locomotora do peixe-zebra no teste claro/escuro. Desta forma, foram analisados o tempo de permanência no lado claro do aquário, o tempo de latência para explorar o lado escuro do aquário (medida da espontaneidade para explorar novos ambientes), e o número de transições entre os compartimentos claro e escuro para cada peixe, os quais são comportamentos associados ao efeito ansiolítico e atividade locomotora. O aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário reflete um comportamento menos ansioso e é um indicativo do efeito ansiolítico induzido pelas amostras avaliadas [227,233].

O clonazepam (Figura 2.8) é o agente ansiolítico mais comumente empregado no tratamento dos transtornos de ansiedade e foi utilizado como controle positivo na concentração de 0,75 mg L⁻¹ [165]. Como esperado, foi observado um aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário para o grupo de animais previamente expostos a este fármaco, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 2.9). Por outro lado, não foram observadas alterações no número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro, assim como para o tempo de latência quando comparado com o grupo controle (Figura 2.9). Portanto, como não foi observada uma diminuição no número de cruzamentos entre os compartimentos claro e

escuro, pode-se inferir que o clonazepam na concentração empregada não exibiu efeito sedativo significativo neste sistema [227]. Desta forma, estas observações demonstraram a adequação do peixe-zebra como modelo animal para avaliar as propriedades ansiolíticas das amostras de *C. citratus*.

Figura 2.8 – Estrutura química do clonazepam.

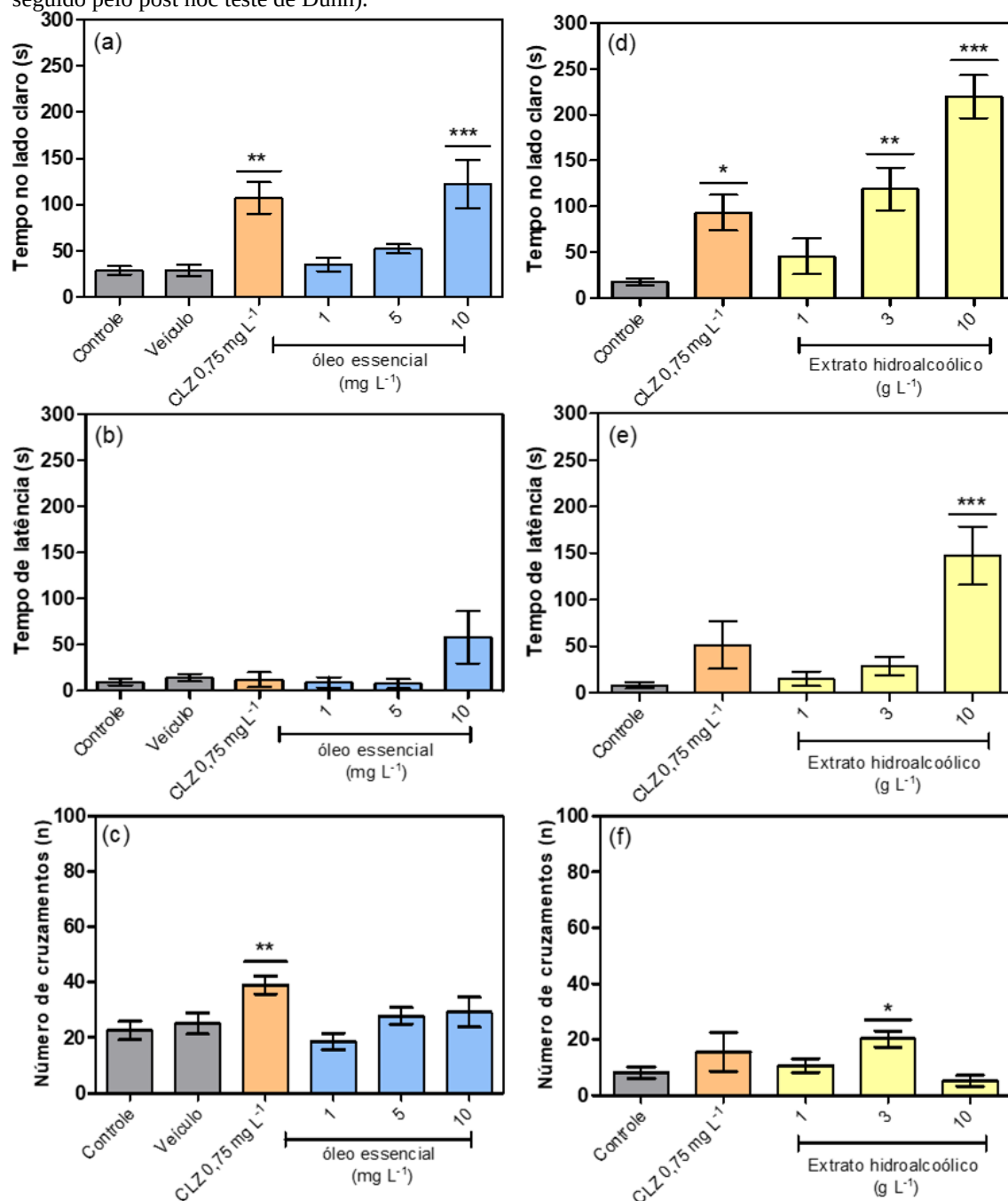


Fonte: A autora.

Inicialmente, foi analisado o possível efeito ansiolítico de diferentes concentrações das amostras de *C. citratus*, assim como para os padrões citral e geraniol, com a finalidade de descartar algum efeito letal ou sedativo. Demonstrou-se nas Figuras 2.9 e 2.10 que os grupos de peixes previamente expostos a estes compostos exibiram efeito ansiolítico, pois houve um aumento no tempo de permanência na parte clara do aquário quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

Os óleos essenciais de plantas medicinais são os principais produtos utilizados em aromaterapia como alternativa aos ansiolíticos e antidepressivos comuns no tratamento dos transtornos de ansiedade [82,270]. Neste trabalho, foi demonstrado que o grupo de peixes expostos ao óleo essencial na concentração de 10 mg L⁻¹ causou uma significativa ansiólise ($p < 0.001$) (Figura 2.9a), devido ao aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário quando comparado ao grupo controle. Porém, não foram observadas alterações no número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro e no tempo de latência após a administração do óleo essencial (Figuras 2.9b e 2.9c), o que indicou que não houveram alterações na atividade locomotora dos animais [227].

Figura 2.9 – Efeitos do (a, b, c) óleo essencial e do (d, e, f) extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (n=14 animais/grupo), no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).



Fonte: A autora.

A ansiólise observada pode ser atribuída à presença do citral (18,57%), geraniol (22,02%) e linalol (20,59%), visto que são os principais constituintes químicos do óleo essencial de *C. citratus* identificados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) [1]. Os resultados obtidos estão de acordo com os da literatura em ratos, em que foi verificado um aumento na frequência de entrada e no tempo de permanência nos braços

abertos no teste de labirinto em cruz elevado (uma medida de ansiedade em ratos, pois sugere a aversão dos animais a espaços abertos), o que indicou um efeito ansiolítico do óleo essencial [79,190].

Neste estudo, foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico de *C. citratus* também reduziu a ansiedade no peixe-zebra quando comparada com a do grupo controle (Figura 2.9d). No teste claro/escuro, foi verificado que os grupos de animais previamente expostos ao extrato nas concentrações de 3 e 10 g L⁻¹ ($p < 0,01$; $p < 0,001$) permaneceram por mais tempo na parte clara do aquário quando comparados com o grupo controle. Contudo, houve um aumento no tempo de latência para explorar o lado escuro do aquário para o grupo de animais expostos ao extrato na concentração de 10 g L⁻¹ ($p < 0,001$). Além disso, o tratamento na concentração de 3 g L⁻¹ aumentou o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro ($p < 0,05$), o que indicou uma tendência do grupo de peixes para explorar os compartimentos do aquário e, consequentemente, o efeito ansiolítico do extrato nesta concentração [227].

Foi verificado que o extrato hidroalcoólico é constituído por compostos fenólicos ($38,50 \pm 2,30$ mg AG g⁻¹ extrato) e flavonoides ($15,70 \pm 1,40$ mg QER g⁻¹ extrato). Em nosso estudo anterior, as análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelaram que este extrato é constituído por polifenóis, como a apigenina, luteolina, ácido clorogênico, rutina e quercetina [1]. Além disso, também foi demonstrado que a fração clorofórmica obtida a partir do fracionamento do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* era constituída por citral e geraniol, o que indicou que estes compostos estão presentes no extrato hidroalcoólico. Portanto, a presença de polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides), terpenos e a ação sinérgica entre esses compostos podem estar envolvidas no efeito ansiolítico observado para o extrato deste estudo. A presença simultânea de uma ampla gama de compostos bioativos em extratos de plantas medicinais pode potencializar sua ação em múltiplos mecanismos celulares, potencializando a sua eficácia terapêutica [271].

Na literatura, foram demonstradas as propriedades ansiolítica e anti-depressiva para alguns flavonoides, como a apigenina e a quercetina, os quais se ligam seletivamente e com alta afinidade aos receptores benzodiazepínicos como o GABA_A [185]. Além disso, diversos estudos comprovaram que estes compostos estão envolvidos na modulação dos receptores GABA_A e também exibem efeitos sedativo e anticonvulsivante [185,186]. Vale ressaltar que os polifenóis podem atuar como ansiolíticos devido a algumas características químicas como a lipofilicidade, a qual facilita a passagem por meio da barreira hematoencefálica [272,273].

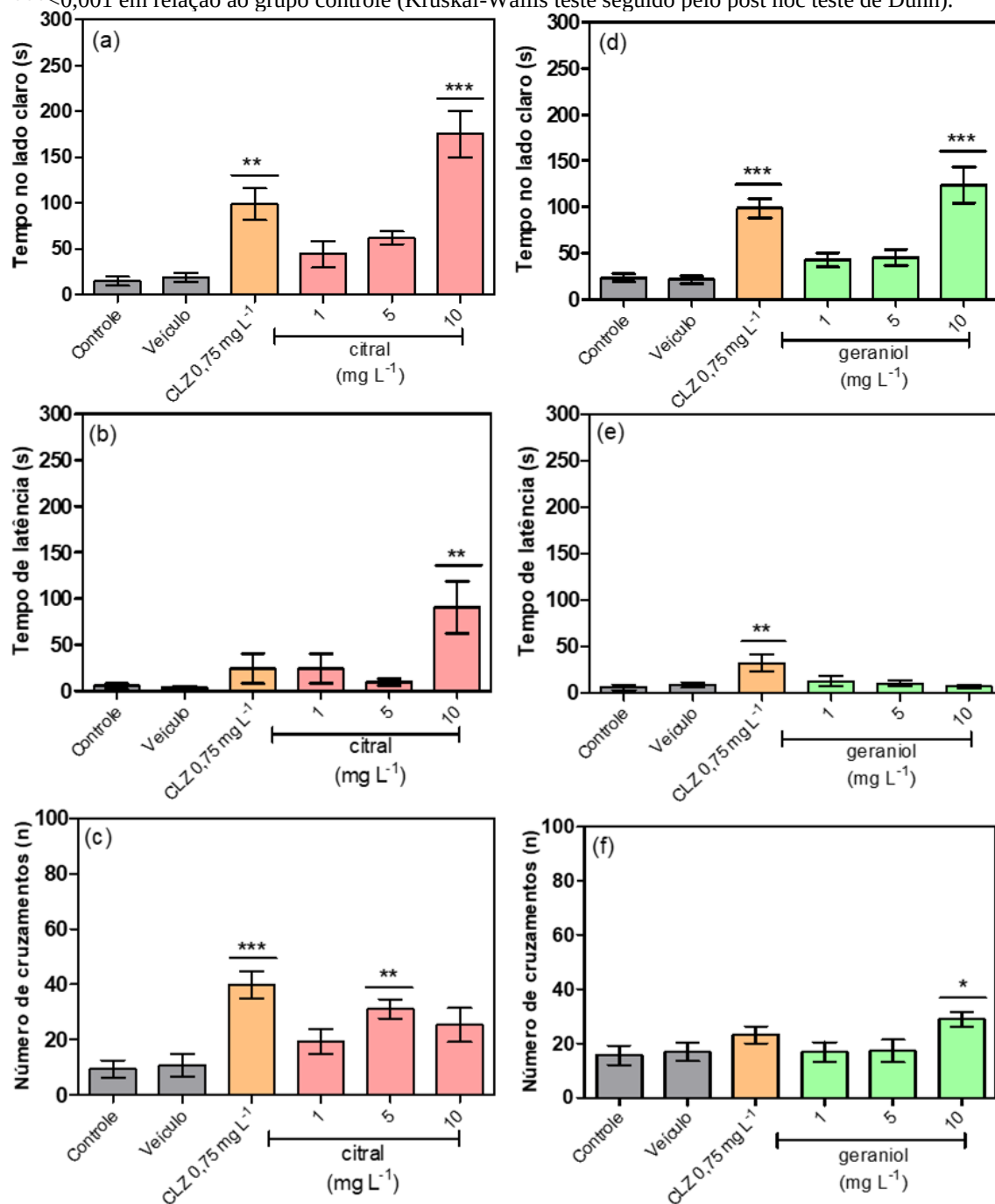
Neste estudo, também foram investigados o efeito ansiolítico dos padrões citral e geraniol para verificar a contribuição destes compostos no efeito ansiolítico do óleo essencial

de *C. citratus* (Figura 2.10). Observou-se um aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário para os grupos de animais que foram expostos a estes compostos na maior concentração avaliada (10 mg L^{-1}) quando comparado com o grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 2.10a e 2.10d), o que sugere um efeito ansiolítico desses monoterpenos. Além disso, não houve alterações na atividade locomotora dos animais quando expostos a estes compostos, pois o tempo de latência não foi alterado nos grupos, exceto para o citral na concentração de 10 mg L^{-1} (Figura 2.10). Ainda, o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro não foi alterado para o citral na concentração de 10 mg L^{-1} , o que indicou nenhuma alteração na atividade locomotora e a ausência de efeito sedativo. Além disso, houve um aumento no número de cruzamentos para o geraniol na concentração de 10 mg L^{-1} , o que indicou uma tendência dos peixes em explorar um novo ambiente ($p < 0,05$) (Figura 2.10f). Desta forma, como o citral e o geraniol são os componentes majoritários presentes no óleo essencial de *C. citratus*, o seu efeito ansiolítico pode ser justificado, em parte, à presença destes compostos.

O efeito ansiolítico da mistura entre citral e geraniol nas menores concentrações avaliadas também foi investigada neste estudo (Figura 2.11). Quando as concentrações ineficientes de citral (1 mg L^{-1}) e geraniol (1 mg L^{-1}) foram administradas juntas, foi observado um aumento no tempo de permanência no lado claro do aquário para o grupo de animais expostos a esta mistura, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,001$), o que indicou um efeito ansiolítico (Figura 2.11a). Além disso, não houve diferença estatística para o tempo de latência para explorar o lado escuro do aquário e no número de cruzamentos entre os compartimentos quando comparado com o grupo controle, o que indicou que esta mistura não alterou a atividade locomotora dos animais e que não houve efeito sedativo para este grupo (Figura 2.11b e 2.11c). Os resultados aqui obtidos corroboraram com alguns estudos da literatura que mostraram a existência de sinergismo em relação ao efeito ansiolítico entre compostos presentes nos óleos essenciais de plantas medicinais [274]. Ainda, estes dados também ajudaram a comprovar o efeito sinérgico dos constituintes químicos e a justificar o efeito ansiolítico do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico.

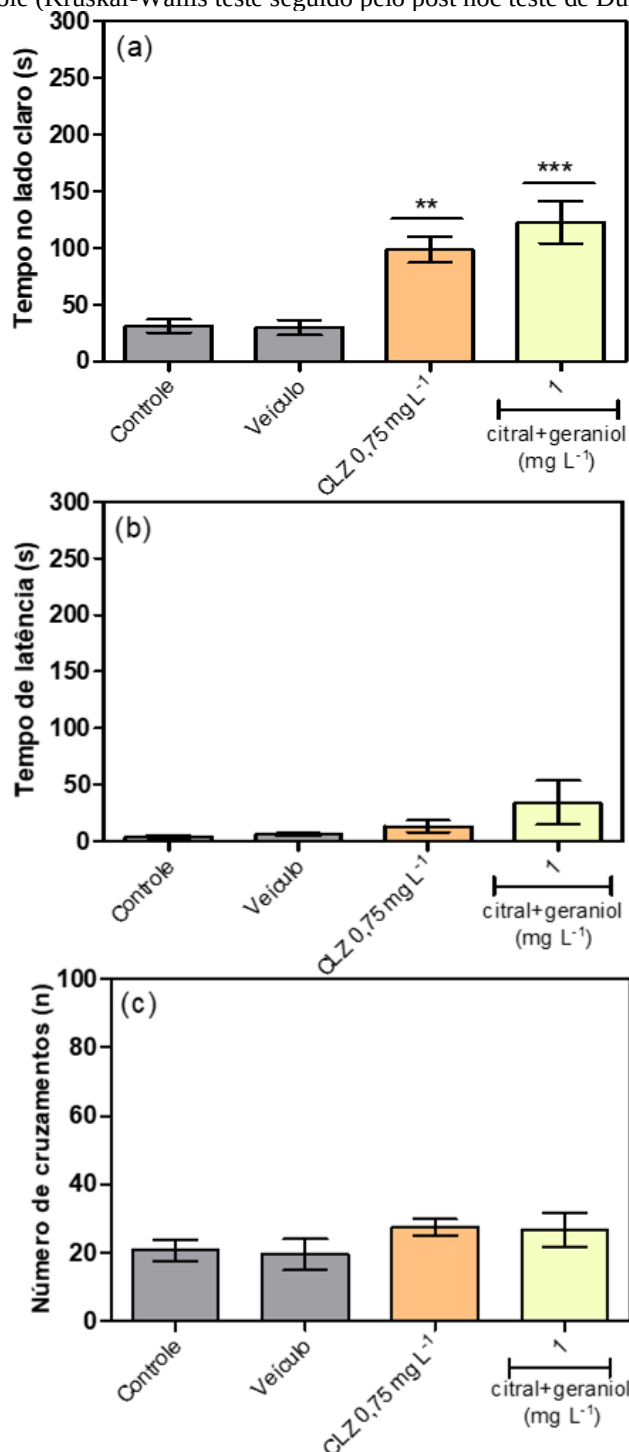
Contudo, os resultados obtidos contrastam com os reportados por Vale e colaboradores [88], em que foi verificado que o citral exibiu efeito sedativo e não reduziu os níveis de ansiedade em ratos. As diferenças observadas podem ser atribuídas aos diferentes modelos animais empregados nos estudos, os quais exibem níveis de ansiedade diferenciados [240].

Figura 2.10 – Efeitos do (a, b, c) citral e do (d, e, f) geraniol e no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (n=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$ em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).



Fonte: A autora.

Figura 2.11 – Efeitos da (a, b, c) mistura citral e geraniol (1 mg L^{-1}) no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro ($n=14$ animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. ** < 0,01; ***<0,001 em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).



Fonte: A autora.

Foi demonstrado por meio de modelos animais de ansiedade, que compostos de diferentes classes derivados de plantas medicinais exibem propriedades ansiolíticas. Recentemente, Medeiros e colaboradores [275] verificaram que o geraniol administrado por via intraperitoneal exibiu um efeito depressor no sistema nervoso central de ratos. Em outro

trabalho, foi verificado que a inalação de linalol causou um efeito ansiolítico em camundongos [276]. Portanto, é possível que alguns componentes lipofílicos voláteis (não polares) produzidos por plantas podem atravessar a barreira hematoencefálica e também modular as vias de sinalização envolvidas na ansiedade e depressão [200]. Entretanto, quando ratos foram tratados com citral, foi observado efeito sedativo, mas nenhuma redução nos níveis de ansiedade foi verificada [88].

Desta forma, as diferenças entre os resultados aqui obtidos e os estudos da literatura, podem ser devidas aos modelos animais empregados, às doses avaliadas e à via de administração da amostra. Na maioria das pesquisas com peixe-zebra, a administração de compostos ou medicamentos é feita por meio da imersão dos animais nas soluções. Este método tem algumas vantagens quando comparado à injeção, utilizada nos roedores. O estresse causado aos peixes quando tratados por imersão é consideravelmente menor do que no caso dos roedores tratados por injeção. Com isto, eventuais alterações nos dados comportamentais poderiam ser minimizadas [277]. Além disso, a resposta ao estresse do peixe-zebra é semelhante à dos seres humanos, que usam o cortisol como principal hormônio do estresse, diferentemente dos roedores que usam a corticosterona [240,278].

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o peixe-zebra pode ser utilizado como um modelo animal alternativo para avaliar as propriedades ansiolíticas de amostras de *C. citratus* e compostos relacionados. Além disso, estes animais apresentam algumas importantes vantagens quando comparados aos animais tradicionalmente empregados em pesquisas farmacológicas [279]. Por exemplo, os custos de aquisição e manutenção são mais baixos quando comparados aos utilizados para roedores [218,261]. Outras vantagens são a facilidade de administração de medicamentos em peixes (imersão), o que elimina o estresse da injeção. Além disso, esses animais podem ser usados para a triagem inicial de produtos naturais, visto que este modelo pode levar a uma obtenção mais rápida de resultados em comparação com os roedores. As quantidades de amostras necessárias para os testes com o peixe-zebra são inferiores às utilizadas para os roedores [232].

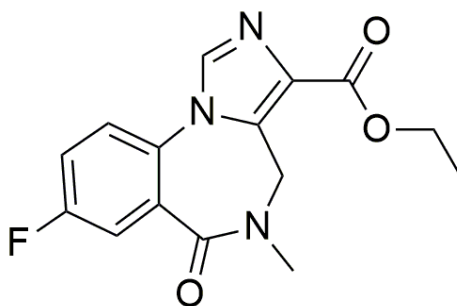
2.4.2 Investigação do envolvimento dos receptores GABA_A no efeito ansiolítico de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol

O GABA_A é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central e está envolvido em vários processos neurofisiológicos [280,281]. Seus receptores são canais de cloreto heterogêneos dependentes de GABA que possuem locais de ligação para compostos que

modificam alostericamente o canal, como os benzodiazepínicos [210]. Além disso, a afinidade dos benzodiazepínicos pelos receptores GABA_A é determinada pela natureza das subunidades α e γ , sendo que possuem diferentes estruturas de subunidades em diferentes regiões do cérebro, portanto, sua sensibilidade aos moduladores alostéricos pode variar [281]. Devido à heterogeneidade estrutural dos receptores GABA_A, vários compostos naturais têm propriedades moduladoras destes receptores [208].

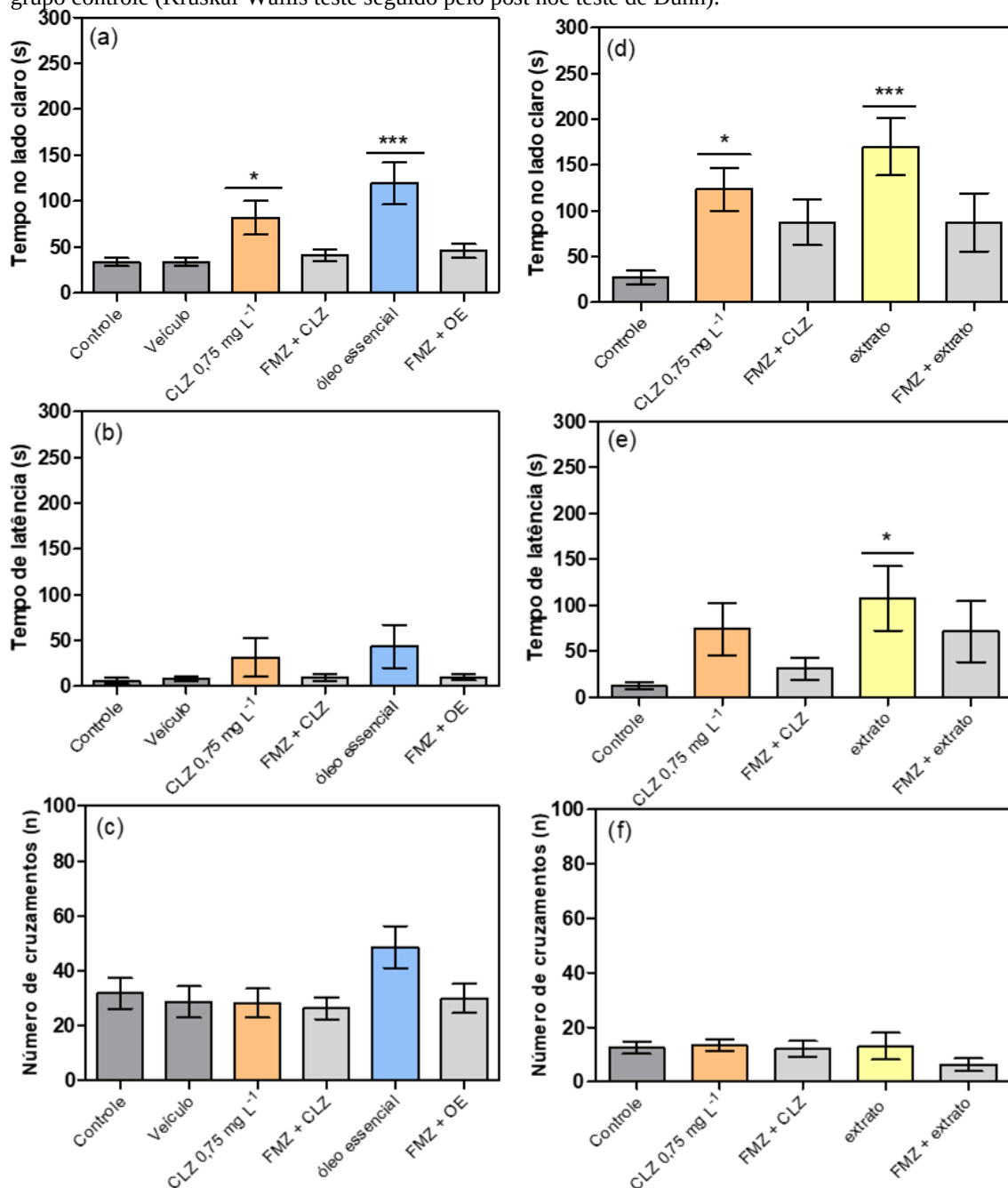
Desta forma, com a finalidade de avaliar o possível mecanismo envolvido no efeito ansiolítico observado, os animais foram previamente expostos ao flumazenil (FMZ) antes de serem transferidos para as amostras de *C. citratus*. O flumazenil (Figura 2.12) é um antagonista específico do receptor GABA_A que pode rapidamente reverter os efeitos ansiolítico, sedativo e hipnótico dos benzodiazepínicos, como por exemplo o clonazepam [165]. Como verificado na Figura 2.13, a prévia exposição a este fármaco reverteu o efeito ansiolítico do clonazepam quando comparado com o grupo que recebeu apenas esta droga, devido à redução no tempo de permanência dos animais no lado claro do aquário ($p < 0,05$). Além disso, o tempo de latência e o número de cruzamentos entre os compartimentos não foi alterado para este grupo, o que validou o experimento utilizado neste estudo (Figura 2.13).

Figura 2.12 – Estrutura química do flumazenil.



Fonte: A autora.

Figura 2.13 – Efeitos da exposição do flumazenil 1,25 mg L⁻¹ (FMZ) prévia ao (a, b, c) óleo essencial e ao (d, e, f) extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001 em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).

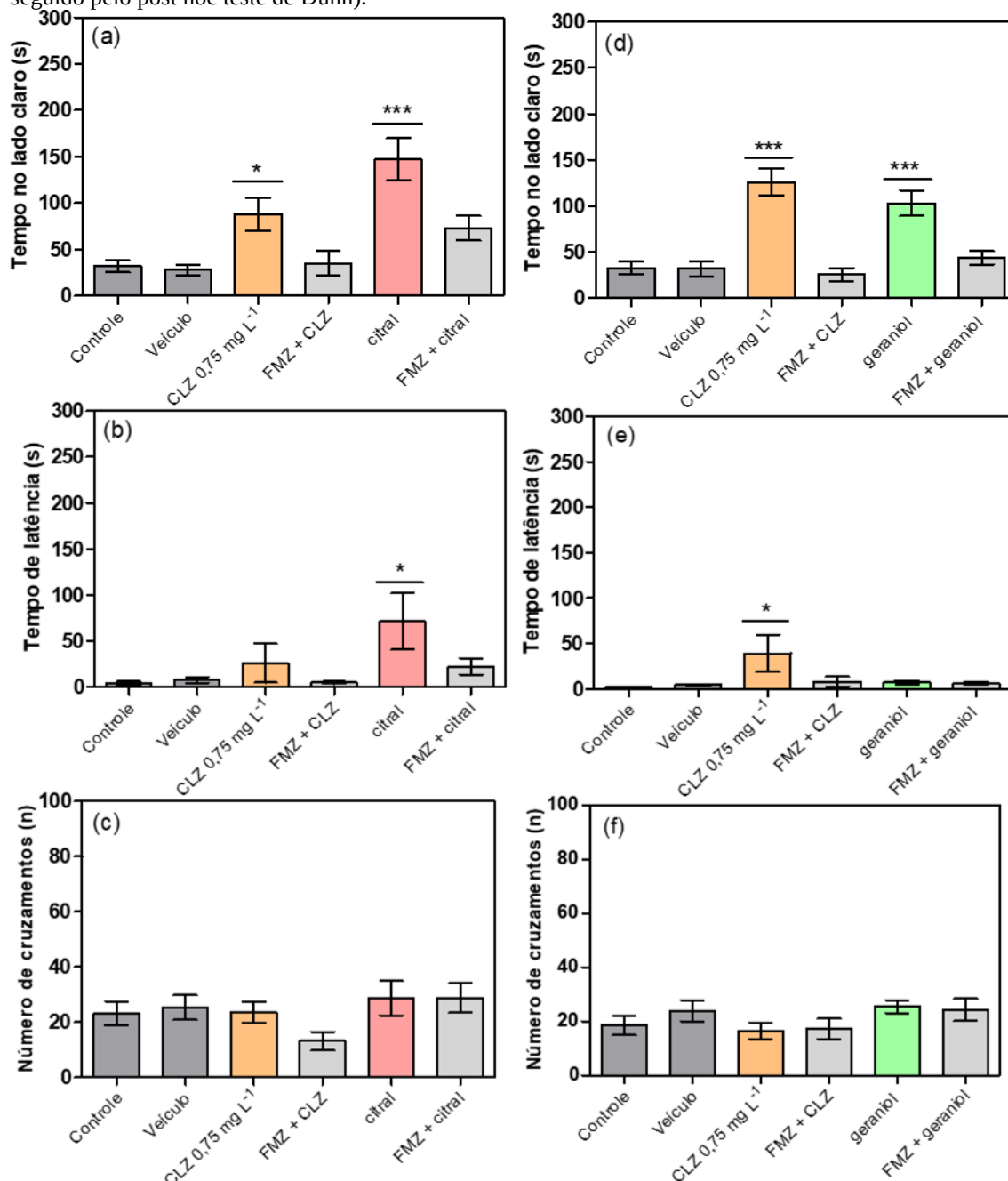


Fonte: A autora.

Neste sentido, as concentrações dos compostos e das amostras de *C. citratus* selecionadas para este estudo foram aquelas mais efetivas observadas no teste claro/escuro (Figuras 2.9 e 2.10), exceto para o extrato hidroalcoólico a fim de descartar algum efeito sedativo ou alteração na atividade locomotora dos animais. Como pode ser verificado nas Figuras 2.13 e 2.14, o efeito ansiolítico do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *C.*

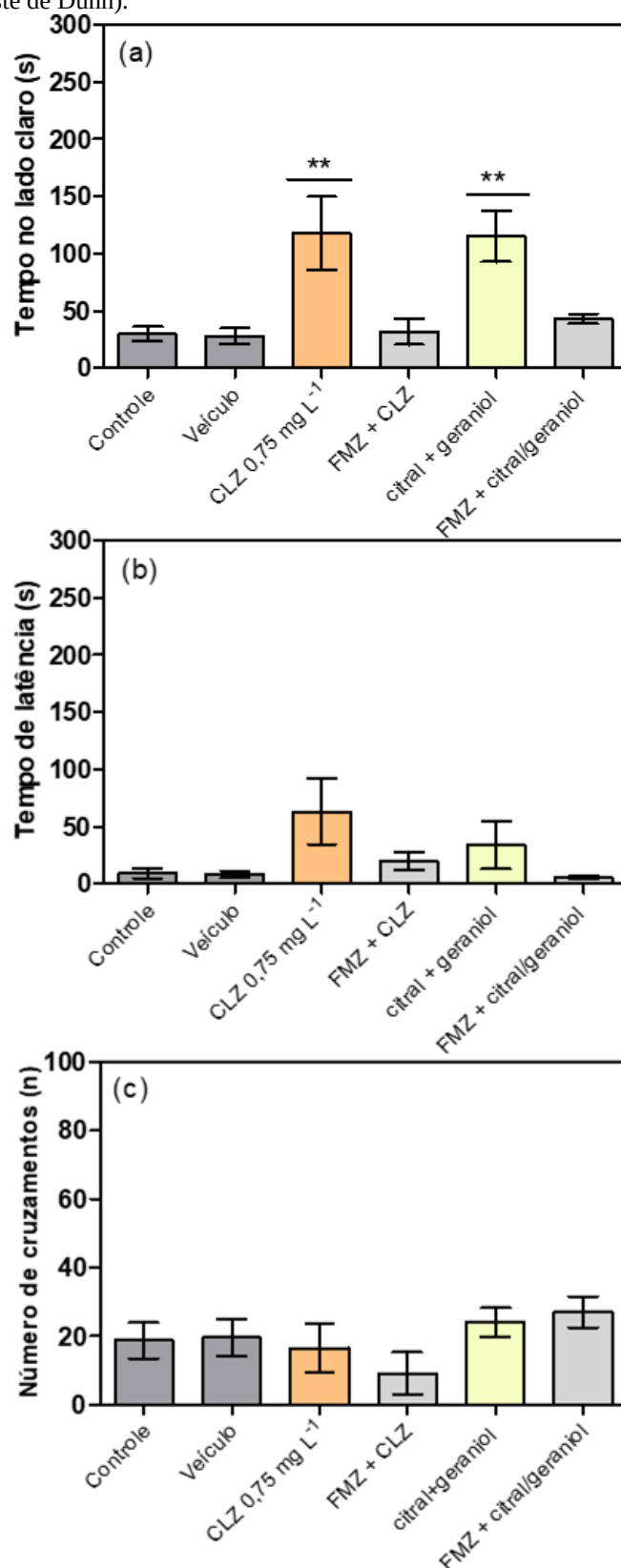
citratum, assim como para o citral e geraniol foi antagonizado com a coadministração do flumazenil. Além disso, também foi verificado que a prévia exposição ao flumazenil antagonizou o efeito ansiolítico observado para a mistura entre o citral e geraniol (Figura 2.15).

Figura 2.14 – Efeitos da exposição do flumazenil 1,25 mg L⁻¹ (FMZ) prévia ao (a, b, c) citral e ao (d, e, f) geraniol no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. *<0,05; **<0,01; ***<0,001 em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).



Fonte: A autora.

Figura 2.15 – Efeitos da exposição do flumazenil 1,25 mg L⁻¹ (FMZ) prévia a (a, b, c) mistura entre citral e geraniol (1 mg L⁻¹) no comportamento do peixe-zebra no teste claro/escuro (N=14 animais/grupo) no tempo de permanência no lado claro do aquário, tempo de latência para explorar o lado escuro e o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001 em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).



Fonte: A autora.

Essas observações podem ser explicadas pela redução do tempo gasto no compartimento claro do aquário pelos grupos de animais expostos ao flumazenil antes de serem tratados com as amostras, quando comparados aos grupos tratados com apenas as amostras avaliadas. Contudo, não houve alterações no tempo de latência e no número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. Este resultado sugere um possível envolvimento do receptor GABA_A no efeito ansiolítico observado. O flumazenil é um antagonista competitivo que inibe os efeitos farmacológicos dos benzodiazepínicos e não benzodiazepínicos no SNC, pois interage com maior afinidade com o local receptor de benzodiazepina no complexo receptor GABA-benzodiazepínico. Como resultado, esta droga desloca a ligação da benzodiazepina ao receptor e reverte seus efeitos farmacológicos [182].

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com aqueles observados no estudo realizado por Costa e colaboradores [79], em que foi verificado que a coadministração do flumazenil antagonizou o efeito ansiolítico do óleo essencial de *C. citratus* em ratos. Estudos revelaram que os óleos essenciais são uma fonte de moduladores do sistema gabaérgico e de canais de íons cloro [187,282,283]. Além disso, estudos da literatura também demonstraram que o prévio tratamento com flumazenil reverteu o efeito ansiolítico de extratos de plantas constituídos por polifenóis [185]. Alguns trabalhos sugerem que os grupos elétron-retiradores e os anéis aromáticos dos polifenóis estão envolvidos na maior afinidade destes compostos pelos receptores benzodiazepínicos [186,284].

Os resultados obtidos para o citral e o geraniol corroboraram estudos da literatura, os quais mostraram que os terpenos exercem seu efeito ansiolítico via sistema gabaérgico [285]. Desta forma, compostos que possuem estruturas químicas similares podem apresentar interações similares com os receptores cerebrais. No estudo realizado por Kessler e colaboradores [286] foi avaliado o efeito na modulação dos receptores GABA de terpenos com estruturas químicas semelhantes. Os autores observaram uma modulação positiva quando estes compostos apresentavam um grupo hidroxila (OH), comparado com aqueles em que este grupo estava ausente. Tais observações podem explicar os resultados obtidos neste trabalho, em que a prévia exposição ao flumazenil reverteu a ansiólise observada para o citral e o geraniol. Hall e colaboradores [285] observaram que os terpenos com o grupo OH foram mais efetivos na modulação dos receptores GABA comparados com as cetonas, então sugeriram uma interação polar entre o terpeno e o receptor [285].

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o uso da *C. citratus* no tratamento dos transtornos de ansiedade na medicina popular na forma de chá e na aromaterapia, além de

também mostrar o emprego do peixe-zebra como modelo animal na avaliação das propriedades ansiolíticas de extratos e compostos relacionadas a esta planta.

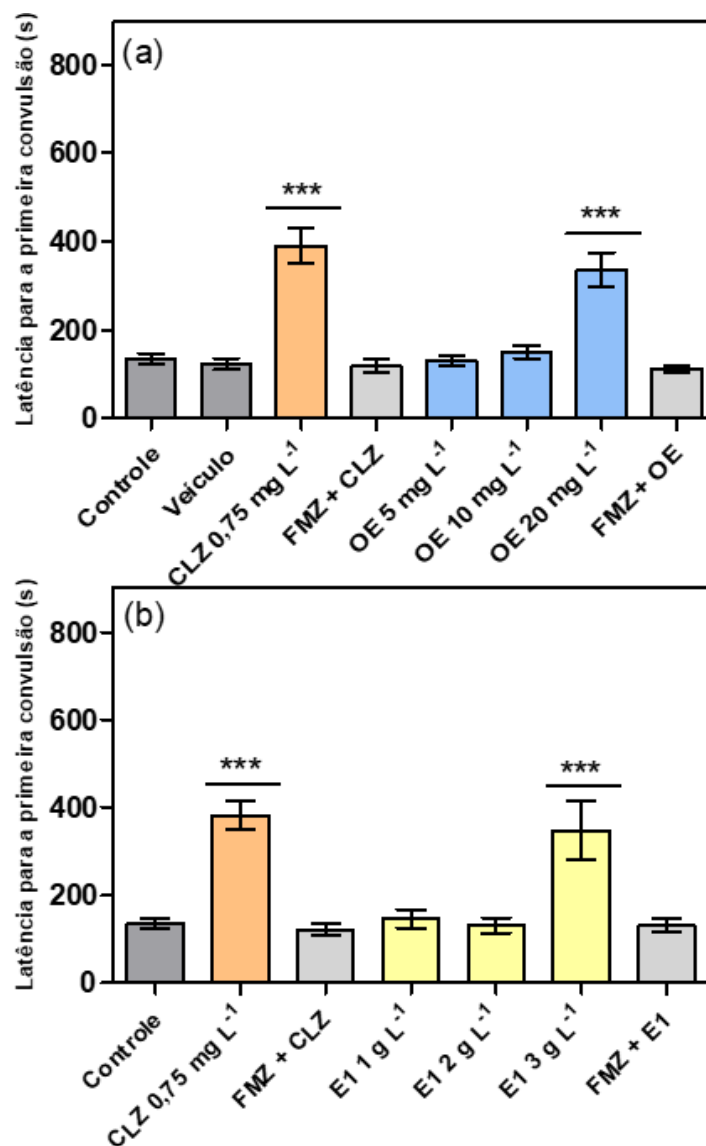
2.4.3 Avaliação da atividade anticonvulsivante de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol em peixe-zebra

A atividade anticonvulsivante do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *C. citratus*, e dos padrões citral e/ou geraniol foi investigada por meio de convulsões induzidas por PTZ em peixe-zebra como modelo animal de epilepsia. O PTZ, é um antagonista do receptor GABA_A amplamente empregado no *screening* de drogas antiepiléticas de origem natural. Seu efeito convulsivo é exercido pela inibição da atividade dos receptores GABA_A. O PTZ bloqueia o influxo de Cl⁻ mediado por GABA no SNC, por meio de uma interação alostérica no canal de Cl⁻ levando à indução de convulsões em animais [287,288].

Estudos da literatura demonstraram que uma única exposição ao PTZ é capaz de causar comportamentos semelhantes aos de convulsão em peixe-zebra [237,255]. Desta forma, quando os peixes foram imersos na solução de PTZ 7,5 mmol L⁻¹ por 20 minutos, foi possível observar vários estágios de convulsões (estágios 1 – 5) (Tabela 2.1). Inicialmente, foi observado um aumento pronunciado na atividade de natação, seguido por movimentos tipo clônico (nado saca-rolhas e imobilidade) e perda de postura, os quais são comportamentos semelhantes às crises clônicas e tônicas [255,257,258].

Neste estudo, o tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4), induzida por PTZ foi analisada para os grupos de peixes previamente tratados com o óleo essencial e extrato hidroalcoólico de *C. citratus*, citral e/ou geraniol. As Figuras 2.16 e 2.17 demonstraram que os grupos de peixes previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L⁻¹) ($p < 0,001$), extrato hidroalcoólico (E1) (3 g L⁻¹) ($p < 0,001$), e com os padrões citral (20 mg L⁻¹) ($p < 0,010$) e geraniol (20 mg L⁻¹) ($p < 0,001$), por 10 minutos prolongaram o tempo para a primeira convulsão (estágio 4), quando comparado com o grupo controle ou veículo. Além disso, o grupo de animais previamente tratado com a mistura de citral (5 mg L⁻¹) e geraniol (5 mg L⁻¹) (CIT + GER) apresentou um aumento no tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,010$) (Figura 2.17).

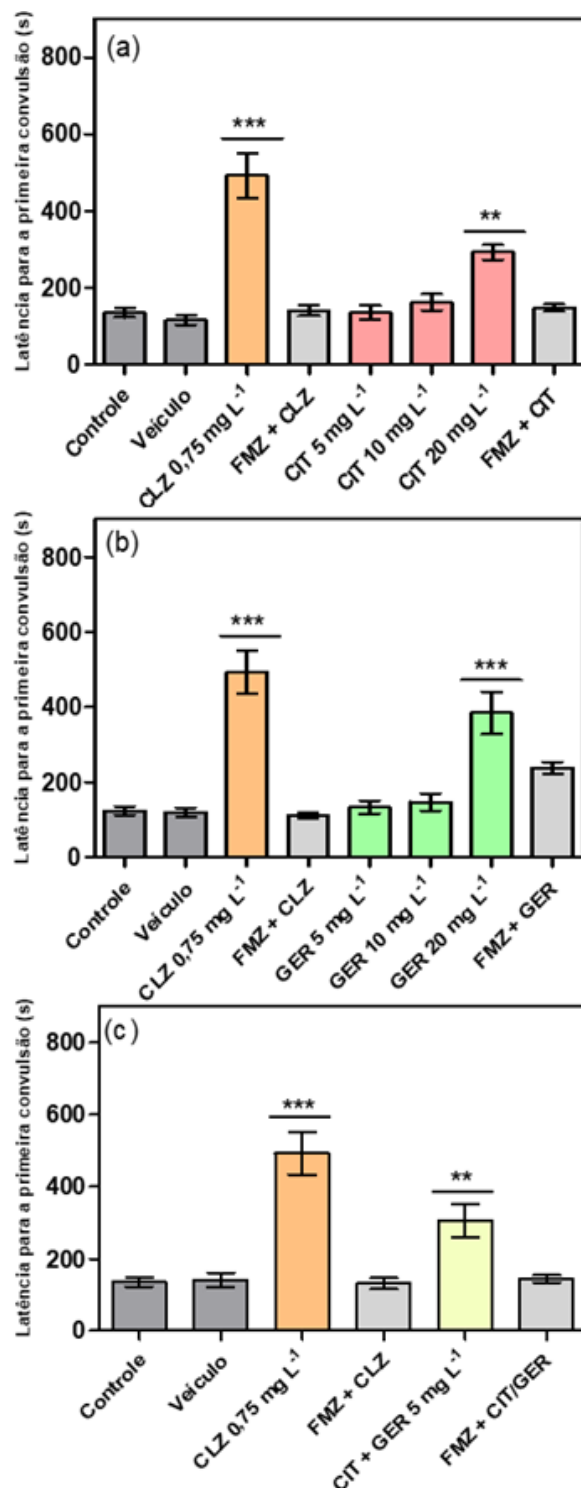
Figura 2.16 – Tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) induzida por PTZ 7,5 mmol L⁻¹ para os grupos de peixes previamente expostos ao (a) óleo essencial (OE) (5, 10 e 20 mg L⁻¹), (b) extrato hidroalcoólico (E1) (1, 2 e 3 g L⁻¹) e para o controle positivo clonazepam (CLZ) 0,75 mg L⁻¹ e o efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ). Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão dos experimentos (N = 12 animais por grupo). **p < 0.01 ou *** p < 0.001 vs veículo ou grupo controle. (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn).



Fonte: A autora.

Neste estudo, o clonazepam 0,75 mg L⁻¹ foi utilizado como controle positivo, e como esperado o tempo de latência para a primeira convulsão foi significativamente prolongado em comparação com o grupo controle (p < 0,001). Além disso, o pré-tratamento dos animais com o veículo (1 mL de Tween80 0,5% (v/v) em água declorinada), não apresentou efeitos significativos no tempo de latência para a primeira convulsão quando comparado com o grupo que foi exposto apenas na água declorinada.

Figura 2.17– Tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) induzida por PTZ 7,5 mmol L⁻¹ para os grupos de peixes previamente expostos ao (a) citral (5, 10 e 20 mg L⁻¹), (b) geraniol (5, 10 e 20 mg L⁻¹) e (c) CIT + GER (5 mg L⁻¹) e para o controle positivo clonazepam (CLZ) 0,75 mg L⁻¹ e o efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ). Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão dos experimentos (N = 12 animais por grupo). **p < 0.01 ou *** p < 0.001 vs veículo ou grupo controle. (Kruskal-Wallis teste seguido pelo post hoc teste de Dunn)



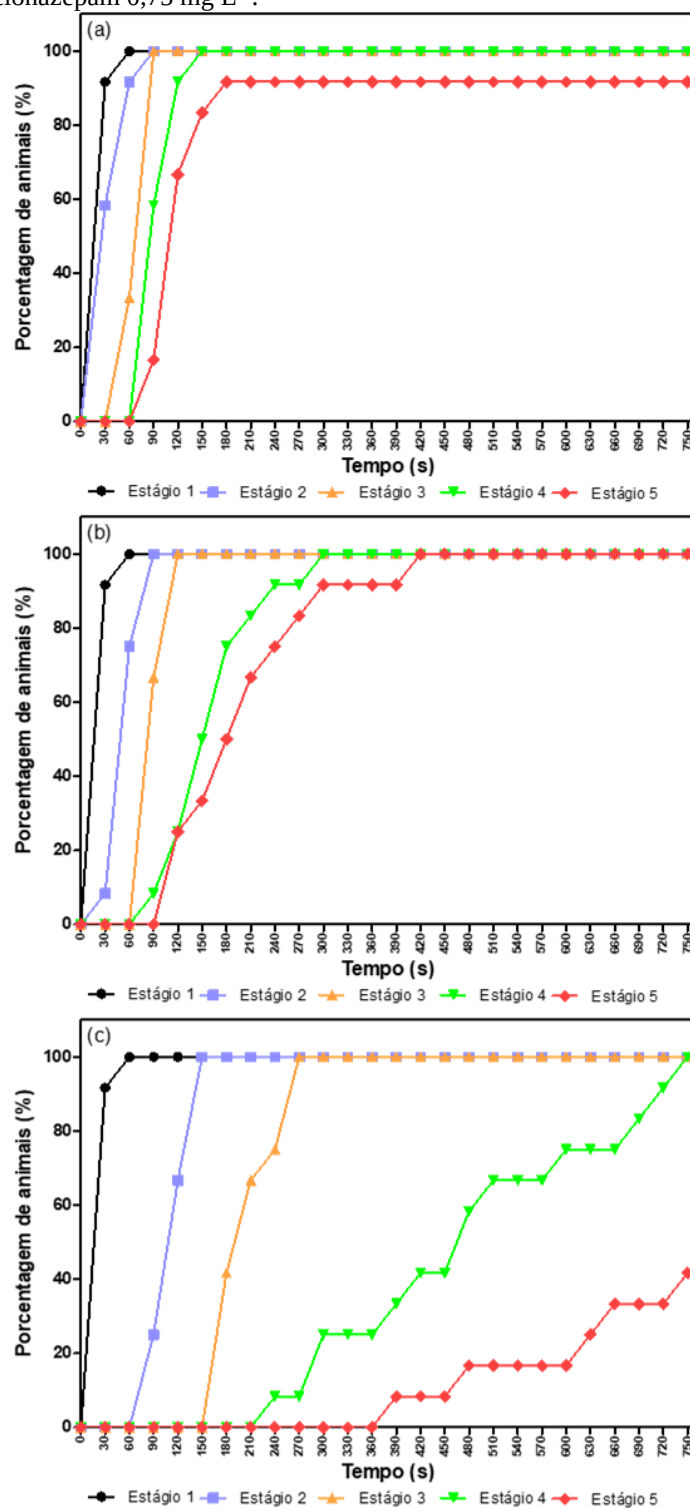
Fonte: A autora.

As Figuras 2.18, 2.19 e 2.20 representam a porcentagem de animais em função do tempo de exposição ao PTZ 7,5 mmol L⁻¹, para a ocorrência dos estágios de convulsão (1 – 5)

para as concentrações das amostras estudadas que aumentaram o tempo de latência para a primeira convulsão. A Figura 2.18a demonstrou que 100% dos animais atingiram o estágio 4 em 120 segundos após a exposição ao PTZ. Entretanto, as convulsões foram atenuadas quando os peixes foram previamente tratados com clonazepam $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ tal que as porcentagens de animais que atingiram os estágios 4 e 5 após 720 e 750 segundos foram de 100% e 42%, respectivamente (Figura 2.18c).

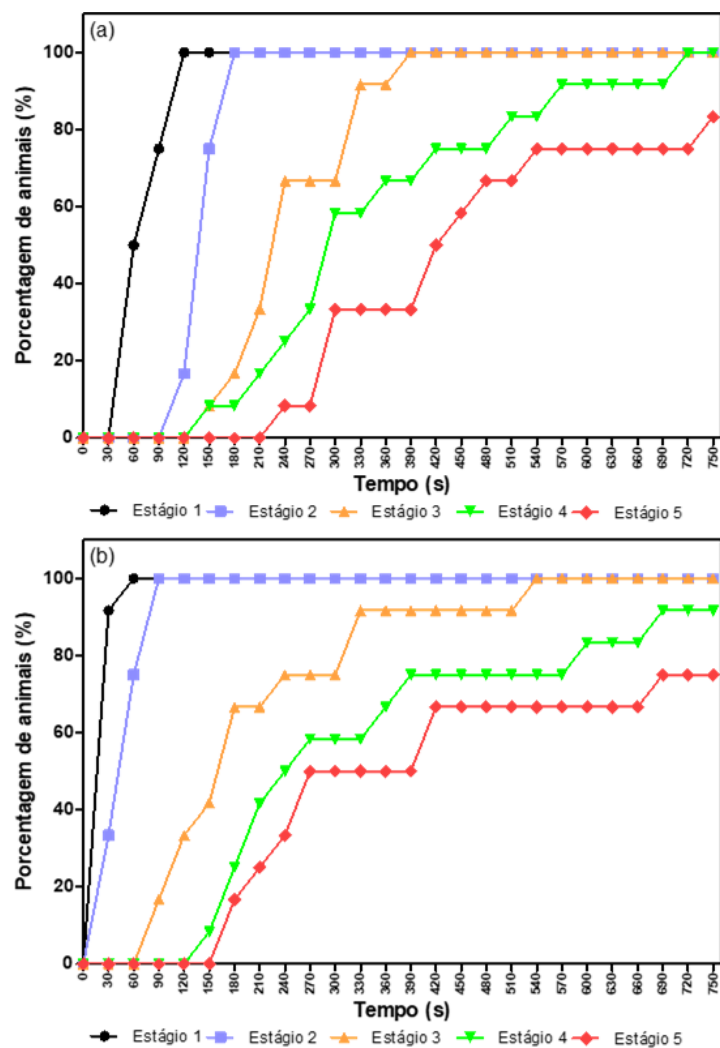
Este comportamento foi semelhante para os grupos de peixes previamente tratados com o óleo essencial (20 mg L^{-1}) (estágio 4: 720 segundos, 100%; estágio 5: 720 segundos, 75%) (Figura 2.19a), extrato hidroalcoólico (3 g L^{-1}) (estágio 4: 690 segundos, 92%; estágio 5: 690 segundos, 75%) (Figura 2.19b), citral (20 mg L^{-1}) (estágio 4: 480 segundos, 100%; estágio 5: 720 segundos, 92%) (Figura 2.20a), geraniol (20 mg L^{-1}) (estágio 4: 630 segundos, 92%; estágio 5: 750 segundos, 60%) (Figura 2.20b) e CIT + GER (5 mg L^{-1}) (estágio 4: 630 segundos, 100%; estágio 5: 660 segundos, 84%) (Figura 2.20c). Desta forma, foi possível observar que o estágio 5 (comportamento semelhante à convulsão tônica) não foi verificado em todos os animais pré-tratados com as amostras (Figuras 2.19 e 2.20).

Figura 2.18 – Porcentagem de animais que atingiram os estágios (1 – 5) em função do tempo. (a) PTZ 7,5 mmol L⁻¹, (b) veículo e (c) clonazepam 0,75 mg L⁻¹.



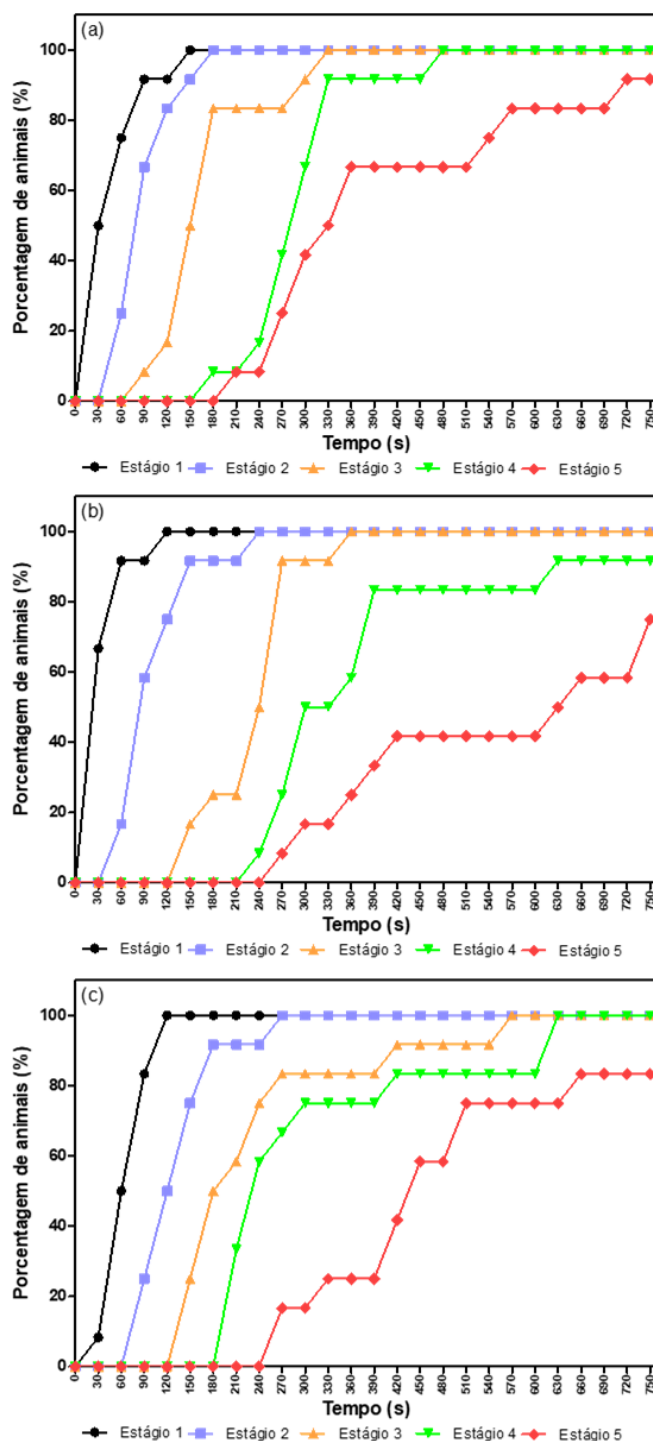
Fonte: A autora.

Figura 2.19 – Porcentagem de animais que atingiram os estágios (1 – 5) em função do tempo previamente tratados com (a) óleo essencial (20 mg L⁻¹) e (b) extrato hidroalcoólico 3 g L⁻¹ e expostos ao PTZ 7,5 mmol L⁻¹ durante 20 minutos.



Fonte: A autora.

Figura 2.20 – Porcentagem de animais que atingiram os estágios (1 – 5) em função do tempo previamente tratados com (a) citral (10 mg L⁻¹), (b) geraniol (10 mg L⁻¹), (c) citral + geraniol (5 mg L⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L⁻¹ durante 20 minutos.



Fonte: A autora.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, em que o óleo essencial de *C. citratus* obtido a partir das folhas secas exibiu efeito anticonvulsivante em convulsões induzidas por PTZ em camundongos [190,192]. Em nosso estudo anterior, foi demonstrado que o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de *C. citratus* eram constituídos por terpenos e polifenóis,

respectivamente [1]. Esses compostos e extratos brutos provenientes de plantas medicinais possuem efeito neuroprotetor e anticonvulsivante em modelos animais de epilepsia induzida por diferentes agentes [289]. Além disso, sabe-se que as plantas aromáticas produzem compostos bioativos que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e modular as alterações neuronais envolvidas nas convulsões e, desta forma, atuar como agentes neuroprotetores [204].

As propriedades anticonvulsivantes do citral e geraniol, que são os principais terpenos presentes no óleo essencial de *C. citratus*, também foram investigadas [1]. Foi possível observar que os grupos de peixes previamente expostos a estes compostos exibiram um aumento na latência para a primeira convulsão (estágio 4) (Figura 2.17). Além disso, esses terpenos também reduziram a porcentagem de animais que atingiram o estágio 5 (Figura 2.20). Portanto, esses resultados podem explicar o efeito anticonvulsivante observado para o óleo essencial de *C. citratus*.

Os resultados observados para o citral e o geraniol também justificam o efeito anticonvulsivante apresentado pelo extrato hidroalcoólico de *C. citratus*. Em nosso estudo anterior foi demonstrado que este extrato além de ser constituído por ácidos fenólicos como o ácido gálico, o ácido clorogênico e ácido rosmarínico, e por flavonoides como a quercetina, luteolina, apigenina e rutina, também era constituído por citral e geraniol [1]. Portanto, a presença de polifenóis, terpenos e o sinergismo entre estes compostos podem justificar os resultados comportamentais para o grupo de animais previamente tratados com o extrato hidroalcoólico.

Foi observado que o tratamento com as concentrações mais baixas para o citral e o geraniol (5 mg L⁻¹) avaliada neste estudo não prolongou o tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4). No entanto, quando o grupo de peixes foi previamente tratado com uma mistura composta por citral (5 mg L⁻¹) e geraniol (5 mg L⁻¹), foi observado um aumento no tempo de latência para a primeira convulsão para este grupo de peixes. Neste sentido, este resultado enfatiza a ideia de que a atividade anticonvulsivante do óleo essencial de *C. citratus* pode ser atribuída a um efeito sinérgico entre seus principais componentes voláteis.

2.4.4 Investigação do envolvimento dos receptores GABA_A no efeito anticonvulsivante de *Cymbopogon citratus*, citral e geraniol

O ácido gama aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório envolvido nos processos epiléticos [176]. Os receptores GABA_A são os canais de proteínas

pentaméricas que possuem sítios para compostos que alteram alostericamente o canal de Cl^- [290]. Além disso, os receptores GABA_A são responsáveis pela transmissão sináptica inibitória do SNC de vertebrados [176].

Para investigar o envolvimento dos receptores GABA_A no efeito anticonvulsivante apresentado pelas amostras estudadas, os grupos de peixes foram primeiramente tratados com flumazenil antes de serem expostos ao óleo essencial, extrato hidroalcoólico, citral e/ou geraniol (Figuras 2.16 e 2.17). O flumazenil é um antagonista dos receptores GABA_A e reverte o efeito anticonvulsivante dos benzodiazepínicos, como o clonazepam. Como esperado, o flumazenil $1,75 \text{ mg L}^{-1}$ bloqueou o efeito anticonvulsivante do clonazepam $0,75 \text{ mg L}^{-1}$, já que houve uma redução no tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4) (Figura 2.16).

Os resultados apresentados nas Figuras 2.16 e 2.17 demonstraram que o pré-tratamento com o flumazenil $1,75 \text{ mg L}^{-1}$ dos animais por 20 minutos, reduziu significativamente o tempo de latência para a primeira convulsão (estágio 4), exibida pelo óleo essencial (20 mg L^{-1}), extrato hidroalcoólico (3 g L^{-1}), citral (20 mg L^{-1}), geraniol (20 mg L^{-1}), e para a mistura citral e geraniol (5 mg L^{-1}), em comparação com aqueles que não foram expostos ao flumazenil. Estes resultados sugeriram o envolvimento dos receptores GABA_A no efeito anticonvulsivante de todas as amostras estudadas. Além disso, estes resultados corroboram os obtidos para o efeito ansiolítico, em que foi verificado o envolvimento destes receptores na ansiólise causada pelas amostras. Os resultados observados também concordaram com Silva e colaboradores [192], em que o efeito anticonvulsivante do óleo essencial foi bloqueado pelo tratamento com flumazenil em camundongos.

2.4.5 Parâmetros bioquímicos

Evidências experimentais demonstraram claramente que um desequilíbrio no estado oxidativo do cérebro é um fator que contribui para a indução e propagação da epilepsia [291]. O cérebro é vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio e alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, que são suscetíveis à peroxidação lipídica [292]. A convulsão induzida por PTZ pode aumentar ainda mais o estresse oxidativo no cérebro, o que altera o metabolismo dos fosfolipídios da membrana e posterior liberação de radicais livres [293].

O estresse oxidativo é o mecanismo mais proeminente no desenvolvimento e progressão da epilepsia e de outras doenças [294]. A atividade convulsiva durante a epilepsia diminui o mecanismo de defesa antioxidante no cérebro e aumenta a produção de radicais livres, o que induz pronunciadamente o desenvolvimento do estresse oxidativo [295]. Na literatura, é

controverso se o estresse oxidativo é uma causa ou consequência da epilepsia, entretanto há uma produção excessiva de EROs que contribui para os danos cerebrais [168,296]. Além disso, a superprodução destas espécies resulta na interrupção gradual da homeostase do Ca^{2+} intracelular, que modula a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica, o que torna os neurônios mais vulneráveis ao estresse e à consequente falha da energia e perda neuronal [296].

Na literatura, é comprovado o efeito neuroprotetor exercido por antioxidantes, devido a um aumento de atividade de enzimas antioxidantes endógenas, níveis aumentados de antioxidantes não-enzimáticos endógenos e marcadores de estresse oxidativo reduzidos em modelos de epilepsia [295]. As células possuem sistemas antioxidantes que as protegem contra o excesso de EROs no organismo, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutatona (GSH) que sequestram os radicais livres [297]. Desta forma, a atividade da enzima CAT e os níveis de marcadores de estresse oxidativo (MDA, NO e GSH) foram avaliados nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de *C. citratus*, e com os compostos isolados citral e/ou geraniol, e posteriormente expostos à solução de PTZ.

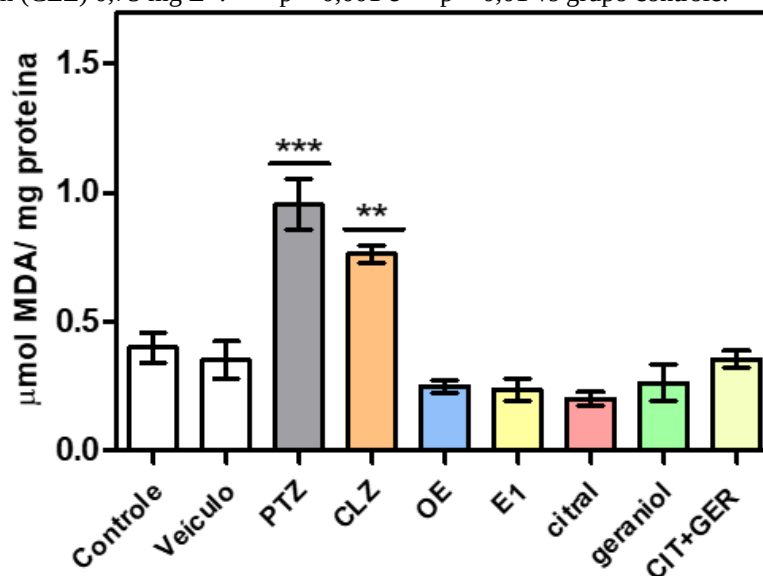
2.4.5.1 Quantificação de MDA nos homogenatos de cérebro

Na literatura foi comprovado que as convulsões induzidas por PTZ ocasionaram um aumento na peroxidação lipídica no cérebro de animais utilizados como modelo de epilepsia [298]. O MDA é um dos produtos finais da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados e seus níveis são uma medida da peroxidação lipídica induzida por radicais livres em amostras de tecido [264]. Os resultados obtidos revelaram que houve um aumento nos níveis de MDA em homogenatos de cérebro do grupo que foi exposto apenas ao PTZ, o que demonstra que houve uma produção de radicais livres durante as convulsões induzidas por PTZ.

No entanto, quando os animais foram previamente tratados com o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de *C. citratus*, citral e/ ou geraniol houve uma redução nos níveis de MDA quando comparado com o grupo apenas exposto ao veículo ou água decolorinada (Figura 2.21), o que sugeriu uma diminuição significativa na peroxidação lipídica dos animais. Estudos revelaram que a *C. citratus* é capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida por diferentes agentes, e essa propriedade está relacionada com a atividade antioxidante desta planta [1,62]. O efeito do óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de *C. citratus*, citral e/ou, geraniol nos níveis de MDA em homogenatos de cérebros dos peixe-zebra é apresentado na Figura 2.21. Foi verificado que o tratamento com PTZ aumentou consideravelmente os níveis de MDA quando

comparado com o grupo controle (ou veículo) ($p < 0,001$). Por outro lado, o pré-tratamento com as amostras de *C. citratus* e os compostos relacionados atenuou significativamente o aumento dos níveis de MDA em comparação com o grupo PTZ (Figura 2.21).

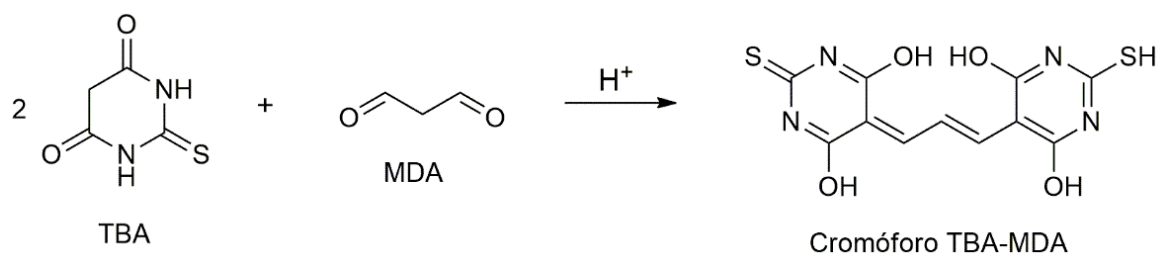
Figura 2.21 – Teor de malondialdeído (MDA) nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L^{-1}) e extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (E1) (3 g L^{-1}), citral (20 mg L^{-1}), geraniol (20 mg L^{-1}), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L^{-1}) e expostos ao PTZ $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e para o controle clonazepam (CLZ) $0,75 \text{ mg L}^{-1}$. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs grupo controle.



Fonte: A autora.

O teor de MDA em homogenatos de tecidos de animais pode ser quantificado a partir da reação com o TBA, que leva à formação de um cromóforo de coloração rosa que absorve a 540 nm . O MDA é um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo [299,300]. A reação entre o TBA e o MDA está apresentada na Figura 2.22.

Figura 2.22 – Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA).



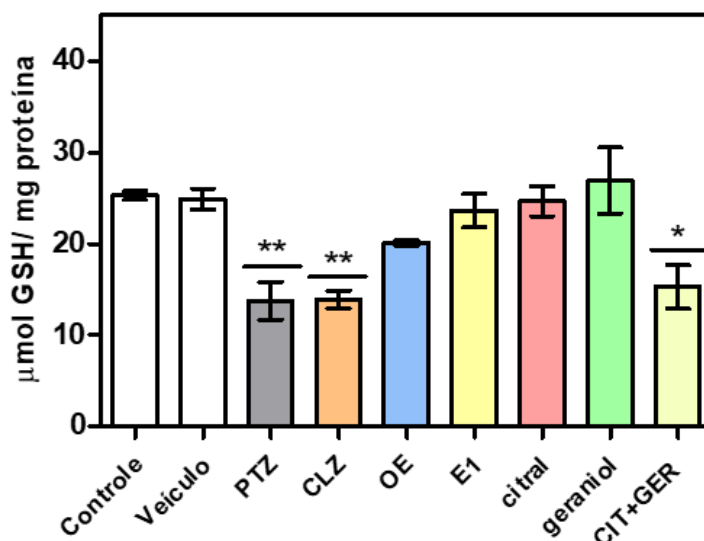
Fonte: A autora.

2.4.5.2 Níveis de GSH nos homogenatos de cérebro

O GSH é um antioxidante endógeno não enzimático que reage com os radicais livres a fim de promover a sua estabilização. Na Figura 2.22 é demonstrado que os níveis de GSH nos homogenatos cerebrais foram significativamente inferiores para o grupo de animais exposto ao PTZ quando comparado com o grupo controle ou veículo ($p < 0,01$), o que sugere que houve um aumento na geração de radicais livres durante as convulsões induzidas por PTZ. A depleção desse composto durante episódios epiléticos pode aumentar o estresse oxidativo, o que aumenta os radicais livres [301]. Por outro lado, o nível de GSH foi restaurado para os grupos de peixes que foram previamente tratados com óleo essencial (20 mg L^{-1}) e extrato hidroalcoólico (3 g L^{-1}) de *C. citratus*, citral (20 mg L^{-1}), geraniol (20 mg L^{-1}) e a mistura citral e geraniol (5 mg L^{-1}), em comparação com o grupo PTZ (Figura 2.23). Desta forma, pode-se inferir que o aumento nos níveis de GSH e a redução nos níveis de MDA para estes grupos seja devido às propriedades antioxidantes das amostras estudadas.

Pode-se destacar que, todas as amostras foram mais eficazes que o clonazepam na redução e elevação dos níveis de MDA e GSH, respectivamente (Figura 2.23). Estudos da literatura demonstraram que as drogas antiepiléticas possuem efeito antioxidante, porém nos processos metabólicos estas drogas podem produzir metabólitos reativos que podem aumentar a formação de EROs. Além disso, um tratamento de longo prazo com antiepiléticos pode elevar a produção de radicais livres nas células neuronais, o que aumenta os danos oxidativos [295]. Portanto, esses dados destacam a importância da descoberta e da investigação de novas moléculas terapêuticas na prevenção de convulsões e com baixos efeitos adversos.

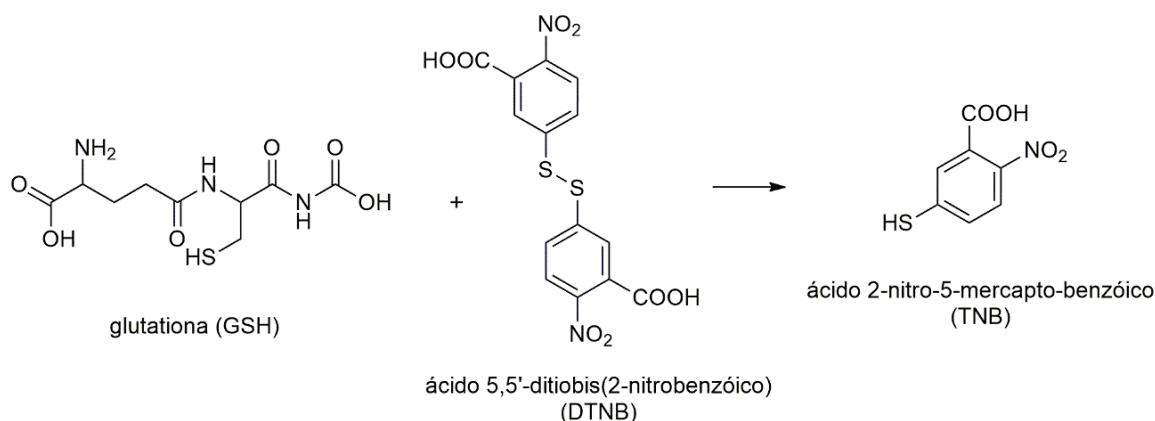
Figura 2.23 – Teor de GSH nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L⁻¹) e extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (E1) (3 g L⁻¹), citral (20 mg L⁻¹), geraniol (20 mg L⁻¹), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L⁻¹ e para o controle clonazepam 0,75 mg L⁻¹. ** p < 0,01 e * p < 0,05 vs grupo controle.



Fonte: A autora.

O método para a determinação de GSH no tecido é baseado na reação de GSH com DTNB (também conhecido como reagente de Ellman), que leva à formação de um cromóforo denominado ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela com absorção a 412 nm (Figura 2.24) [265,302].

Figura 2.24 – Mecanismo de detecção da glutathiona (GSH).



Fonte: A autora.

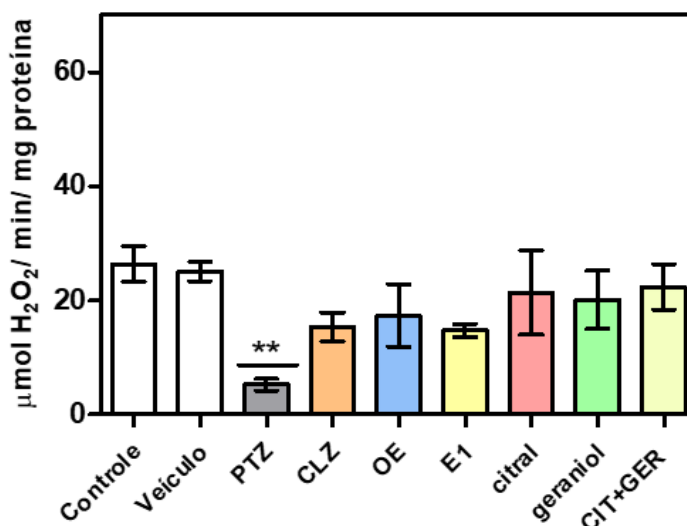
2.4.5.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

Em modelos de convulsão, enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) mostraram proteção em cérebros de animais contra os danos oxidativos [303]. Esta enzima catalisa a

degradação de H_2O_2 a água e oxigênio molecular [266]. Ao realizar esta decomposição, a CAT neutraliza a ação tóxica do H_2O_2 e equilibra a sua produção no organismo.

Estudos demonstraram que a atividade desta enzima é depletada em tecidos cerebrais quando animais são expostos ao PTZ, mas que os antioxidantes podem atenuar esta redução [304]. A Figura 2.25 apresenta os resultados obtidos para a atividade da enzima CAT nos homogenatos de cérebro de peixe. Foi observado que a CAT foi significativamente reduzida no grupo PTZ em comparação com o grupo controle ou veículo ($p < 0,01$). Contudo, o tratamento prévio com o óleo essencial (20 mg L^{-1}) e o extrato hidroalcoólico de *C. citratus* (3 g L^{-1}), citral (20 mg L^{-1}), geraniol (20 mg L^{-1}) e a mistura citral e geraniol (5 mg L^{-1}) restaurou a atividade desta enzima, o que sugere um efeito antioxidante destas amostras.

Figura 2.25 – Atividade da enzima catalase (CAT) nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L^{-1}) e extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (E1) (3 g L^{-1}), citral (20 mg L^{-1}), geraniol (20 mg L^{-1}), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L^{-1}) e expostos ao PTZ $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e para o controle clonazepam $0,75 \text{ mg L}^{-1}$. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ vs grupo controle.



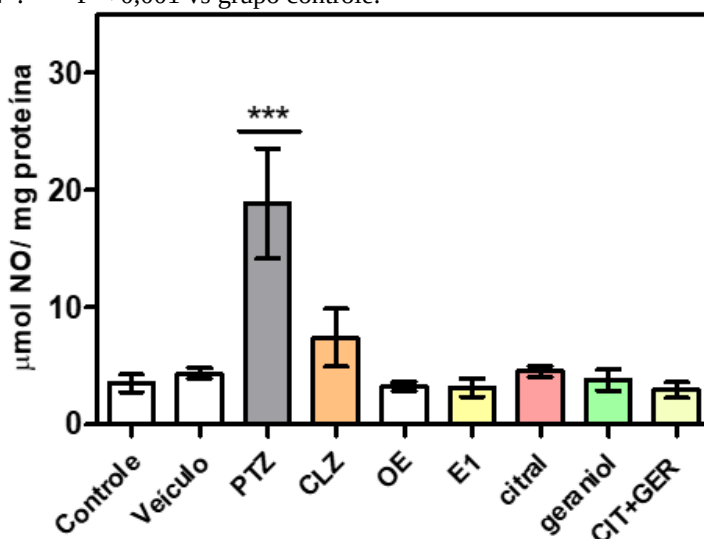
Fonte: A autora.

2.4.5.4 Conteúdo de óxido nítrico nos homogenatos de cérebro

O NO pode reagir com as EROs e gerar ERNs como o peroxinitrito, o qual tem uma alta afinidade aos grupamentos sulfidríla, e pode oxidar os lipídios insaturados e o DNA. A Figura 2.26 demonstra que a exposição ao PTZ aumentou significativamente os níveis de NO para os homogenatos de cérebro do grupo PTZ quando comparado com o grupo controle ou veículo ($p < 0,001$). Estudos revelaram que as convulsões induzidas por PTZ produzem alterações no metabolismo do NO, o que resulta na peroxidação lipídica e induz a atividade epilética [305,306]. Neste estudo, foi observado que o tratamento prévio com o óleo essencial

(20 mg L⁻¹) e o extrato hidroalcoólico (3 g L⁻¹) de *C. citratus*, citral (20 mg L⁻¹), geraniol (20 mg L⁻¹) e a mistura citral e geraniol (5 mg L⁻¹) atenuaram a formação de NO nos homogenatos de cérebro em relação ao grupo PTZ.

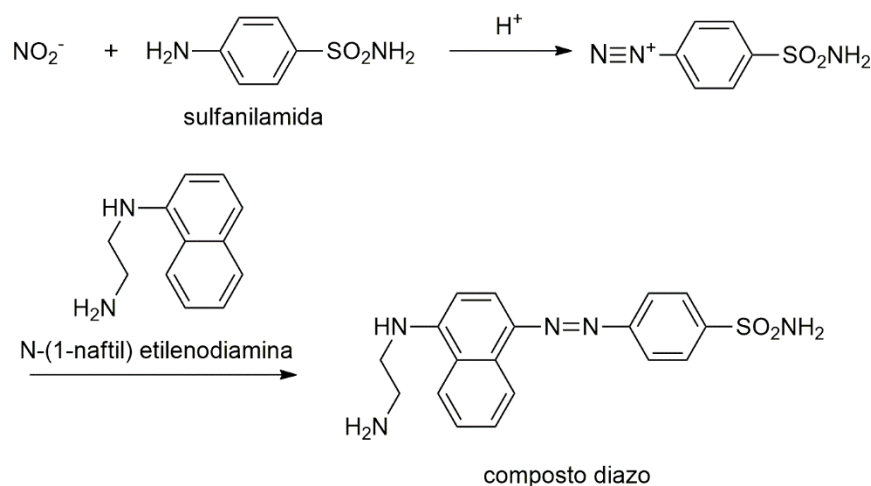
Figura 2.26 – Conteúdo de NO nos homogenatos de cérebro de peixe-zebra previamente tratados com o óleo essencial (OE) (20 mg L⁻¹) e extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (E1) (3 g L⁻¹), citral (20 mg L⁻¹), geraniol (20 mg L⁻¹), citral + geraniol (CIT+GER) (5 mg L⁻¹) e expostos ao PTZ 7,5 mmol L⁻¹ e para o controle clonazepam 0,75 mg L⁻¹. *** P < 0,001 vs grupo controle.



Fonte: A autora.

Na Figura 2.27 estão apresentadas as reações para a detecção indireta de NO em amostras biológicas com o reagente de Griess. Este procedimento envolve a determinação espectrofotométrica de seus produtos de decomposição estáveis (NO₃⁻ e NO₂⁻). Neste método o NO₃⁻ é primeiramente reduzido a NO₂⁻ o qual reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com N-(1-naftil)etilenodiamina, o que gera um composto de coloração vermelho intenso que absorve em 540 nm [267,307].

Figura 2.27 – Reação para detecção de NO.



Fonte: A autora.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste trabalho, foi demonstrado que o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de *C. citratus* apresentaram efeito ansiolítico no teste claro/escuro e anticonvulsivante em convulsões induzidas por PTZ em peixe-zebra. Os principais constituintes do óleo essencial, citral e geraniol, também apresentaram efeitos nestes mesmos modelos. Além disso, quando estes terpenos foram misturados nas menores concentrações avaliadas em cada estudo, foi observado um efeito sinérgico tanto na propriedade ansiolítica quanto anticonvulsivante.

O tratamento prévio dos peixes com o flumazenil durante 20 minutos de exposição bloqueou os efeitos ansiolítico e anticonvulsivante, o que sugeriu o envolvimento dos receptores GABA_A no mecanismo de ação do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *C. citratus*, assim como do citral e geraniol (e em associação).

Todas as amostras estudadas atenuaram a formação de MDA e NO, e restauraram os níveis de CAT e GSH nos homogenatos de cérebro dos peixes-zebra após a exposição ao convulsivante PTZ. Portanto, estes resultados sugeriram que os mecanismos antioxidantes estão envolvidos no efeito neuroprotetor destas amostras. Além disso, observou-se que as amostras de *C. citratus* foram mais eficientes que o clonazepam em restaurar os níveis dos parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo.

Os resultados obtidos indicaram que o peixe-zebra pode ser utilizado como um modelo animal alternativo na investigação das propriedades ansiolítica e anticonvulsivante de amostras de *C. citratus* e compostos relacionados. Além disso, os resultados estão de acordo com o uso etnofarmacológico desta planta medicinal para distúrbios relacionados ao sistema nervoso

central. No entanto, mais estudos são necessários para verificar o envolvimento de outros receptores nas atividades ansiolítica e anticonvulsivante demonstradas por estas amostras. Além disso, o extrato hidroalcoólico será posteriormente explorado para isolar os compostos ativos que podem ser os responsáveis pelos efeitos observados em peixe-zebra.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Cannabis sativa* E DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES POR MEIO DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ELETROQUÍMICOS

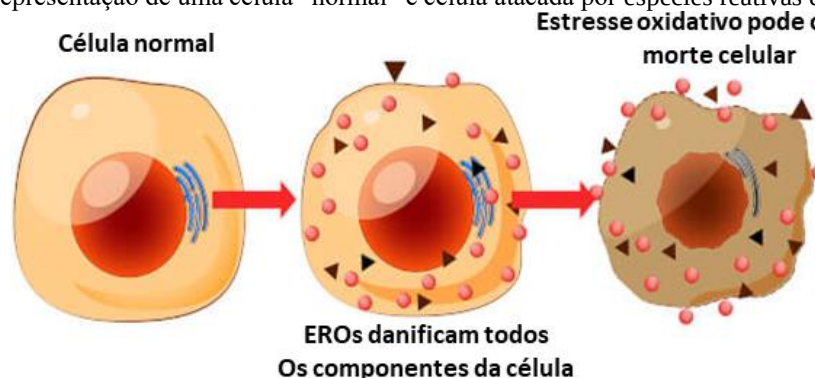
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes

O oxigênio é primordial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia nos seres vivos. A principal via de metabolismo no organismo envolve a redução do oxigênio a água. No entanto, uma parte do oxigênio é metabolizada e leva à geração de outras moléculas [308]. As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas principalmente como resultado do metabolismo aeróbico e exercem um papel fundamental no organismo humano, como o fornecimento de energia, controle da pressão sanguínea, sinalização celular, desintoxicação e função imunológica, quando presentes em concentrações baixa e moderada [309].

No entanto, quando há uma produção excessiva de EROs em relação à capacidade de defesa antioxidante do organismo, manifesta-se o estresse oxidativo, o qual é caracterizado pelo rompimento dos processos normais de sinalização redox da célula, o que conduz a efeitos negativos como a homeostase e a morte celular (Figura 3.1) [308,310]. Este fenômeno contribui substancialmente para o desenvolvimento de várias condições e doenças, como a hipertensão, diabetes, distúrbios neurológicos, doenças pulmonares e câncer [309]. Contudo, os efeitos deletérios destas espécies podem ser combatidos pela ação dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos presentes no organismo humano [311]. Foi reportado que o estresse oxidativo está correlacionado com mais de 100 doenças, seja como a origem ou como o resultado. O estresse oxidativo foi definido como “*um distúrbio no equilíbrio entre pró-oxidante e antioxidante em favor das espécies oxidantes, levando a danos potenciais*”. Portanto, este fenômeno se deve a uma maior produção de radicais livres e a uma atividade reduzida do sistema de defesa antioxidante protetor [312].

Figura 3.1 - Representação de uma célula “normal” e célula atacada por espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptado de [313].

Os radicais livres são espécies químicas altamente reativas, que podem apresentar um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo, e possuem existência independente [314]. A maioria dos radicais possuem vida curta e, desta forma reagem rapidamente com outras moléculas [308]. As EROs podem ser classificadas como espécies radicalares, como por exemplo o radical óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) e alcóxil ($\text{RO}^\bullet$) ou como espécies não-radicalares que incluem uma variedade de substâncias, como o ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos orgânicos (ROOH) e aldeídos (HCOR) [315].

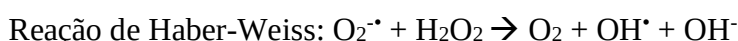
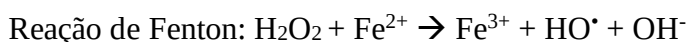
- Radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$): É gerado principalmente nas mitocôndrias, microsomas e peroxissomas, a partir da redução do O_2 . Este radical não apresenta alta reatividade, o que limita a sua difusão na membrana celular. É originado a partir de processos metabólicos ou após a “ativação” do oxigênio por irradiação física. Além disso, é considerado uma ERO primária que interage com outras moléculas para gerar EROs secundárias. Também está envolvido na produção de $\text{HO}^\bullet$ na reação de Haber-Weiss. Contudo, este radical é importante para as células de defesa e na ausência do $\text{O}_2^{\bullet-}$ o organismo fica desprotegido contra as infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. Além disso, pode agir como antioxidante, pois pode reduzir as semiquinonas para que possam retornar às suas atividades metabólicas nas células [315].

- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2): É extremamente deletério, devido a sua participação das reações que produzem o $\text{HO}^\bullet$, como por exemplo a reação de Fenton. Além disso, pode causar danos às células mesmo em concentrações relativamente baixas ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) [310]. O H_2O_2 possui uma meia-vida longa, e, portanto, é capaz de atravessar as camadas lipídicas e reagir com metais de transição, e com a membrana dos eritrócitos [314].

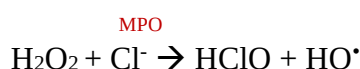
- Radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$): É o radical mais reativo presente nos sistemas biológicos, com meia-vida bastante curta, de aproximadamente 10^{-9} segundos, o que torna difícil o seu sequestro *in vivo* e lhe confere alta afinidade com outras moléculas [310]. O $\text{HO}^\bullet$ é um poderoso

agente oxidante que pode reagir com moléculas orgânicas e inorgânicas das células, como os aminoácidos, proteínas, lipídios, DNA e ácido ribonucleico (RNA). Além disso, pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares e inativar enzimas ao oxidar os grupos sulfidrilas (SH) a pontes dissulfeto (SS) [314].

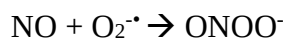
O HO• pode ser gerado a partir da reação de Fenton, reação do H₂O₂ com o íon ferroso (Fe²⁺), ou pela reação de Haber-Weiss, pela interação do H₂O₂ com o O₂•⁻ [310].



- Ácido hipocloroso (HOCl): É uma das EROs mais fortes produzidas pela ativação dos neutrófilos e monócitos. É um forte oxidante com a habilidade de gerar EROs como o HO• e está envolvido em processos inflamatórios e infecciosos que pode causar danos aos tecidos [316,317]. A presença da enzima mieloperoxidase (MPO) leva à produção de HClO devido à interação entre H₂O₂ e cloretos [318], de acordo com a equação abaixo:



- Óxido nítrico (NO): É uma ERN com meia-vida curta devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. É produzido pela oxidação de um dos átomos terminais de nitrogênio da L-arginina. Nesta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase a L-arginina é convertida a óxido nítrico e L-citrulina. O NO pode reagir com algumas EROs, como o H₂O₂ e HClO, para produzir moléculas como o N₂O₃, NO₂ e NO₃. Ainda, o NO pode reagir com o O₂•⁻ e produzir peroxinitrito (ONOO⁻) [310].



A forma protonada do peroxinitrito (ONOOH) é um poderoso agente oxidante que pode causar a depleção de grupos SH e a oxidação de moléculas de forma semelhante ao HO•. Além disso, causa danos ao DNA, oxidação de proteínas e a nitração de resíduos de aminoácidos em proteínas [310].

A produção contínua de EROs no organismo pode resultar em danos oxidativos aos componentes celulares e em alterações das suas funções [315]. Dentre os alvos biológicos mais susceptíveis, pode-se destacar a membrana lipídica, as proteínas e o DNA [310]. As membranas

celulares são altamente vulneráveis à oxidação, devido às altas concentrações de ácidos graxos [311]. As proteínas presentes nas membranas também são alvos para as EROs, principalmente aquelas que contêm grupos sulfidríla (SH), os quais são oxidados após a interação com o H_2O_2 , levando a perda da atividade enzimática e alteração nas funções celulares [315]. Além disso, também pode ocasionar modificações permanentes na estrutura do DNA, acarretar na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento [311].

Antioxidantes são compostos que, quando presentes em baixa concentração quando comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne a oxidação do mesmo [308]. Estes compostos podem retardar ou inibir a oxidação de lipídeos e outras moléculas, a fim de evitar a propagação de reações de oxidação em cadeia [310]. Desta forma, compostos com propriedades antioxidantes apresentam diversas propriedades terapêuticas, já que podem neutralizar EROs e radicais livres produzidos pelo organismo [319]. A função dos antioxidantes implica na redução do estresse oxidativo, de mutações do DNA e dos danos celulares [312].

O excesso de radicais livres pode ser combatido pelos antioxidantes já presentes no organismo, como os enzimáticos catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), ou os não-enzimáticos como a glutathiona reduzida (GSH). Além destes antioxidantes, o organismo também utiliza aqueles obtidos da dieta, como as vitaminas A e C e os polifenóis [320]. Estudos sugerem que um alto consumo de alimentos ricos em compostos com propriedades antioxidantes pode levar a um aumento na atividade antioxidante do plasma e reduzir o risco de desenvolvimento de algumas doenças, as quais são consequências dos danos causados pelo excesso de EROs no organismo [310]. Assim, os antioxidantes podem contribuir significativamente no sentido de reduzir a incidência de doenças que estão relacionadas às reações oxidativas, tais como as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes, hipertensão e câncer. Os antioxidantes exógenos podem melhorar a capacidade do organismo para conter o estresse oxidativo, que não pôde ser corrigido pela intervenção das defesas antioxidantes endógenas [319].

Os antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, de forma a evitar o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação [37]. Além disso, os antioxidantes quelantes podem complexar os íons metálicos como o cobre e ferro, visto que estes catalisam a oxidação lipídica. Os pares de elétrons presentes nas suas estruturas químicas podem promover esta complexação [308]. O desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende de alguns fatores como o tipo de radicais livres formados e a dose ideal para se obter a proteção, pois é possível que um antioxidante atue como

protetor em um sistema, porém não seja eficaz na proteção ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas e tecidos [311].

As plantas medicinais são conhecidas por apresentarem uma variedade de compostos bioativos com ação antioxidante. Neste sentido, estudos relacionados a estes compostos e outros compostos naturais tornam-se interessantes dada a crescente relevância do tema.

3.1.2 *Cannabis sativa* L.

A *Cannabis sativa* L. (*C. sativa*) (Figura 3.2) é uma planta herbácea, popularmente conhecida como maconha e pertence à família *Cannabaceae*. É cultivada principalmente na Ásia Central (Índia e China) e é classificada como ilegal em diversos países [321]. O uso medicinal desta planta é reportado a cerca de 5.000 anos atrás, em que era prescrita para fadiga, reumatismo e tratamento da malária [322]. Além disso, os médicos chineses utilizavam as sementes no tratamento de doenças inflamatórias devido à presença de óleos vegetais e proteínas [323]. O caule da planta contém fibras que são conhecidas como cânhamo, que são importantes industrialmente na produção de tecido e papel [324,325]. Entretanto, apesar de apresentar várias propriedades terapêuticas já comprovadas cientificamente e possuir amplo uso pelas indústrias, a *C. sativa* é historicamente a droga ilícita mais consumida no mundo [323].

Figura 3.2 – *Cannabis sativa* L.



Fonte: [326].

A *C. sativa* tem sido utilizada ao longo dos séculos como fonte de fibras e óleo, e também para fins recreativos, religiosos e terapêuticos [323]. Embora a utilização desta planta

seja proibida em muitos países devido às suas propriedades psicoativas, ela tem atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas, devido às suas interessantes propriedades farmacológicas e por exercer efeitos fisiológicos e comportamentais nos seres humanos [325,327].

É uma herbácea anual dióica (flores macho e fêmea presentes em plantas separadas) e, em casos raros, pode ser monóica (flores de ambos os sexos estão em uma única planta), com caules eretos que podem atingir até 5 metros [328]. Alguns estudos relataram que as plantas do gênero *Cannabis* eram classificadas como *C. sativa* independente da sua origem [323]. Contudo, recentemente foi indicado que a *Cannabis indica*, *Cannabis ruderalis* e a *Cannabis afghanica* podem ser classificadas como subespécies da *C. sativa*, pois apresentam características distintas, como coloração, tamanho, número de inflorescências, teor de tetrahydrocannabinol (THC) e outros canabinóides [328].

As flores masculinas (Figura 3.3a) não apresentam pétalas, panículas axilares ou terminais, e possuem cinco tépalas amarelas e cinco anteras. Entretanto, as flores femininas (Figura 3.3b) germinam nas axilas e terminalmente com um único perianto ovulado estreitamente aderente [328]. Além disso, a *C. sativa* é rica em tricomas, as quais são protuberâncias glandulares epidérmicas que cobrem as folhas, brácteas e caules da planta [323,328]. O grau de ramificação e a altura da planta depende de fatores hereditários, ambientais e da forma de cultivo [323].

Figura 3.3 – Flores de *Cannabis sativa* L. (a) masculina e (b) feminina.



Fonte: [323].

É bem conhecido que o uso recreativo da *C. sativa* se deve principalmente ao seu efeito euforizante e relaxante que pode levar a dependência [321]. Entretanto, estudos da literatura

comprovaram que esta planta é eficaz no tratamento de doenças em humanos, devido à complexidade dos constituintes químicos presentes [329,330].

Foi demonstrado que a *C. sativa* pode ser eficiente no tratamento de alguns tipos de cânceres, como o de mama, cervical, cólon e gástrico [331]. Além disso, também proporciona o alívio de uma série de sintomas relacionadas a esta doença, como dor, náusea, depressão e a perda de apetite [331,332]. Esta planta também se mostrou promissora no tratamento de distúrbios gastrointestinais, diabetes, distúrbios do sono, doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, depressão, ansiedade, esclerose-múltipla e diabetes [174,323,333,334]. Os extratos e o óleo essencial da *C. sativa* também possuem propriedades analgésica, anti-inflamatória [335], antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, antiviral e antioxidante em estudos *in vitro* e *in vivo* [336–339].

Estudos clínicos e pré-clínicos comprovaram que a *C. sativa* pode exercer tanto efeitos ansiolítico quanto ansiogênico, o que depende da concentração dos canabinóides presentes em seus extratos brutos [340]. Foi relatado que a planta constituída principalmente por THC como composto majoritário pode atuar como ansiogênica, e ser ineficaz no tratamento dos transtornos de ansiedade. Entretanto, em baixas doses, foi observado que o THC pode exercer efeito ansiolítico. Além disso, estudos comprovaram o efeito ansiolítico exercido pelo canabidiol (CBD) tanto em diferentes modelos animais quanto em seres humanos [341].

A *C. sativa* também se mostrou ser eficaz no tratamento de transtornos epiléticos [327,342,343]. Por exemplo, Williams e Stephens [327] demonstraram que o CBD reduziu o número de convulsões, assim como a sua intensidade induzidas por diferentes agentes convulsivantes (PTZ, pilocarpina e penicilina), em um modelo *in vivo* de crise generalizada [343,344]. Em outro estudo, o CBD administrado por via intraperitoneal, apresentou efeito anticonvulsivante em modelos de crise máxima induzida por eletrochoque em ratos e camundongos [344].

Recentemente, devido à crise sanitária mundial causada pela doença do novo coronavírus 2019 (COVID-19), evidências científicas demonstraram que a *C. sativa*, assim como os canabinóides, podem ser eficazes no tratamento desta doença. Em um estudo preliminar realizado por Wang e colaboradores [345], foi observado que os extratos com elevado teor de CBD regularam negativamente os níveis de ECAII (enzima conversora de angiotensina 2) e TMPRSS2 (serina protease transmembranar 2), as quais são importantes vias de infecção do coronavírus. Em um modelo animal, foi observado que canabinóides apresentaram potencial para serem empregados no tratamento de infecções virais das vias aéreas [346].

Atualmente, estão disponíveis medicamentos orais à base de canabinóides, aprovados em alguns países europeus para o tratamento de algumas patologias [347]. O Epidiolex® é um óleo predominantemente constituído por CBD, que pode ser utilizado no tratamento da epilepsia refratária em crianças (síndrome de Dravet e síndrome de Lennox-Gastaut) [327,348]. Outro exemplo é o medicamento Sativex® constituído por uma mistura (1:1) de THC e CBD que pode ser utilizado para aliviar a rigidez muscular e a dor neuropática na esclerose múltipla. Também há outros análogos sintéticos do THC como o dronabinol (Marinol®) e nabilona (Cesamet®) para o controle de náuseas e vômitos em pacientes oncológicos que não respondem aos antieméticos convencionais [348,349].

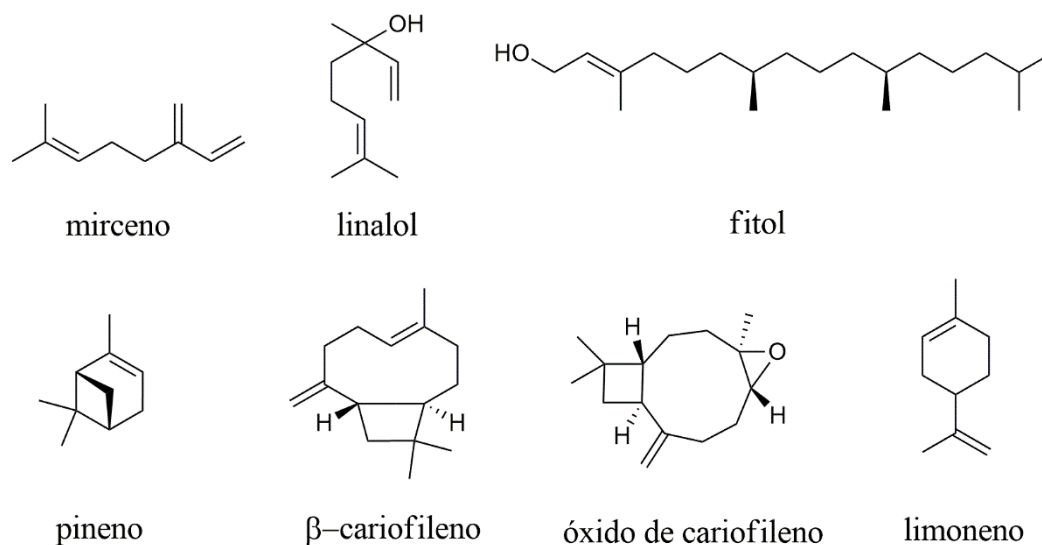
Portanto, as interessantes propriedades farmacológicas apresentadas por esta planta estão relacionadas à presença de compostos psicoativos e fisiologicamente ativos na sua composição química, principalmente os canabinóides que estão presentes exclusivamente nas espécies de *Cannabis* [350–352].

3.1.3 Composição química da *Cannabis sativa* L.

A composição química da *C. sativa* é bastante complexa e 538 compostos bioativos já foram identificados na planta [323,352]. Embora os canabinóides sejam os constituintes químicos mais abundantes presentes nas espécies de *Cannabis*, outros compostos pertencentes à diferentes classes, como os terpenóides, compostos fenólicos, flavonoides, açúcares, alcaloides, esteroides e compostos nitrogenados, estão presentes [321,348,351,352].

Na literatura é relatado que 200 terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) foram identificados nas flores e folhas da *C. sativa* [353]. Na Figura 3.4, estão apresentadas as estruturas químicas dos principais terpenos identificados na planta. O limoneno, o mirceno e o pineno são os mais abundantes e representam aproximadamente 10% do conteúdo dos tricomas [323,339]. Estes compostos desempenham várias funções importantes, como a defesa contra herbívoros e patógenos, além de serem os responsáveis pelo aroma característico da planta [354]. Além disso, possuem interessantes propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticonvulsivante e ansiolítica [355].

Figura 3.4 – Estrutura química dos principais terpenos identificados na *Cannabis sativa* L.

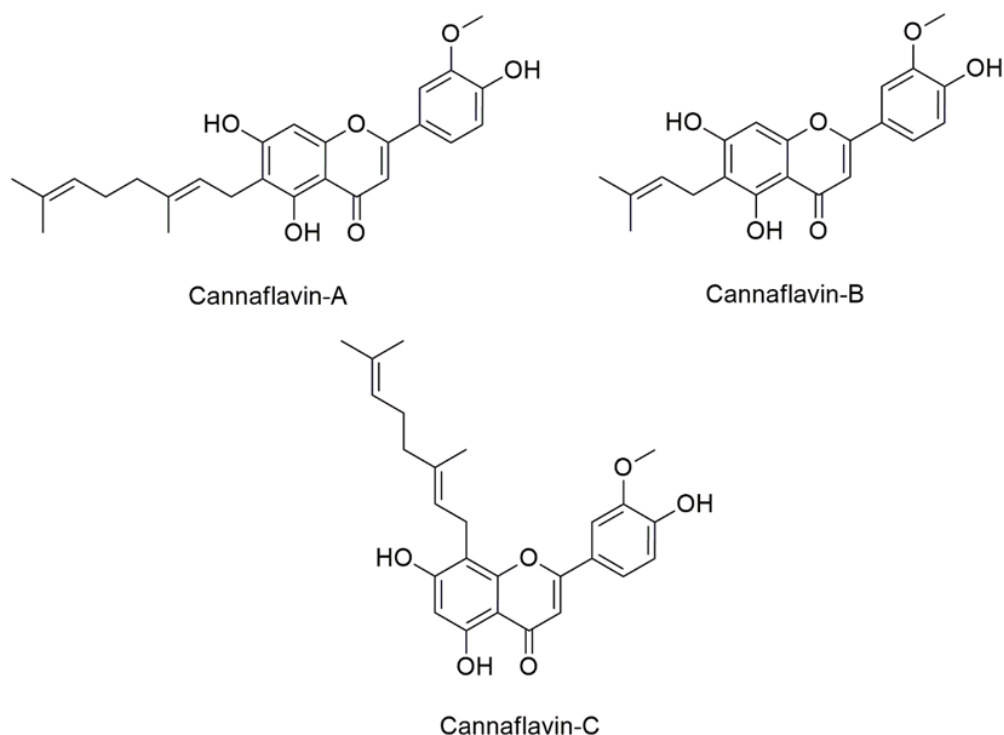


Fonte: A autora.

Estudos reportaram a presença de 26 flavonoides na *C. sativa*, como a apigenina, vitexina, isovitexina, luteolina, quercetina e kaempferol [352]. Além disso, podem ser destacados os flavonoides agliconas, como a cannaflavin-A (geranilflavona), cannaflavin-B (prenil flavona) e cannaflavin-C [350,356], presentes exclusivamente nas espécies de *Cannabis* (Figura 3.5). Estudos pré-clínicos comprovaram a atividade anti-inflamatória, antioxidante e anticâncer destes compostos, e também a eficácia no tratamento de doenças neurodegenerativas e infecciosas [350].

Os flavonoides estão presentes nas folhas, raízes, inflorescências e no caule [357], porém a sua distribuição pode variar com a parte da planta [358]. Por exemplo, a quercetina está presente em maiores concentrações nas flores das espécies masculina, enquanto o kaempferol pode ser detectado nas folhas das espécies femininas de *C. sativa* [352].

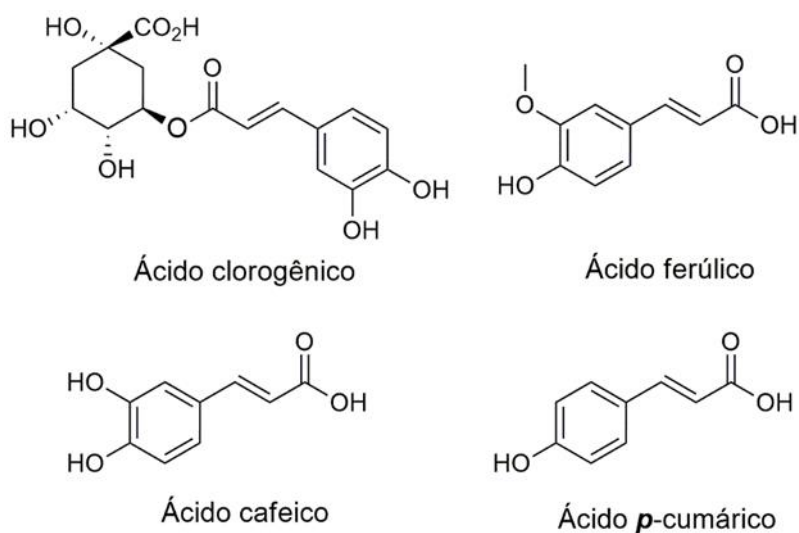
Figura 3.5 – Estrutura química dos flavonoides agliconas presentes nas espécies de *Cannabis* L.



Fonte: A autora.

Além dos flavonoides, também é reportada a presença de ácidos fenólicos na *C. sativa* [359]. No estudo realizado por Izzo e colaboradores [359], foram identificados alguns ácidos hidroxicinâmicos no extrato metanólico, como os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico e *p*-cumárico. As estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos identificados na planta estão apresentadas na Figura 3.6.

Figura 3.6 – Estrutura química dos principais ácidos derivados do ácido hidroxicinâmico na *Cannabis sativa* L.



Fonte: A autora.

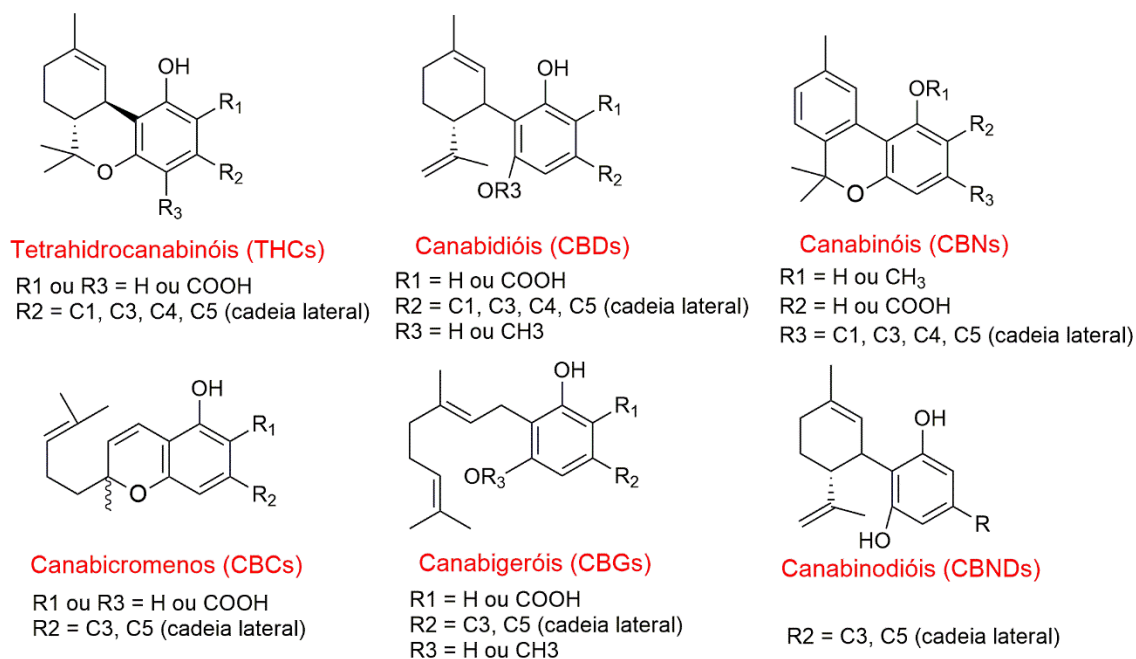
Além dos canabinóides e dos compostos fenólicos, estilbenóides, vitaminas, proteínas, carboidratos, esteróides, enzimas, glicoproteínas, hidrocarbonetos e compostos nitrogenados também foram identificados na *C. sativa* [323,360].

3.1.4 Canabinóides

Os canabinóides estão presentes principalmente na resina secretada pelos tricomas glandulares das espécies femininas de *Cannabis*. Não obstante, as folhas das espécies masculinas possuem um número reduzido destas estruturas e, portanto, produzem pequenas quantidades destas moléculas [323]. Os efeitos biológicos destas moléculas nos seres humanos estão associados às diferentes interações destes compostos com o sistema canabinóide. A variação do grupo *n*-pentil nestas moléculas pode ocasionar grandes variações na afinidade e seletividade para os receptores canabinóides, assim como no seu potencial farmacológico [361]. Desta forma, estes compostos são os principais responsáveis pelas diversas propriedades farmacológicas e psicoativas exibidas pelas espécies de *Cannabis* [360,362]

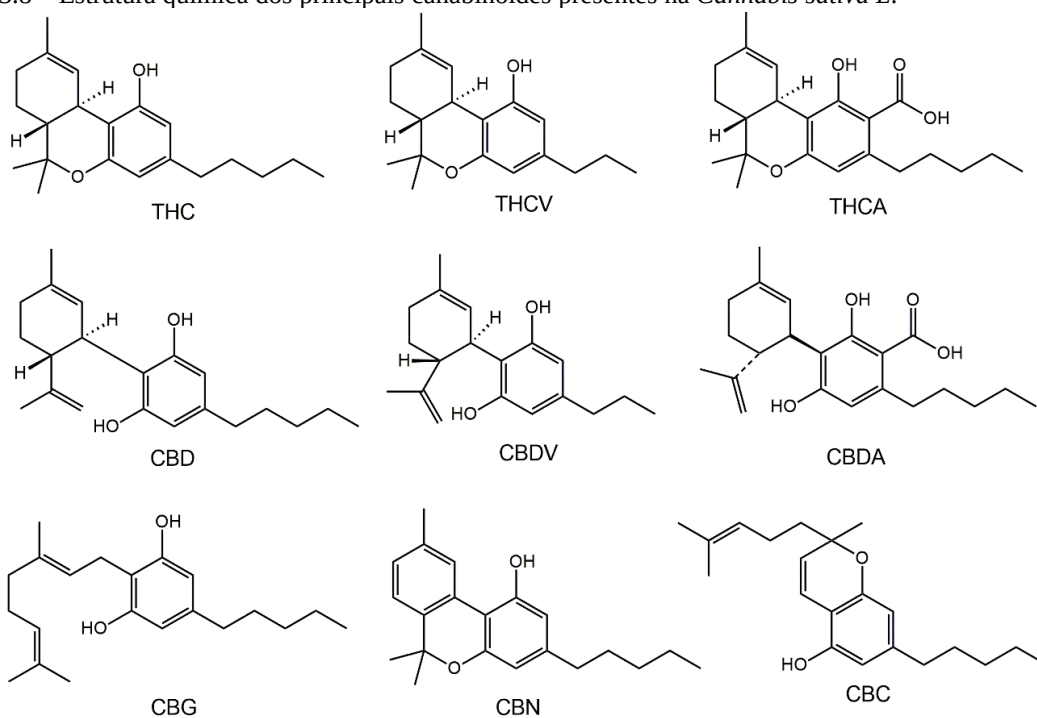
Os canabinóides são classificados como neutros (sem grupo carboxila) e ácidos (com grupo carboxila), e 120 compostos originários desta classe já foram identificados nas espécies de *Cannabis* [353,360]. Porém, na *C. sativa*, os principais canabinóides são derivados de tetrahydrocannabinóis (THCs), canabidióis (CBDs), canabinóis (CBNs), canabigeróis (CBGs), canabicromenos (CBCs) e canabinodióis (CBNDs) [323,361] (Figura 3.7). De maneira geral, estes compostos possuem 21 átomos de carbono, contudo podem haver algumas variações na cadeia lateral ligada ao anel aromático [361]. Na Figura 3.8 estão apresentadas as estruturas químicas dos principais canabinóides identificados na *C. sativa*: tetrahydrocannabinol (THC), tetrahydrocannabivarina (THCV), ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), canabidiol (CBD), canabidivarina (CBDV), ácido canabidiólico (CBDA), canabigerol (CBG), canabinol (CBN) e canabicromeno (CBC).

Figura 3.7 – Estrutura química dos derivados canabinóides presentes na *Cannabis sativa* L.



Fonte: Adaptado de [361].

Figura 3.8 – Estrutura química dos principais canabinóides presentes na *Cannabis sativa* L.



Fonte: A autora.

O conteúdo de canabinóides na *C. sativa* é influenciado por condições ambientais e geográficas, como a umidade, temperatura, radiação, nutrientes presentes no solo e a presença de parasitas [363,364]. A temperatura tem um papel fundamental na produção de canabinóides na planta [365]. Além disso, foi reportado que uma exposição à alta radiação ultravioleta produz

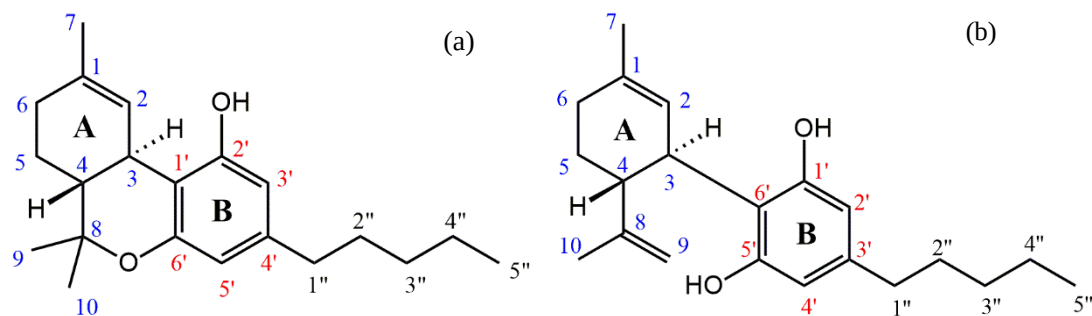
quantidades significativamente maiores de THC nas plantas comparadas com aquelas que não foram submetidas à esta exposição [366].

Os efeitos farmacológicos exercidos por plantas medicinais se devem também ao sinergismo ou interações entre os compostos bioativos e outros nutrientes presentes e não apenas à ação de um único composto [323,360]. Neste sentido, os efeitos terapêuticos em humanos da *C. sativa* também estão relacionados às interações entre os canabinóides e os demais fitoquímicos presentes na sua composição química [358]. Por exemplo, em um estudo realizado por Smith e colaboradores [367] foi demonstrado que os terpenos alteraram a farmacocinética do THC devido à um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Em outro estudo, os terpenos modularam a afinidade do THC pelo receptor CB1, o que ocasionou um maior efeito analgésico e psicótico mediados por este canabinóides [368]. Outros compostos não-canabinóides podem reduzir os efeitos colaterais, como os sintomas de disforia, ansiedade, reações de pânico e paranoia, causados pelo THC. Por exemplo, foi observado que extratos brutos da *C. sativa* exibiram menos efeitos colaterais em estudos farmacológicos em animais quando comparados com o THC isolado [360,368].

3.1.5 Tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD)

O tetrahydrocannabinol (THC) (Figura 3.9a) é um composto cristalino, o de maior potencial psicoativo presente na *C. sativa* [323]. O THC interage com os receptores canabinóides (CB1 e CB2) no cérebro, os quais pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, e produzem uma variedade de efeitos fisiológicos [348]. Já o canabidiol (CBD) (Figura 3.9b) não possui propriedades psicoativas, porém, exerce uma variedade de efeitos farmacológicos benéficos aos seres humanos [349]. Foi demonstrada a eficácia deste composto no tratamento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, cancerígenas e metabólicas, as quais são acompanhadas pelo estresse oxidativo e inflamação [348,369,370]. Ainda, este canabinóide se mostrou eficaz no tratamento de distúrbios neurológicos, como a depressão e distúrbios de ansiedade [371].

Figura 3.9 – Estrutura química do (a) tetrahydrocannabinol e (b) canabidiol.



Fonte: A autora.

O CBD possui uma estrutura química semelhante ao THC (Figura 3.9), no entanto, ambos diferem quanto à conformação espacial, o que justifica as diferenças entre as propriedades farmacológicas apresentadas por estes canabinóides [372]. O THC possui uma estrutura relativamente plana, devido à presença de três anéis (fenol, pirano e ciclohexeno) em sua estrutura química, que lhe confere a característica de molécula rígida e permitir a sua ligação aos receptores CB1 e CB2 [349]. Já o CBD possui uma estrutura ligeiramente angular, a qual produz um impedimento estérico, e dificulta a capacidade deste composto em se ligar ao receptor CB1 [372]. Desta forma, como consequência desta diferença estrutural, o CBD exibe menos afinidade para este receptor, o que justifica o efeito psicoativo exercido pelo THC [372].

O CBD contém um anel ciclohexeno (A), um anel fenólico (B), e uma cadeia lateral *n*-pentil em sua estrutura química (Figura 3.9). Pode-se observar que os dois anéis estão localizados em planos quase perpendiculares entre si [349]. A atividade química do CBD pode ser justificada principalmente devido à localização dos grupos hidroxila (OH) no anel fenólico nas posições C-1' e C-5' (B), e devido ao grupo metil (CH₃) na posição C-1 do anel ciclohexeno (A) e a cadeia pentil no C-3' do anel fenólico (B) [373]. Devido à presença dos grupos OH no C-1' e C-5' (B), o CBD também pode se ligar a aminoácidos como a treonina, tirosina e glutamina por meio de ligações de hidrogênio [374,375].

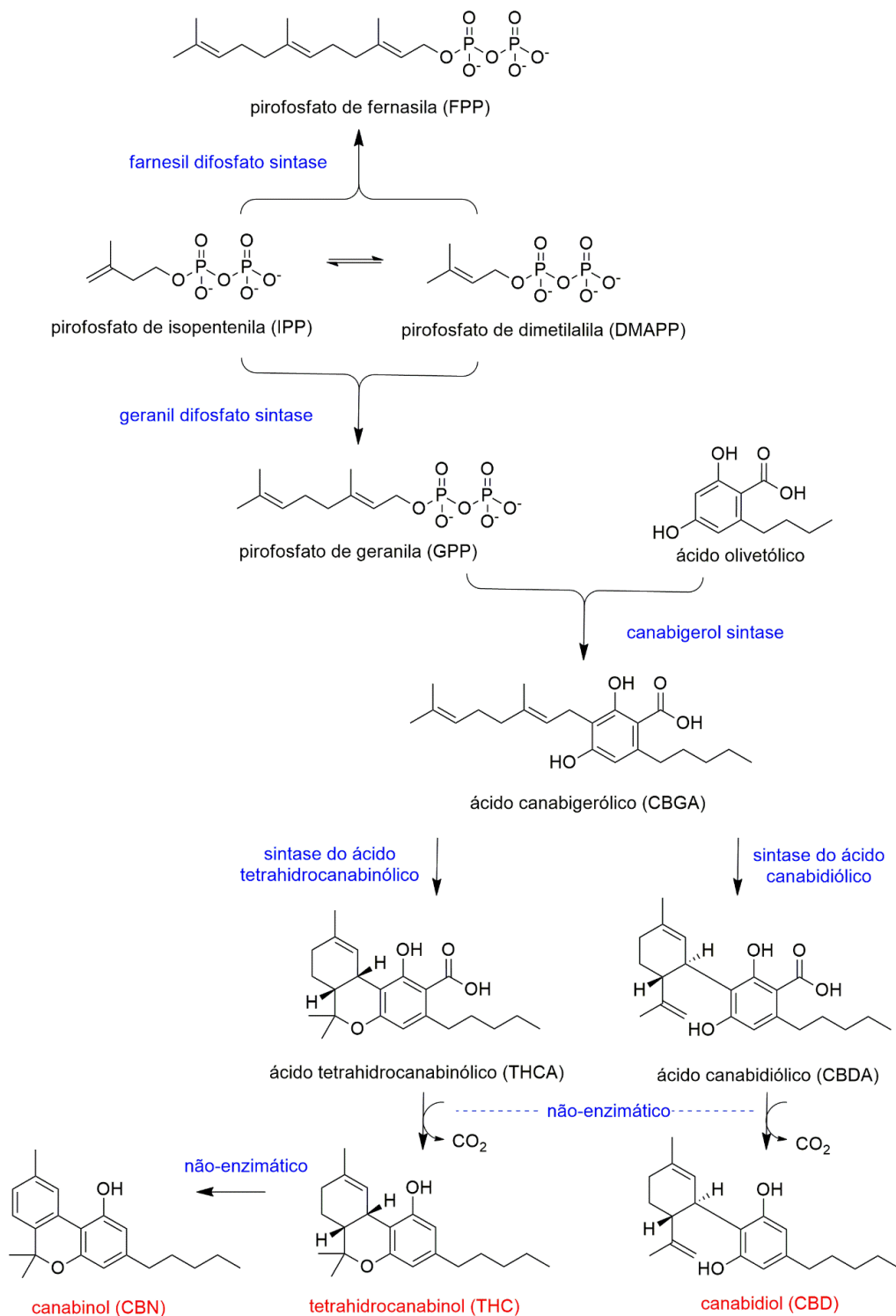
Estudos da literatura já comprovaram que a proporção entre o CBD e o THC na *C. sativa* é importante para o tratamento de algumas doenças [376,377]. Desta forma, a partir da proporção entre estes canabinóides em uma determinada mistura, é possível obter as dosagens para pacientes específicos [376]. Foi comprovado que o CBD na presença do THC em concentrações nanomolares pode antagonizar o CB1, o que justifica as suas propriedades regulatórias nos efeitos adversos (euforia, náusea, diminuição da coordenação motora, taquicardia, e alteração do pensamento abstrato) causados pelo THC [377]. Por exemplo, foi

reportado que o CBD isolado não alterou a atividade locomotora, temperatura corporal ou a memória de camundongos. Contudo, altas doses deste composto podem potencializar as doses mais baixas do THC, devido a um aumento no nível de expressão do CB1 no hipocampo e hipotálamo. Ou seja, o CBD potencializa os efeitos farmacológicos do THC por meio de um mecanismo dependente do CB1 [378]. Outro estudo demonstrou que o CBD potencializou os efeitos antinociceptivos do THC, quando administrado em uma proporção de CBD:THC (10:1), mas nenhuma influência foi observada quando foi utilizada uma dose 10 vezes maior de THC [379]. Ainda, Klein e colaboradores [380] demonstraram que o CBD potencializou o efeito ansiogênico do THC (proporção 1:1) em ratos no teste de campo aberto e no labirinto em cruz elevado.

3.1.6 Biossíntese de canabinóides nas espécies de *Cannabis*

Todos os canabinóides são biossintetizados na *C. sativa* e ficam acumulados na planta na sua forma ácida, a qual é descarboxilada [323]. Estas reações ocorrem espontaneamente nos tecidos da planta, porém este processo pode ser acelerado por meio da exposição à luz e calor. Os canabinóides são sintetizados por vias metabólicas que partem do difosfato de farnesila para produzir o difosfato de geranila, o qual é condensado com o ácido olivetólico, em uma reação catalisada pela enzima sintase canabigerólica. A partir do produto de ácido canabigerólico, vários fitocanabinóides são gerados [353]. Na Figura 3.10 está apresentada a biossíntese de fitocanabinóides (CBD e THC) nas plantas. O difosfato de geranila e o ácido olivetólico (principal precursor de canabinóides) são convertidos por uma sintase em ácido canabigerólico (CBGA), precursor central de ácido tetrahydrocanabinólico (THCA) e ácido canabidiólico (CBDA), que contém uma cadeia lateral de n-pentila (C5-fitocanabinóides). A partir da descarboxilação (exposição à luz ou temperatura) desses precursores, são originados o THC e o CBD. O THC é transformado em canabinol (CBN) por meio de uma aromatização oxidativa e o CBN, por sua vez, pode ser fotoquimicamente rearranjado no catecol, canabinodiol (CBND) [353].

Figura 3.10 – Biossíntese dos canabinóides na *Cannabis sativa* L.



Fonte: Adaptado de [353].

A extração de canabinóides das espécies de *Cannabis* pode ser realizada de maneira eficaz a partir de métodos descritos na literatura [381]. Sabe-se que a escolha da técnica de extração desempenha um papel fundamental na obtenção de compostos bioativos de plantas e, consequentemente, nas propriedades farmacológicas desempenhadas por extratos brutos [366].

Estas técnicas são classificadas como tradicionais, como a extração por solvente e a prensagem a frio, e inovadoras, como a extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração por líquido pressurizado e extração por fluido supercrítico. Um protocolo de extração deve ser simples, seletivo e reprodutível além de preservar as propriedades biológicas e terapêuticas da planta [381].

A extração sólido-líquido é uma das formas de extração mais empregadas para a obtenção de canabinóides da *C. sativa*. Esta técnica envolve o uso de um solvente apropriado baseado na polaridade que possua afinidade química com o canabinóide. Estudos demonstraram que o etanol possui uma alta eficiência na extração destes compostos [366,382]. Outros solventes, como o metanol, clorofórmio, acetato de etila e hexano sozinhos, ou em combinação com outros solventes, também foram eficazes. Alguns fatores como o tamanho da partícula do material vegetal, temperatura de extração, a proporção entre solvente e material vegetal, pressão e o tempo empregado no processo, também influenciam diretamente na extração de compostos bioativos [366]. Contudo, apesar da simplicidade do procedimento, este possui algumas limitações, como a extração de compostos indesejáveis e, conseqüentemente, um baixo rendimento na obtenção dos compostos de interesse. Desta forma, para amenizar este problema, é proposto uma etapa de pós-processamento chamado de “winterização”, no qual o extrato é misturado com etanol e resfriado a temperaturas extremamente baixas (-40 °C), para a precipitação de compostos parafínicos. No final deste processo, o precipitado é removido a partir de uma filtração [382].

3.1.7 Atividade antioxidante do tetrahydrocannabinol, canabidiol e da *Cannabis sativa* L.

A atividade antioxidante de diferentes extratos e do óleo essencial de *C. sativa*, e dos seus principais constituintes químicos (canabinóides) foi demonstrada em trabalhos reportados na literatura. No estudo realizado por Hampson e colaboradores [383], foi observado que o CBD e o THC foram considerados agentes neuroprotetores mais eficazes que o ácido ascórbico e a vitamina E, e apresentaram atividade antioxidante por voltametria cíclica. Tanto o CBD quanto o THC preveniram eficazmente os danos oxidativos causados por H₂O₂ em células neuronais de ratos, e também um maior efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida por glutamato, devido ao seu potencial antioxidante [383].

Em outro estudo, Chen e Buck [384] reportaram que o CBD e o THC podem atuar como antioxidantes em concentrações submicromolares, além de prevenirem a morte oxidativa em fibroblastos. Foi reportado também que o CBD exibiu neuroproteção em danos cerebrais

causados por álcool e também na doença de Parkinson em ratos, o que está diretamente correlacionado com a atividade antioxidante deste composto [385].

No estudo conduzido por Haykawa e colaboradores [378], o CBD foi mais potente que o THC em sequestrar o radical DPPH[•]. Giacomo e colaboradores [386] também comprovaram a atividade antioxidante *in vitro* do CBD frente aos métodos de ABTS^{•+}, poder redutor e CUPRAC. Este canabinóide captura os radicais livres, e interrompe as reações em cadeia causadas por estas espécies, de forma a transformá-las em espécies menos reativas. Os produtos formados destas reações são estabilizados por estruturas de ressonância, em que os elétrons desemparelhados estão deslocalizados principalmente na estrutura fenólica. Isto sugere que o grupo hidroxila (OH) do anel fenólico do CBD seja o principal responsável pela atividade antioxidante [387]. Na molécula de THC, a atividade antioxidante pode ser justificada principalmente pela estabilidade do radical livre catiônico, que é gerado após a abstração de elétrons durante o processo de oxidação. Portanto, tanto o efeito eletrônico como o efeito indutivo do grupo alquila, além do efeito de ressonância do grupo éter, são os principais responsáveis pela estabilização do radical livre catiônico [387].

Giacomo e colaboradores [386] avaliaram os efeitos neuroprotetores do CBD e do CBG. Neste estudo, os astrócitos de ratos foram expostos ao H₂O₂ e a produção de EROs e apoptose foi investigada. Tanto o CBD quanto o CBG exerceram efeito neuroprotetor devido à sua ação antioxidante, a qual foi observada pela redução na produção de EROs, além de restaurarem os níveis de 5-HT no córtex.

Recentemente, Vacek e colaboradores [388] investigaram os mecanismos químicos envolvidos na ação antioxidante de alguns canabinóides (CBD, CBG, CBN e CBC). A partir de dados teóricos e eletroquímicos, foi observado que estes compostos possuem propriedades elétron-doadoras e que o efeito antioxidante exercido pelo CBD é mais pronunciado quando comparado com os demais canabinóides analisados neste estudo. Além disso, estes mesmos autores sugeriram que estes compostos interagem de maneira limitada com as EROs e outras espécies reativas, pois o sistema endocanabinóide afeta o equilíbrio redox da célula [389].

Comelli e colaboradores [333] verificaram que o extrato de *C. sativa* constituído por 64,5% de CBD e 4% de THC protegeram contra os danos oxidativos em modelos de ratos induzidos a diabetes. A administração deste extrato restaurou os níveis de glutatona (GSH) e reduziu a peroxidação lipídica (redução nos níveis de MDA) em fígado e, conseqüentemente, o tratamento com este extrato resultou em uma restauração do mecanismo de defesa antioxidante. Fouda e colaboradores [390] reportaram que, devido à ação antioxidante do CBD, este exerce uma proteção contra o estresse oxidativo induzido por glicose. Nafis e

colaboradores [337] verificaram que o óleo essencial das folhas de *C. sativa* também apresentou efeito antioxidante em estudos *in vitro* (DPPH[•], poder redutor e beta-caroteno/ácido linoleico).

Em um estudo recente, foi demonstrado que extratos hexânicos de diferentes cultivares de *C. sativa* apresentaram uma alta atividade antioxidante por métodos *in vitro*, como o DPPH[•], ABTS^{•+} e poder redutor. Além disso, foi observado que estes extratos também apresentaram propriedades quelantes de metais de transição. Os autores atribuíram este efeito antioxidante à presença dos canabinóides (CBD, THC e THCA) e de outros terpenos identificados nestes extratos [391]. Em outro estudo, foi evidenciado que o óleo essencial obtido a partir das inflorescências da *C. sativa* também apresentou atividade antioxidante por meio de métodos espectrofotométricos *in vitro* [392].

No estudo realizado por Raja e colaboradores [393], foi verificado que o THC atenuou o estresse oxidativo *in vitro* induzido por H₂O₂ em células neuronais (SY-SH5Y), devido a uma redução na produção de EROs. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que os extratos de *C. sativa* constituídos pelas maiores concentrações de THC também apresentaram atividade antioxidante e que estes podem ser promissores na redução das EROs.

Vitorovic e colaboradores [394] demonstraram que o óleo extraído das sementes de *C. sativa*, constituído por ácidos graxos poliinsaturados (principalmente por ácidos linoleico e alfa-linoleico), reduziu o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ em larvas de *Drosophila melanogaster*. O óleo também restaurou os níveis de marcadores do estresse oxidativo (MDA, GSH, SOD e CAT) devido à sua ação antioxidante.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral investigar a atividade antioxidante de diferentes extratos de *Cannabis sativa* L. assim como dos canabinóides CBD e THC (isolados e diferentes proporções).

3.2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos de *C. sativa* com diferentes proporções de CBD e THC e realizar análise comparativa da composição química e atividade antioxidante;

- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais nos diferentes extratos de *C. sativa*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e dos canabinóides CBD e THC (isolados e diferentes proporções) por diferentes métodos espectrofotométricos e eletroquímicos;
- Correlacionar os resultados de atividade antioxidante obtidos por métodos espectrofotométricos e eletroquímicos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes e Solventes

O THC (1 mg mL^{-1} em metanol) foi adquirido da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). O reagente de Folin-Ciocalteu, ácido ascórbico (AA), ácido gálico (AG), quercetina (QER), galato de epigallocatequina (EGCG), resveratrol (RESV), carbonato de sódio (Na_2CO_3), ácido tricloroacético (TCA), acetato de potássio (CH_3COOK), 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil ($\text{DPPH}^{\bullet}$), hipoclorito de sódio (NaOCl), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), ácido bórico (H_3BO_3), *N,N*-dimetilformamida (DMF), ácido fosfórico (H_3PO_4), persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), hexacianoferrato de potássio(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), cloreto de potássio (KCl), metanol, etanol e cloreto férrico (FeCl_3) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, com exceção da quercetina e do radical $\text{DPPH}^{\bullet}$, que foram dissolvidos em metanol e etanol, respectivamente. A solução de TMB foi preparada a partir da dissolução da quantidade apropriada do reagente em DMF, ácido acético $0,80 \text{ mol L}^{-1}$ e solução aquosa de KI 10 mmol L^{-1} . As soluções dos ácidos gálico e ascórbico, quercetina, NaOCl , $\text{DPPH}^{\bullet}$, TMB e ABTS^{++} foram preparadas apenas antes das análises e mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração.

3.3.2 Obtenção dos extratos de *Cannabis sativa*

Os extratos de *C. sativa* E1, E2, E3, E4, E5 e E6 foram obtidos a partir de diferentes cultivares da planta e posterior extração com dióxido de carbono supercrítico como descrito por Rovetto e Aieta [395] e purificados por meio da winterinização e destilação molecular [396]. Os extratos e o CBD foram gentilmente cedidos e analisados por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) pela Lupos Biotechnology Inc. (Toronto, ON)

e foram utilizados como recebidos. Além disso, neste estudo também foi avaliada a atividade antioxidante do CBD e THC puros e das misturas em diferentes proporções CBD:THC (90:10; 75:25; 50:50; 25:75 e 10:90 (m/m)).

3.3.3 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos de *Cannabis sativa*

O conteúdo de composto fenólicos totais para os extratos de *C. sativa* foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventó [259]. Em uma microplaca de 96 cavidades foram adicionados os extratos previamente diluídos em etanol, 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 125 μL de solução aquosa de Na_2CO_3 7,5% (m/v). A placa foi incubada a 45 °C por 15 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 765 nm. O teor de compostos fenólicos foi calculado a partir de uma curva analítica de ácido gálico e o resultado foi expresso em mg de ácido gálico (AG) g^{-1} de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.4 Determinação do conteúdo de flavonoides totais dos extratos de *Cannabis sativa*

A determinação do conteúdo de flavonoides totais foi realizada a partir da complexação com o íon alumínio como descrito por Kosalec e colaboradores [260]. Em uma microplaca de 96 cavidades foram adicionados os extratos previamente diluídos em etanol, metanol, 4 μL de uma solução aquosa de CH_3COOK (0,1 mol L^{-1}), 4 μL de solução aquosa de AlCl_3 10% (m/v) e 112 μL de água deionizada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placas a 420 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi calculado a partir de uma curva analítica de quercetina e o resultado foi expresso em mg QER g^{-1} de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.5 Avaliação do poder redutor dos extratos de *Cannabis sativa*

O potencial redutor dos extratos de *C. sativa* foi avaliado pelo método descrito por Mathew e Abraham [397]. Em tubos, foram adicionados 625 μL de tampão fosfato de potássio pH 6,6 (0,2 mol L^{-1}), 200 μL dos extratos diluídos em etanol em diferentes concentrações (1 – 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 625 μL de solução aquosa de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% (m/v). Esta mistura foi incubada por 20 minutos a 50 °C em banho termostaticado e, em seguida, foram adicionados 625 μL de solução aquosa de TCA 10% (m/v). Os tubos foram centrifugados a $3.000 \times g$ por 10 minutos

e foram transferidos 625 µL do sobrenadante para novos tubos aos quais foram adicionados 625 µL de água deionizada e 250 µL de solução aquosa de FeCl₃ 0,1% (m/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 700 nm e como controle foram utilizados o AA, RESV e EGCG. Como branco, foi realizado o mesmo procedimento descrito, mas na ausência dos extratos.

3.3.6 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Cannabis sativa*, CBD e THC pelo método de DPPH[•]

A atividade antioxidante dos extratos de *C. sativa*, CBD, THC e das diferentes proporções entre CBD:THC foi determinada por meio da capacidade das amostras em sequestrar o radical estável DPPH[•] segundo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset [398]. Em uma microplaca de 96 cavidades foram adicionadas as amostras a diferentes concentrações (10 – 750 µg mL⁻¹) e 100 µL de solução de 160 µmol L⁻¹ DPPH[•] em etanol. A placa foi incubada por 30 minutos em ausência de luz e a leitura da absorbância foi realizada em 518 nm. Como branco foi utilizada uma mistura de etanol e os extratos ou compostos a diferentes concentrações. A atividade antioxidante foi expressa em CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% dos radicais DPPH[•]) e como controle foram utilizados o AA, Resv e EGCG. A porcentagem de inibição do radical DPPH[•] foi calculada a partir da seguinte relação:

$$I(\%) = 100 - \left[\frac{(Abs_{Amostra} - Abs_{Branco}) \times 100}{Abs_{Controle}} \right]$$

Onde $Abs_{amostra}$ é a absorbância obtida na presença das diferentes concentrações das amostras e $Abs_{controle}$ é aquela na ausência das amostras. A partir dos resultados obtidos para a porcentagem de inibição para cada uma das concentrações de cada uma das amostras analisadas, foi construída a curva de porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras. A partir da equação obtida, foi possível calcular o valor CI₅₀, que é a concentração dos extratos ou amostras necessária para inibir 50% do radical DPPH[•]. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.7 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Cannabis sativa*, CBD e THC pelo método de ABTS^{•+}

A atividade antioxidante dos extratos de *C. sativa*, CBD, THC e das diferentes proporções entre CBD:THC foi avaliada pela capacidade que estes compostos apresentam em capturar o radical ABTS^{•+} de acordo com o método descrito por Pellegrini e colaboradores [399]. Primeiramente os radicais ABTS^{•+} foram gerados a partir da reação de 7 mmol L⁻¹ de ABTS com 88 µL de 140 mmol L⁻¹ K₂S₂O₈ por 12 – 16 horas antes dos experimentos. Em uma microplaca de 96 cavidades foram adicionadas as amostras a diferentes concentrações (1 – 12,5 µg mL⁻¹) que foram misturados com solução tampão fosfato de sódio 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4) e 100 µL de solução de ABTS^{•+}. A placa foi incubada por 15 minutos em ausência de luz e a leitura da absorbância foi realizada em 734 nm. Como branco foi utilizada uma mistura de tampão fosfato de sódio e os extratos ou compostos a diferentes concentrações. A atividade antioxidante foi expressa em CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% dos radicais ABTS^{•+}) e como controle foram utilizados o AA, Resv e EGCG. A porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} foi calculada a partir da relação descrita no item 3.3.6 e calculado o CI₅₀.

3.3.8 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Cannabis sativa*, CBD e THC pelo método de HOCl

A atividade antioxidante foi avaliada com base na habilidade que os extratos de *C. sativa*, CBD, THC e as diferentes proporções entre CBD:THC apresentam em capturar HOCl de forma a impedir que oxide o TMB de acordo com o método descrito por Costa e colaboradores [400]. As amostras a diferentes concentrações (1 - 12,5 µg mL⁻¹) foram misturadas com solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,4) e 50 µL de solução de NaOCl 0,01% (v/v), e então incubadas por 10 minutos em ausência de luz. Em seguida, 50 µL de solução de TMB 2,8 mmol L⁻¹ foi adicionado e a leitura da absorbância foi realizada a 652 nm. A atividade antioxidante foi expressa em CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da formação de HOCl) e como controle foram utilizados o AA, Resv e EGCG. A porcentagem de inibição do radical HOCl foi calculada a partir da relação descrita no item 3.3.6 e calculado o CI₅₀.

3.3.9 Avaliação da atividade antioxidante por métodos eletroquímicos

Medidas de voltametria cíclica (VC) e de voltametria de pulso diferencial (VPD) foram realizadas à temperatura ambiente empregando-se um potenciostato/galvanostato μ Autolab 128N (EcoChemie) e o *software* NOVA 2.1. Todos os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica contendo um eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, um eletrodo Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência e um fio espiral de platina como eletrodo auxiliar. Como eletrólito suporte, empregou-se solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ em metanol a 30% (v/v). Antes da realização das medidas voltamétricas, a superfície do ECV foi polida com suspensão de alumina (granulometrias 1,0 μ m e 0,3 μ m), seguido por banho ultrassônico em água ultrapura por 5 minutos e secagem sob fluxo de N₂.

3.3.10 Análise Estatística

Os resultados das análises foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste Tukey e $p < 0,05$ foi considerado significativo para todos os casos. O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas. As correlações entre os dados foram calculadas a partir da correlação de Pearson.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de *Cannabis sativa*

No presente estudo, a atividade antioxidante e a composição química de seis extratos de *C. sativa* com diferentes teores de canabinóides foi avaliada por meio de métodos espectrofotométricos e eletroquímicos. Além disso, a atividade antioxidante também foi investigada para o CBD e THC, assim como o efeito de misturas com diferentes proporções entre estes compostos. É importante a avaliação da atividade antioxidante de amostras por meio de diferentes métodos, pois auxilia na elucidação dos mecanismos pelos quais os compostos agem. Dentre estes mecanismos, o sequestro de radicais é um dos mais comuns [401]. Neste sentido, esta propriedade foi avaliada para os canabinóides THC e CBD e para os extratos de *C. sativa* por meio de diferentes métodos *in vitro*.

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais para os extratos de *C. sativa* estão apresentados na Tabela 3.1. Foi observado que todos os extratos são constituídos de polifenóis (flavonoides e não-flavonoides). No entanto, devido ao baixo teor de flavonoides, sugere-se que os não-flavonoides estão presentes em maiores proporções nos extratos. Os extratos E1 e E4 exibiram os maiores teores de compostos fenólicos quando comparados com os demais extratos ($p < 0,05$) (Tabela 3.1). Na literatura é reportado que alguns flavonoides foram identificados nos extratos de *C. sativa*, como a apigenina, quercetina e a luteolina [352], os quais são compostos que possuem uma alta atividade antioxidante, devido à habilidade que estes compostos apresentam em sequestrar radicais livres, quelar metais e inibir a ocorrência da peroxidação lipídica [38].

Tabela 3.1 – Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos de *Cannabis sativa*.

Extratos	Fenólicos totais (mg AG g ⁻¹)*	Flavonoides totais (mg QER g ⁻¹)*
E1	101,1 ± 10,3 a	24,0 ± 3,8 a
E2	96,9 ± 4,8 b	24,1 ± 4,4 a
E3	92,8 ± 2,6 b	15,9 ± 0,6 b
E4	107,7 ± 1,8 a	5,2 ± 1,0 c
E5	88,8 ± 1,8 b	13,7 ± 1,2 b
E6	99,8 ± 1,4 a	14,1 ± 0,9 a

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes (a-c) em cada coluna diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,05$. AG = ácido gálico; QER = quercetina.

Fonte: A autora.

Os perfis de canabinóides dos seis extratos de *C. sativa* investigados neste estudo revelaram que todos são constituídos por CBD e THC como os componentes majoritários em diferentes proporções (Tabela 3.2). Contudo, também foram identificados o CBC, CBG e CBN como componentes minoritários nos extratos (Figura 3.11). Na literatura, é demonstrado que a combinação de canabinóides com compostos não-canabinóides como os polifenóis em extratos de *C. sativa* podem aumentar os efeitos benéficos do CBD e reduzir os efeitos adversos induzidos pelo THC [352].

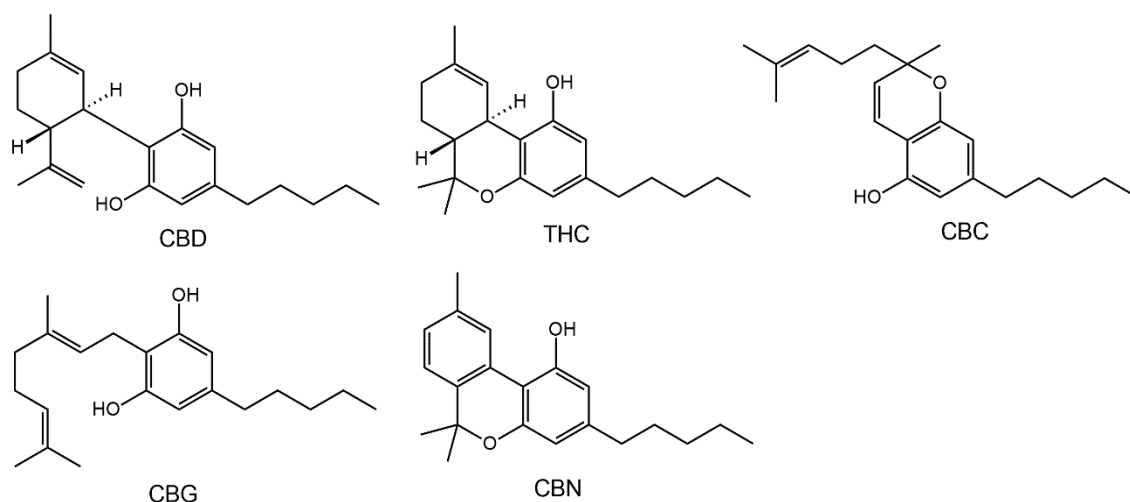
Tabela 3.2 – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) dos extratos de *Cannabis sativa* provenientes da Lupos (Canadá).

Compostos (%)	E1	E2	E3	E4	E5	E6
CBD	N.D	N.D	N.D	87,1	0,4	56,7
THC	72,9	81,1	71,8	9,6	46,1	3,4
CBC	1,2	0,7	2,1	N.D	N.D	N.D
CBG	7,7	3,1	4,5	1,2	N.D	1,0
CBN	3,9	0,7	0,9	0,4	0,5	0,1

N.D: Não detectado.

Fonte: A autora.

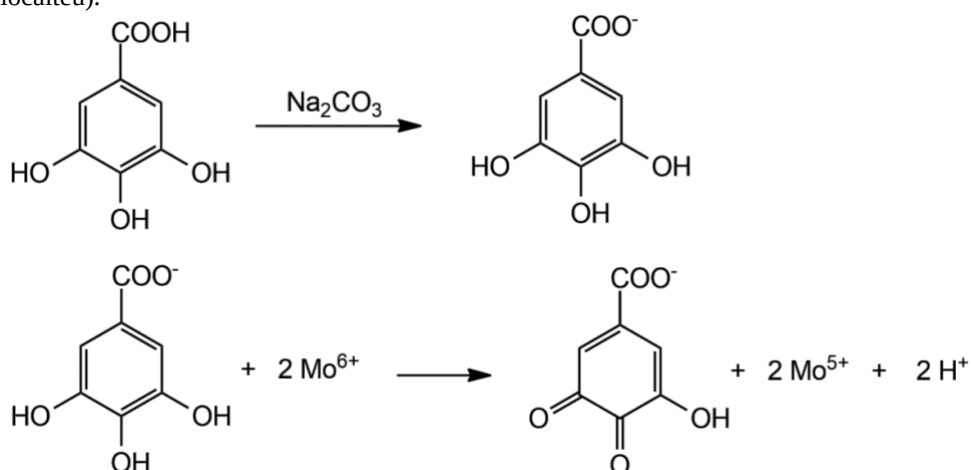
Figura 3.11 – Estrutura química dos canabinóides identificados nos extratos de *Cannabis sativa*.



Fonte: A autora.

Neste estudo, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *C. sativa* foi determinado por meio da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu (Figura 3.12), método extensivamente empregado para a quantificação de compostos fenólicos, principalmente na área de química de produtos naturais, pois é simples, preciso e sensível. Este método é baseado na redução de um composto fenólico em meio alcalino. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstíco, no qual o molibdênio está no estado máximo de oxidação (VI) e apresenta coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Na presença de agentes redutores como os compostos fenólicos (P) ocorre a formação de um complexo azul molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ em que o molibdênio é reduzido e passa ao estado de oxidação (V) devido ao elétron que foi doado pelo composto fenólico.

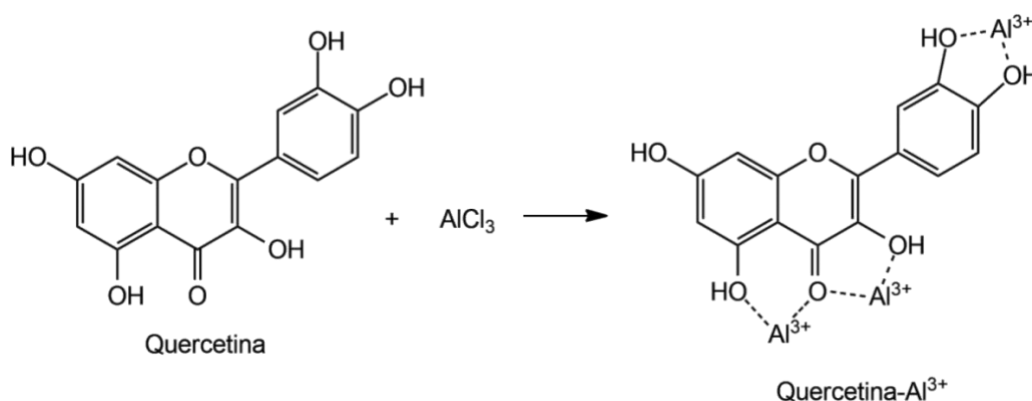
Figura 3.12 – Reação de oxirredução entre o ácido gálico e o íon molibdato (VI) (um dos componentes do reagente de Folin-Ciocalteu).



Fonte: A autora.

O conteúdo de flavonoides totais dos extratos de *C. sativa* foi determinado por meio da complexação com o íon alumínio (Figura 3.13). O princípio deste método é que o AlCl_3 pode formar complexos estáveis com o grupo ceto do C-4 e com os grupos OH em C-3 ou C-5 das flavonas e flavonóis. Ainda, o AlCl_3 pode formar complexos lábeis com os grupamentos ortodihidroxil dos anéis A ou B dos flavonoides. Na Figura 3.13 está apresentada a complexação do íon Al^{3+} com as moléculas do flavonoide quercetina com a formação de um complexo estável de coloração amarela, a qual está relacionada com a concentração destes compostos presentes em uma determinada amostra.

Figura 3.13 – Reação de complexação do flavonoide quercetina com o cloreto de alumínio (AlCl_3).

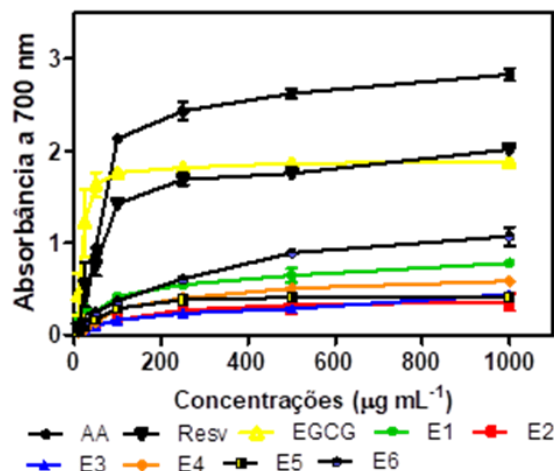


Fonte: A autora.

3.4.2 Avaliação do poder redutor dos extratos de *Cannabis sativa*

Uma forma comumente utilizada na avaliação da atividade antioxidante dos extratos é a habilidade dos compostos em reduzir $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ com a formação do complexo azul intenso denominado Azul da Prússia, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, na presença de íons Fe^{3+} [397]. Como demonstrado na Figura 3.14, todos os extratos atuaram como doadores de elétrons devido à presença de agentes redutores na sua composição química. Neste método, foi observado um aumento nos valores de absorbância com o aumento das concentrações dos extratos, devido à formação do complexo Azul da Prússia. Contudo, os extratos E1 e E6 exibiram maior atividade antioxidante comparado com os outros extratos.

Figura 3.14 – Poder redutor dos extratos de *Cannabis sativa* e dos controles ácido ascórbico (AA), resveratrol (Resv) e galato de epigallocatequina (EGCG). Os dados mostram a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata.



Fonte: A autora.

3.4.3 Determinação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH[•], ABTS^{•+} e HOCl

Nas Tabelas 3.3 e 3.4 estão apresentados os valores de atividade antioxidante (CI₅₀) obtidos nos ensaios de DPPH[•], ABTS^{•+} e HOCl. O CBD possui atividade antioxidante maior que o THC no ensaio de DPPH[•], devido ao menor valor de CI₅₀ ($p < 0,05$). Estes dois compostos são isômeros, porém o CBD possui dois grupos hidroxila (fenóis), enquanto o THC apresenta apenas um grupo hidroxila (Figura 3.15). Desta forma, esta diferença estrutural pode explicar a maior atividade antioxidante do CBD, por este método, em relação ao THC. Além disso, isto pode ser justificado pela dificuldade de doação de um átomo de hidrogênio para neutralizar este radical. Alguns compostos reagem mais lentamente com o DPPH[•], enquanto com outros compostos a reação é mais rápida. No estudo conduzido por Marsicano e colaboradores [402] foi observado que os canabinóides que possuem hidroxilas fenólicas, como o CBN, CBD e THC (Figura 3.11), são potentes antioxidantes quando comparados aos compostos nos quais este grupo está ausente. De fato, estudos demonstraram que a atividade antioxidante exibida por este método está correlacionada com a presença, o número e a posição de grupos hidroxilas nos compostos [45]. Além disso, foi possível observar esta tendência na atividade antioxidante para os padrões (AA, Resv e EGCG) utilizados no presente estudo (Tabela 3.4) (Figura 3.15). Este estudo também demonstrou que houve um aumento da ação antioxidante do THC (redução dos valores de CI₅₀) com o aumento da quantidade de CBD nas diferentes proporções de CBD:THC estudadas (Tabela 3.3), no método de DPPH[•].

Tabela 3.3 – Atividade antioxidante (CI₅₀) das diferentes proporções de CBD:THC obtida pelos métodos de DPPH[•], ABTS^{•+} e HOCl.

CBD:THC (m/m)	DPPH [•] (CI ₅₀ µg mL ⁻¹)*	ABTS ^{•+} (CI ₅₀ µg mL ⁻¹)*	HOCl (CI ₅₀ µg mL ⁻¹)*
CBD	128,8 ± 9,2 a	5,7 ± 0,4 b	2,4 ± 0,2 a
THC	230,2 ± 14,1 b	5,4 ± 0,5 b	4,6 ± 1,0 b
90:10	162,2 ± 18,1 a	6,7 ± 1,7 c	2,8 ± 0,1 a
75:25	164,6 ± 25,6 a	4,3 ± 0,7 a	2,8 ± 0,4 a
50:50	150,1 ± 30,3 a	4,8 ± 0,3 a	5,0 ± 0,8 b
25:75	169,3 ± 9,2 a	6,2 ± 0,3 b	4,6 ± 0,4 b
10:90	250,9 ± 9,3 b	4,4 ± 0,3 a	3,5 ± 0,3 b

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes (a-c) em cada coluna diferem pelo teste de Tukey a p < 0,05.

Fonte: A autora.

Foi possível observar diferenças na atividade antioxidante dos extratos de *C. sativa* no ensaio de DPPH[•] (Tabela 3.4). Os extratos E1 e E4 apresentaram as maiores atividades antioxidante (menores valores de CI₅₀) comparados com os outros extratos, o que pode ser atribuído à presença dos maiores teores de compostos fenólicos e canabinóides nestes extratos (p < 0,05). Contudo, o extrato E1 é constituído predominantemente por THC e exibiu o menor valor de CI₅₀ comparado com o CBD (Tabela 3.4). Neste caso, a presença dos polifenóis pode ter aumentado a atividade antioxidante deste extrato. Além disso, também pode ser atribuído ao efeito sinérgico entre os compostos presentes nos extratos e pode ser responsável por suas propriedades biológicas. Um composto isolado pode mudar suas propriedades biológicas na presença de outros compostos presentes nos extratos [365]. A presença de compostos fenólicos nos extratos pode justificar a atividade antioxidante, visto que estes compostos podem neutralizar os radicais DPPH[•], ou seja, podem atuar como doadores de átomos de hidrogênio [38].

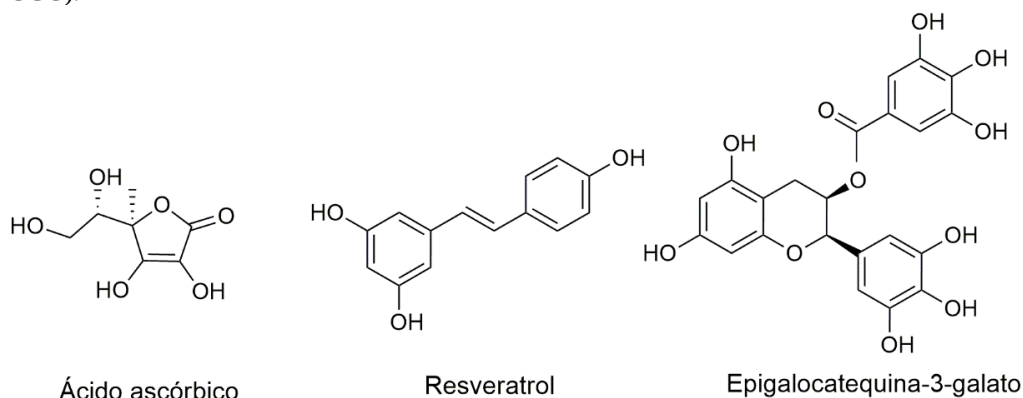
Tabela 3.4 - Atividade antioxidante (CI_{50}) de extratos de *Cannabis sativa* e dos controles (ácido ascórbico, resveratrol e epigallocatequina-3-galato) obtida pelos métodos de DPPH[•], ABTS^{•+} e HOCl.

Extratos e compostos	DPPH [•] (CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$)*	ABTS ^{•+} (CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$)*	HOCl (CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$)*
E1	141,9 $\pm$ 10,2 c	5,8 $\pm$ 1,0 c	3,5 $\pm$ 0,7 b
E2	202,8 $\pm$ 7,8 d	7,0 $\pm$ 0,6 d	6,4 $\pm$ 0,2 d
E3	238,3 $\pm$ 14,1 d	5,2 $\pm$ 0,8 c	6,5 $\pm$ 0,5 d
E4	147,3 $\pm$ 18,7 c	3,4 $\pm$ 0,8 b	3,0 $\pm$ 0,3 b
E5	640,1 $\pm$ 16,9 e	7,1 $\pm$ 0,5 d	4,0 $\pm$ 0,2 c
E6	229,8 $\pm$ 21,3 d	5,0 $\pm$ 0,6 c	2,9 $\pm$ 0,2 b
AA	4,6 $\pm$ 0,4 a	4,0 $\pm$ 0,1 b	3,1 $\pm$ 0,4 b
Resv	21,4 $\pm$ 0,2 b	1,6 $\pm$ 0,2 a	0,5 $\pm$ 0,1 a
EGCG	2,3 $\pm$ 0,4 a	1,4 $\pm$ 0,1 a	0,14 $\pm$ 0,01 a

*Valores apresentados como a média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem (a-e) pelo teste de Tukey a $p < 0,05$. AA = ácido ascórbico; Resv = resveratrol; EGCG = galato de epigallocatequina.

Fonte: A autora.

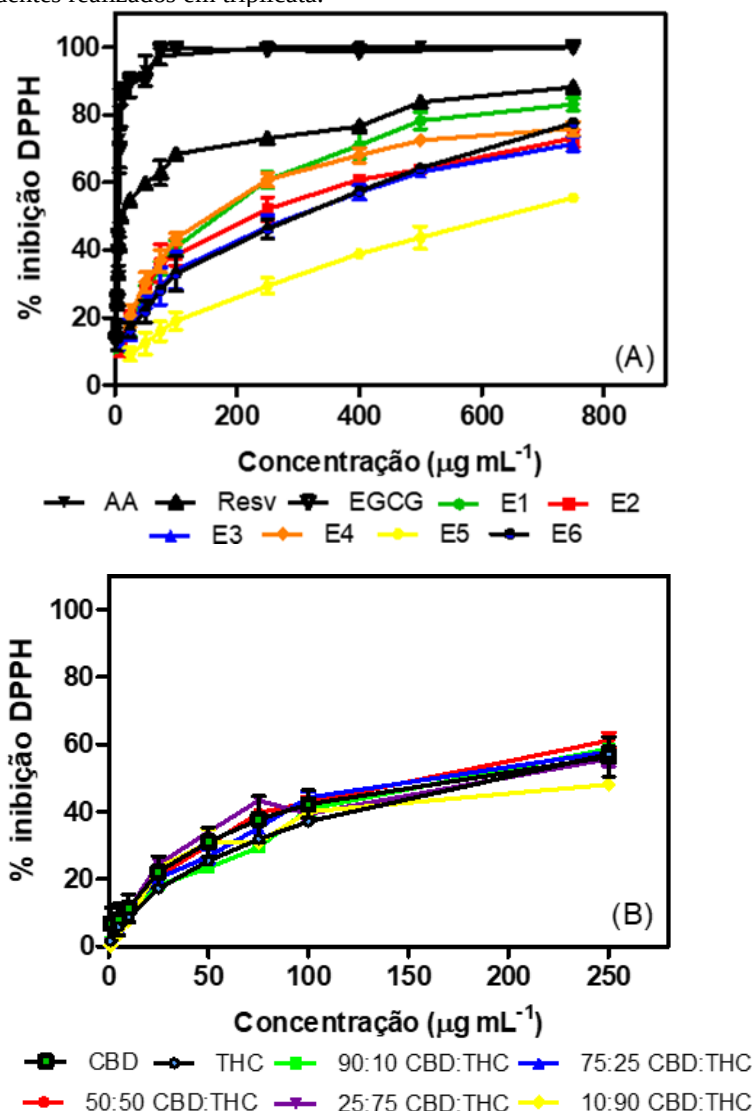
Figura 3.15 – Estrutura química dos controles ácido ascórbico (AA), resveratrol (Resv) e epigallocatequina-3-galato (EGCG).



Fonte: A autora.

Ainda, foi possível observar a influência da presença de CBD na atividade antioxidante dos extratos de *C. sativa* e verificou-se um aumento neste efeito (redução nos valores de CI_{50}) quando os teores de CBD eram maiores nos extratos (Tabela 3.4). Este fato pode ser observado quando se comparou a capacidade antioxidante obtida para os extratos E3 e E6 ($p < 0,05$). Além disso, os extratos E5 e E6 são constituídos de aproximadamente 50% de THC e 50% de CBD (Tabela 3.2), respectivamente. No entanto, o extrato E6 exibiu uma atividade antioxidante superior à do extrato E5, o qual apresentou o menor efeito antioxidante comparado aos demais extratos estudados no método (radical DPPH[•]) ($p < 0,05$).

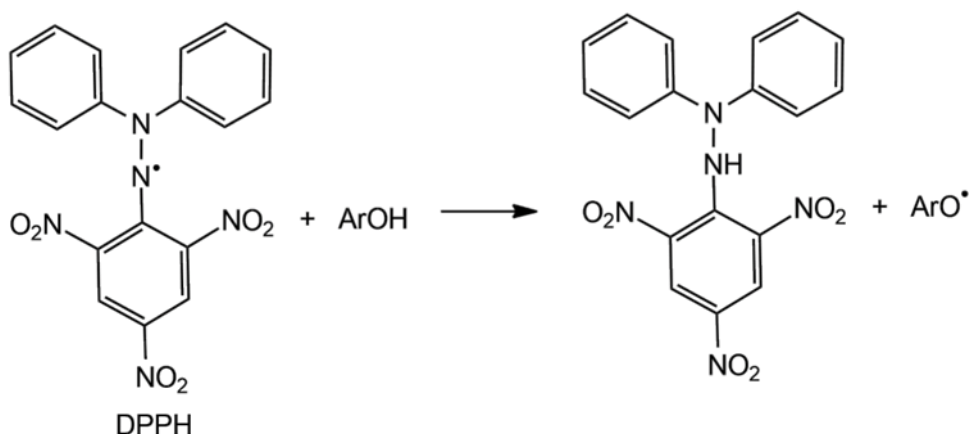
Figura 3.16 – Porcentagem de inibição dos radicais DPPH* para (a) extratos de *Cannabis sativa* e (b) canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) e proporções CBD:THC. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.



Fonte: A autora.

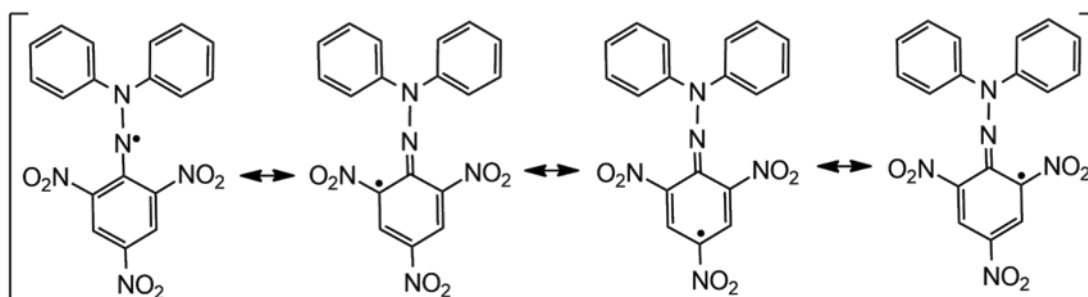
O radical livre de coloração púrpura 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH*) foi utilizado a partir da sua dissolução em etanol. Neste método, quando uma molécula de DPPH* recebe um átomo de hidrogênio a partir de um composto com propriedades antioxidante para se tornar uma molécula estável, ocorre uma descoloração da solução devido à formação de 2,2-difenil-picrilhidrazila a 518 nm (Figura 3.17) [398]. Desta forma, esta descoloração indica a capacidade do antioxidante de inibir o radical DPPH*. Este radical contém um elétron desemparelhado, mas por possuir três anéis aromáticos em sua estrutura, pode ser estabilizado por ressonância e tornar-se um radical estável. Uma deslocalização estendida adicional por ressonância pode ser realizada pelos três grupos nitro (NO_2) e os dois átomos de nitrogênio (Figura 3.18).

Figura 3.17 – Reação genérica entre o radical DPPH[•] e um antioxidante (A-H) genérico (ArOH).



Fonte: A autora.

Figura 3.18 – Estabilização do radical DPPH[•] por meio da ressonância.

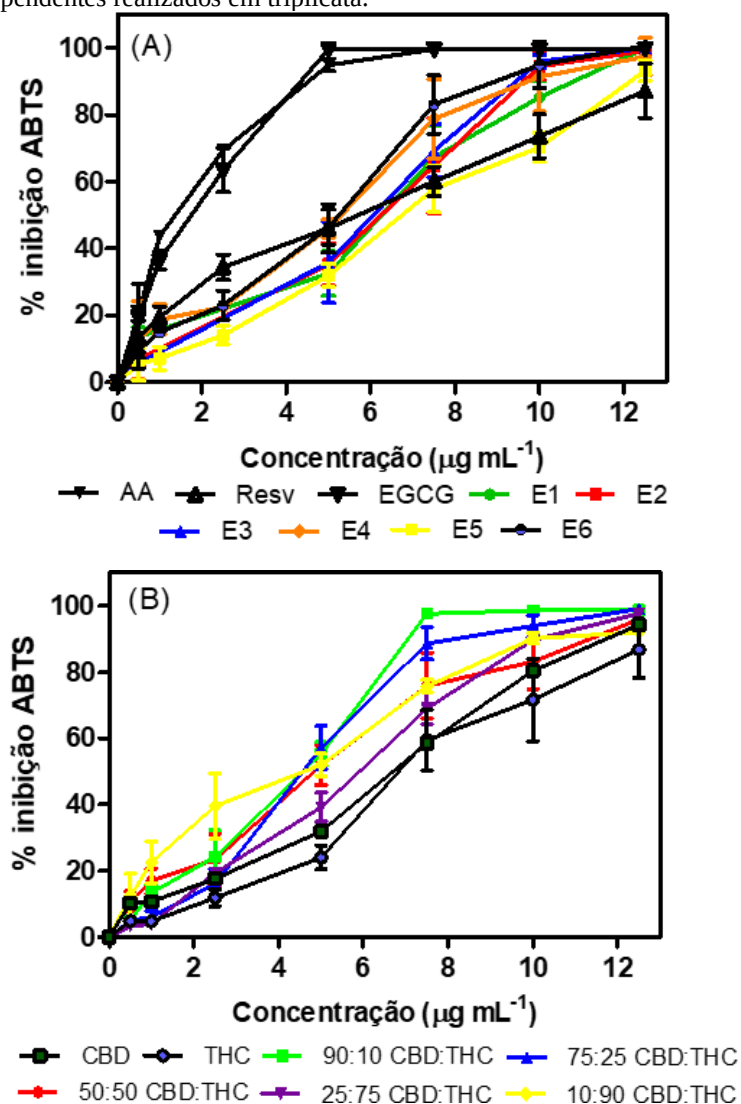


Fonte: A autora.

O ensaio de ABTS^{•+} (Figura 3.19) foi utilizado a fim de se avaliar a transferência de elétrons dos compostos presentes nos extratos de *C. sativa* [403]. Como apresentado na Tabela 3.3 tanto o CBD quanto o THC exibiram atividades antioxidantes maiores, porém similares, o que indicou que estes compostos podem atuar como antioxidantes por meio do mecanismo de doação de elétrons. No entanto, quando foi avaliado este efeito para as diferentes proporções de CBD:THC, foi verificado tanto aumento quanto diminuição nas atividades antioxidantes, quando comparadas aos compostos puros (Figura 3.19; Tabela 3.3). Por exemplo, a proporção 10:90 (m/m) CBD:THC aumentou a atividade antioxidante para o CBD e o THC. Por outro lado, a proporção 90:10 (m/m) diminuiu o efeito observado para estes canabinóides isolados. Desta forma, pode-se sugerir um efeito sinérgico e antagônico entre estes compostos quando são analisados os resultados obtidos no ensaio de ABTS^{•+}. Este efeito pode ser explicado devido a possível formação de um complexo intermolecular resultante da interação entre o CBD e o THC, a qual pode aumentar ou diminuir as propriedades antioxidantes de misturas dependendo da razão avaliada [404]. Além disso, estes resultados podem ser uma consequência de

mecanismos de regeneração entre estes canabinóides quando ambos estão presentes simultaneamente nas misturas. Estes processos de regeneração podem também auxiliar no aumento ou diminuição do efeito antioxidante observado para as diferentes misturas analisadas [404].

Figura 3.19 – Porcentagem de inibição dos radicais ABTS^{•+} para (a) extratos de *Cannabis sativa* e (b) canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) e proporções CBD:THC. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.



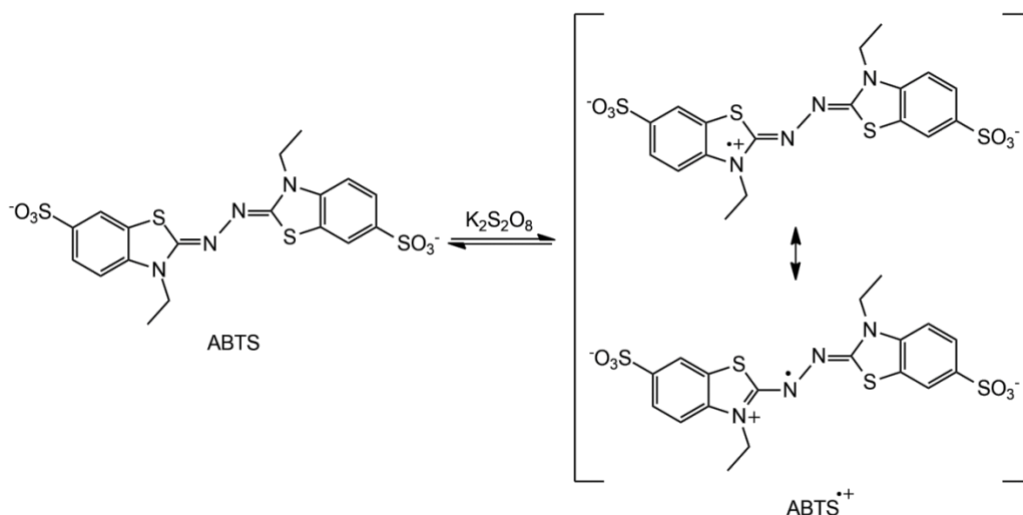
Fonte: A autora.

Todos os extratos de *C. sativa* apresentaram atividade antioxidante no ensaio de ABTS^{•+} (Figura 3.19; Tabela 3.4), porém, o extrato E4 apresentou efeito tão potente quanto o padrão ácido ascórbico. Já os demais extratos contêm diferentes proporções de CBD e THC e polifenóis, o que pode explicar os efeitos antioxidantes obtidos neste ensaio. Quando se comparam os dados das Tabelas 3.3 e 3.4 observa-se que o extrato E4 apresenta aproximadamente 90:10 (m/m) da proporção de CBD:THC e o efeito verificado por este extrato

foi semelhante àquele obtido para a mistura. Além disso, o E4 apresentou maior atividade antioxidante do que os canabinóides CBD e THC isolados. Desta forma, a presença de polifenóis neste extrato levou a um aumento da atividade antioxidante frente ao método de $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

O ensaio de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ baseia-se na habilidade que os antioxidantes possuem em transferir elétrons para reduzir este radical. No entanto, este radical livre é preparado a partir da reação do ABTS com o oxidante $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ seguido de armazenamento em ausência de luz durante 12 – 6 horas (Figura 3.20). O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é um radical de coloração verde, que na presença de um antioxidante, ocorre uma redução nos valores de absorbância a 734 nm [399].

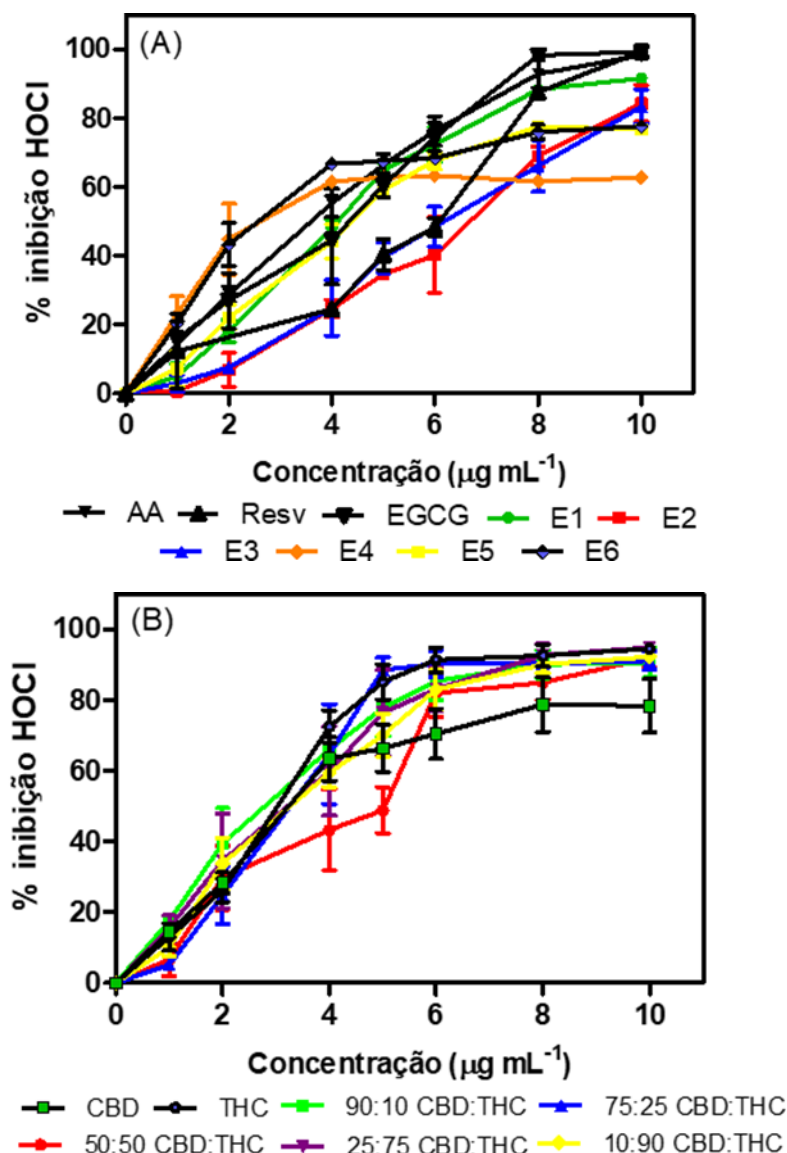
Figura 3.20 – Oxidação do ABTS com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ para a geração do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.



Fonte: A autora.

O HOCl é um oxidante forte envolvido em processos inflamatórios que causam danos aos tecidos. Foi observado que o CBD e o THC possuem atividade antioxidante pelo método da inibição do HOCl (Figura 3.21; Tabela 3.3). Resultados semelhantes aos obtidos no ensaio de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foram observados neste estudo para as diferentes proporções de CBD:THC. Algumas proporções aumentaram este efeito, enquanto outras pareceram atenuar a atividade antioxidante (Tabela 3.3). Além disso, foi observado que todos os extratos exibiram atividade antioxidante e podem ser considerados inibidores da formação de HOCl (Tabela 3.4). Conforme observado no ensaio anterior, sugere-se que os canabinóides e polifenóis presentes podem ser os responsáveis pelo efeito observado para os extratos estudados.

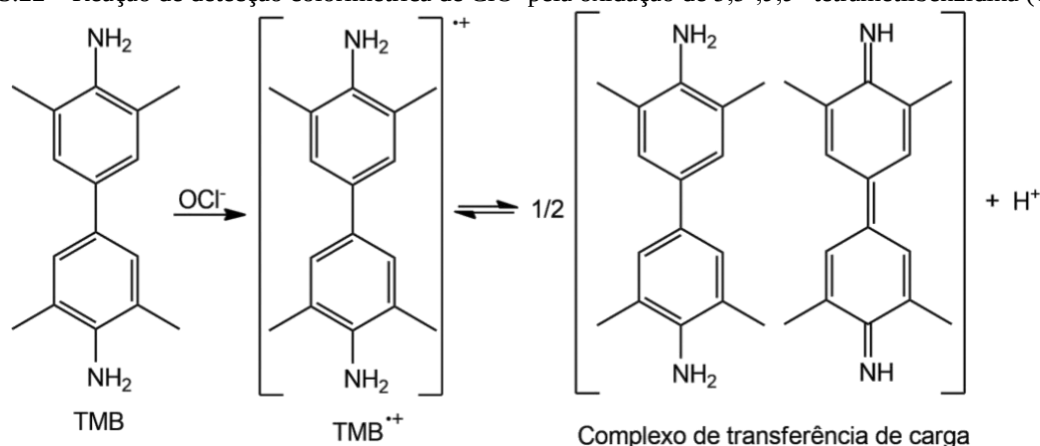
Figura 3.21 – Porcentagem de inibição do HOCl para (a) extratos de *Cannabis sativa* e (b) canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) e proporções CBD:THC. Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.



Fonte: A autora.

Neste método, a ação antioxidante de um determinado composto depende da sua capacidade em capturar o HOCl/OCl⁻, impedindo-o de oxidar o TMB. Entretanto, quando este composto é oxidado, um cromóforo azul com valor máximo de absorbância a 652 nm é originado em solução (Figura 3.22). Portanto, uma redução nos valores de absorbância neste comprimento de onda indicam uma maior atividade antioxidante, ou seja, uma maior capacidade de um determinado composto em sequestrar o HOCl [400].

Figura 3.22 – Reação de detecção colorimétrica de ClO^- pela oxidação de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).



Fonte: A autora.

3.4.4 Determinação da atividade antioxidante por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial

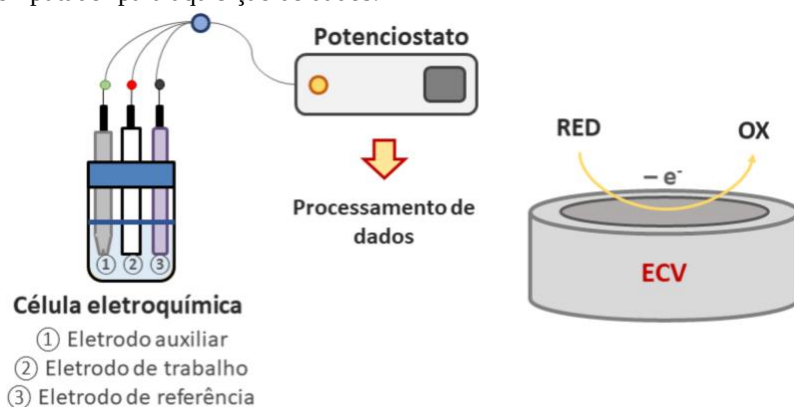
A atividade antioxidante do CBD, THC, das diferentes proporções entre estes canabinóides e dos extratos de *C. sativa* foi também avaliada por métodos voltamétricos (VC e VPD). Tais técnicas consistem em ferramentas úteis para prover informações sobre a atividade antioxidante de compostos e extratos naturais devido à sua simplicidade, resposta rápida, sensibilidade e utilização de pequenos volumes de amostra. O sistema geral mais comumente empregado para a realização de medidas eletroquímicas está representado esquematicamente na Figura 3.23. Uma célula eletroquímica contendo um conjunto de três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência) imersos em um eletrólito (que contém as espécies a serem estudadas) é conectada a um potenciostato, o qual é responsável por aplicar perturbações de corrente ou potencial ao sistema e registrar as respostas observadas. As reações eletroquímicas de interesse (oxidação e/ou redução) ocorrem na interface do eletrodo de trabalho com o eletrólito, enquanto o eletrodo de referência é empregado como referência de potencial. O eletrodo auxiliar, por sua vez, é responsável por realizar processos redox opostos aos que acontecem na superfície do eletrodo de trabalho [405].

De maneira geral, em um experimento voltamétrico, uma varredura de potencial (E) é aplicada a um eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência e a corrente elétrica (I) que flui pelo sistema como consequência desta aplicação de potencial é registrada [406]. Se a medida é realizada na presença de um composto ou extrato que apresenta atividade antioxidante, picos de corrente são observados no voltamograma resultante (gráfico de E vs. I) [407]. Uma vez que tais compostos são facilmente oxidáveis, os picos de corrente representam tais processos de oxidação e ocorrem, em sua maioria, em regiões positivas de potencial

(potenciais anódicos). Neste caso, baixos valores de potencial de oxidação correspondem a uma alta habilidade dos compostos em doar elétrons e então atuar como agentes antioxidantes [408,409].

Neste trabalho, para as medidas da atividade antioxidante das amostras estudadas por meio de VC e VPD, um eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi empregado como eletrodo de trabalho. O ECV é amplamente utilizado para aplicações eletroanalíticas devido à sua boa estabilidade mecânica e eletroquímica, o que permite sua aplicação para o estudo de moléculas em uma ampla janela de potencial [406].

Figura 3.23 – Célula eletroquímica com os três eletrodos conectados ao potenciostato/galvanostato μ -Autolab conectados a um computador para aquisição de dados.



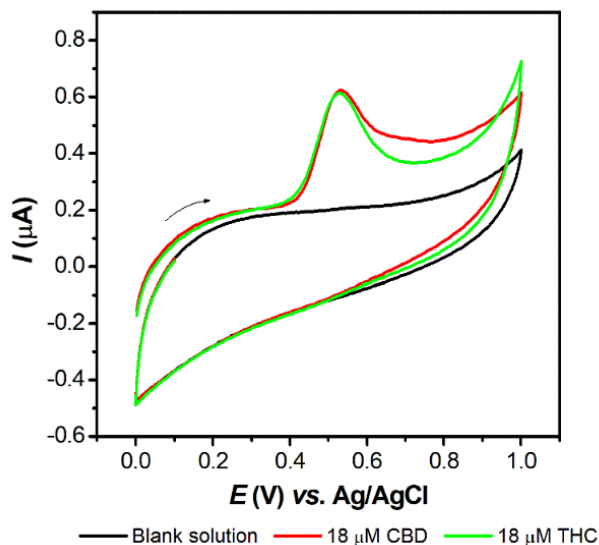
Fonte: A autora.

A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais comumente utilizada para a caracterização de sistemas eletroativos, pois pode prover informações qualitativas úteis sobre o comportamento eletroquímico e mecanismos redox dos compostos sob investigação, além de fornecer evidências sobre a cinética de transferência de elétrons [407]. A VC envolve a aplicação de varreduras cíclicas de potencial em um intervalo pré-determinado, tanto no sentido anódico (menores potenciais para maiores potenciais, onde processos de oxidação ocorrem, relacionados aqui à capacidade antioxidante das moléculas estudadas) quanto no sentido catódico (maiores valores para menores valores de potencial, viabilizando a ocorrência de processos de redução) [406,407,410].

Na Figura 3.24, apresenta-se o comportamento voltamétrico do CBD e do THC sobre o ECV. Na ausência dos canabinóides, nenhum pico de corrente foi identificado. No entanto, picos de oxidação bem definidos, em torno de +0,5 V (vs. Ag/AgCl), foram observados quando estes compostos foram adicionados à célula eletroquímica. Tais picos podem ser atribuídos à oxidação dos canabinóides na superfície do eletrodo. A presença de picos anódicos em baixos

valores de potencial confirma a alta atividade antioxidante dos compostos e dos extratos estudados. Uma vez que não foram observados picos catódicos durante a varredura reversa, pode-se dizer que os mecanismos de oxidação são irreversíveis na faixa de potencial analisada [409].

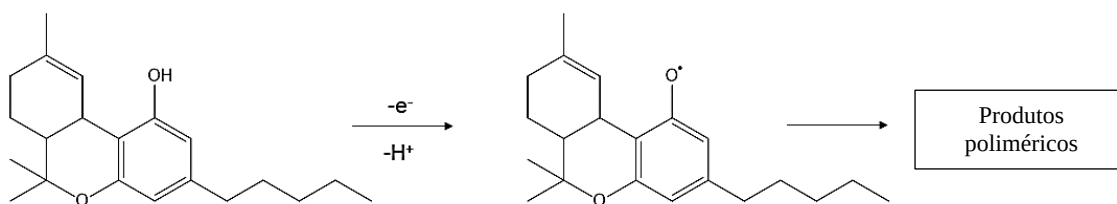
Figura 3.24 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de carbono vítreo (ECV) na ausência e na presença de $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ de canabidiol (CBD) ou tetrahydrocannabinol (THC) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo 30% (v/v) de metanol (velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}).



Fonte: A autora.

De acordo com a literatura [367,411–413], o comportamento voltamétrico do THC é similar ao apresentado pelos fenóis: na primeira etapa, um elétron e um próton são removidos da molécula de THC, o que leva a formação de um radical neutro estabilizado por ressonância. A seguir, estes radicais sofrem reações de polimerização para fornecer os produtos finais, os quais permanecem adsorvidos na superfície do eletrodo (Figura 3.25). Não há relatos na literatura a respeito do mecanismo de oxidação eletroquímica do CBD. No entanto, acredita-se que seja semelhante ao do THC, visto que ambos possuem, pelo menos, um grupo hidroxila em suas estruturas.

Figura 3.25 – Mecanismo de oxidação do tetrahidrocanabinol (THC).



Fonte: A autora.

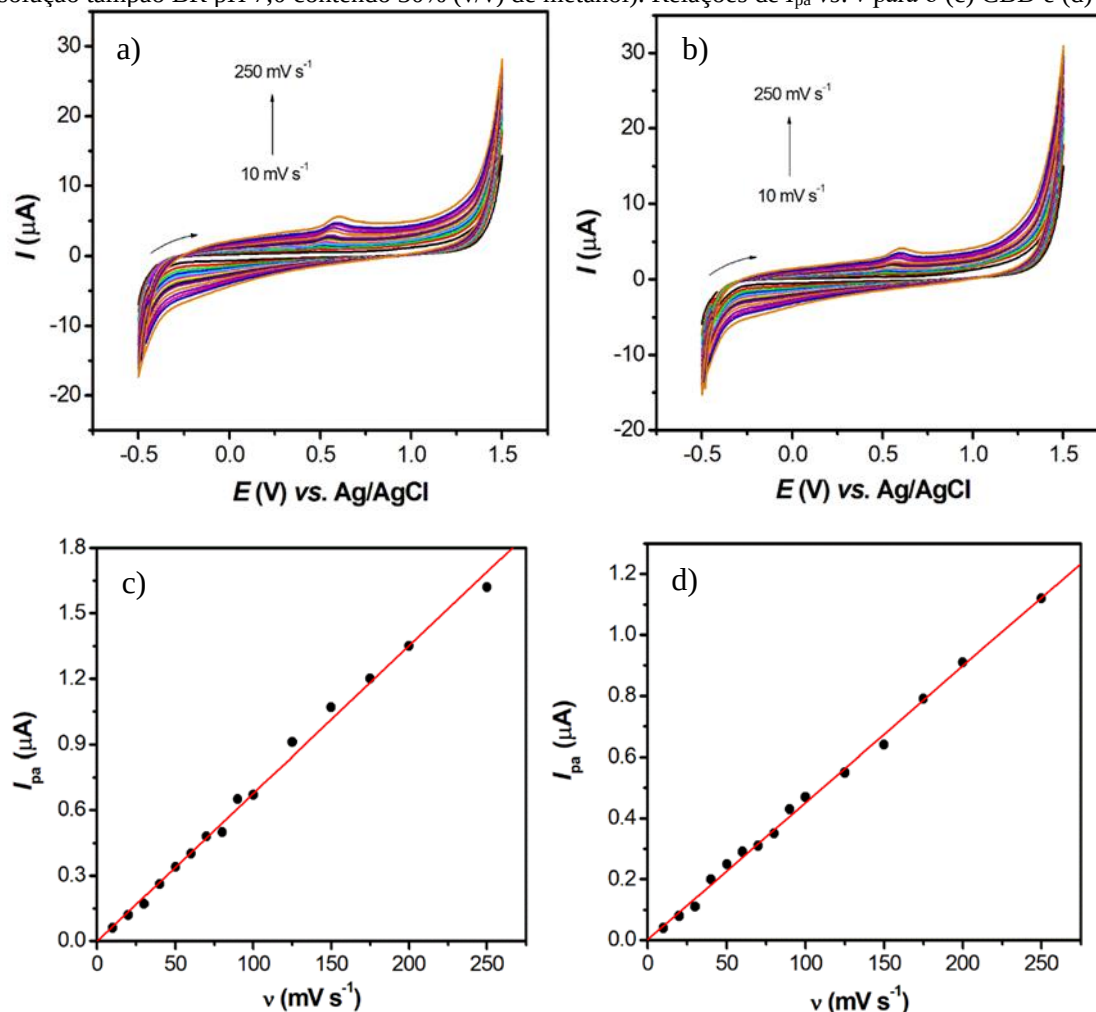
A adsorção de produtos poliméricos resultantes da oxidação tanto do CBD quanto do THC foi evidenciada a partir de um decréscimo pronunciado na intensidade dos picos de oxidação destes compostos após o primeiro ciclo voltamétrico. Este comportamento foi também confirmado a partir da realização de medidas de VC em diferentes valores de velocidade de varredura (Figura 3.26). É conhecido que processos redox que ocorrem segundo um mecanismo adsorativo em relação ao eletrodo de trabalho apresentam valores de corrente de pico anódico (I_{pa}) que variam de modo linear com o valor da velocidade de varredura (v), segundo a equação:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma v$$

Onde: n é o número de elétrons transferidos na reação; F é a constante de Faraday (96485,3365 C mol⁻¹); R é a constante universal dos gases ideais (0,082 atm L mol⁻¹ K⁻¹); A é a área do eletrodo (em cm²); Γ é a concentração da espécie eletroativa adsorvida na superfície do eletrodo (mol cm⁻²) e v é a velocidade de varredura de potencial (em V s⁻¹) [405,406].

Como pode ser observado na Figura 3.26, tanto o CBD quanto o THC apresentaram picos de oxidação que variaram linearmente com o valor da velocidade de varredura, evidenciando a adsorção dos produtos poliméricos na superfície do ECV após a oxidação das moléculas mencionadas. Comportamentos semelhantes foram observados em trabalhos prévios descritos na literatura [410,413,414].

Figura 3.26 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 mV s^{-1} a 250 mV s^{-1}) em um eletrodo de carbono vítreo (ECV) na presença de 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de (a) CBD e (b) THC (eletrólito: solução tampão BR pH 7,0 contendo 30% (v/v) de metanol). Relações de I_{pa} vs. v para o (c) CBD e (d) THC.

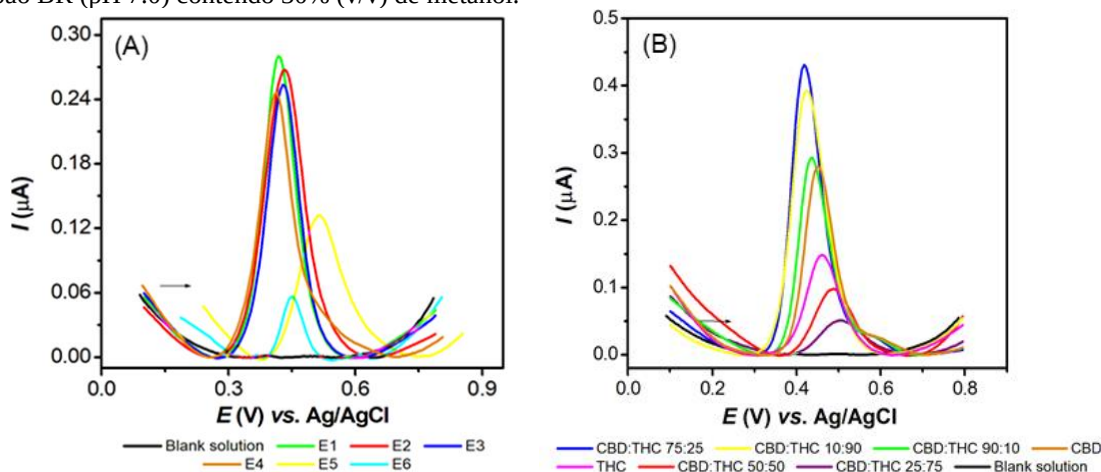


Fonte: A autora.

Com o intuito de se determinar a atividade antioxidante do CBD, THC e extratos de *C. sativa* de modo mais preciso e com maior sensibilidade, medidas de VPD foram empregadas. A VPD é baseada na aplicação de potencial na forma de pulsos, e medições de corrente são realizadas antes e depois da aplicação de cada pulso, o que permite uma melhor discriminação entre a corrente capacitiva (corrente de fundo) e a faradaica (resultante de processos redox). Neste sentido, a contribuição capacitiva para a corrente total é minimizada, enquanto que a corrente faradaica é maximizada [367], o que gera um aumento global na sensibilidade do método [406]. Diferentemente da VC, na VPD apenas um sentido de varredura é aplicado por medida, gerando picos de corrente de formato gaussiano na presença de espécies eletroativas [406]. Os resultados obtidos a partir das medidas de VPD na presença das amostras de interesse são apresentados na Figura 3.27. Similarmente ao observado nas medidas de VC, picos de

corrente na faixa de 0,4 a 0,5 V foram observados tanto para os extratos de *C. sativa* quanto para o CBD e THC e suas misturas em diferentes proporções.

Figura 3.27 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo de carbono vítreo (ECV) na ausência e na presença de (a) $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos diferentes extratos de *Cannabis sativa* e (b) $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ das proporções CBD:THC (amplitude de potencial: 50 mV, tempo do pulso de potencial: 50 ms, intervalo: 500 ms) em meio de tampão BR (pH 7.0) contendo 30% (v/v) de metanol.



Fonte: A autora.

Assim como observado nos ensaios empregando métodos espectroscópicos, verificou-se uma atividade antioxidante pronunciada para os extratos analisados também por VPD. Os picos observados dizem respeito sobretudo à oxidação tanto do CBD quanto do THC presentes nos extratos na superfície do ECV. A Tabela 3.5 apresenta os valores de potencial de pico anódico (E_{pa}) para cada amostra estudada.

Tabela 3.5– Valores dos potenciais de pico anódico (E_{pa}) obtidos por voltametria de pulso diferencial (VPD) para os extratos de *Cannabis sativa*.

Extratos	E_{pa} (mV)*
E1	$429,6 \pm 2,1$ a
E2	$493,7 \pm 2,9$ c
E3	$423,7 \pm 3,0$ a
E4	$413,7 \pm 2,7$ a
E5	$517,0 \pm 2,9$ d
E6	$451,3 \pm 2,9$ b

*Valores apresentados como a média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes (a-d) em cada coluna diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Fonte: A autora.

Assim como mencionado anteriormente, os extratos de *C. sativa* também são constituídos de polifenóis e a presença destes compostos juntamente com os canabinóides podem contribuir para as propriedades antioxidantes observadas nos ensaios eletroquímicos. Além disso, a similaridade nos potenciais de oxidação dos extratos estudados indicou que estes

poderiam ter uma composição análoga em termos de espécies eletroativas. Entretanto, verifica-se que os extratos E1, E3 e E4 foram os que apresentaram menores valores de E_{pa} , o que pode ser atribuído à sua maior atividade antioxidante comparando-se com os demais extratos. As diferenças de intensidade entre os picos de corrente podem ser justificadas devido à existência de possíveis interações entre moléculas de CBD e THC e outros compostos fenólicos presentes nos extratos. Tais interações podem ter afetado o transporte de tais canabinóides à superfície do ECV, o que gerou as diferenças observadas na intensidade dos picos.

Ao se analisar os valores de E_{pa} obtidos por VPD para o CBD e o THC puros (Tabela 3.6), foi observado que a atividade antioxidante apresentada pelo CBD foi ligeiramente superior à apresentada pelo THC, uma vez que o valor de E_{pa} para o CBD foi inferior ao obtido para o THC ($p < 0,05$). Estes resultados corroboraram os obtidos nos ensaios de DPPH[•] e HOCl e isto pode ser uma consequência do maior número de grupos hidroxilas fenólicas na molécula de CBD comparado ao THC. Em relação às diferentes proporções CBD:THC, foi observada uma tendência similar aos resultados obtidos nos ensaios de ABTS^{•+} e HOCl, com cada proporção analisada apresentando resultados de E_{pa} estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Portanto, a técnica de VPD também permitiu comprovar a existência de efeitos sinérgicos e antagônicos entre tais moléculas (Tabela 3.6) em relação ao seu poder antioxidante. Novamente, as diferenças nas intensidades dos picos de corrente podem ser consequência de alterações no transporte de tais moléculas à superfície do eletrodo de trabalho dependendo da proporção analisada.

Tabela 3.6 – Valores dos potenciais de picos anódicos (E_{pa}) obtidos por análises de voltametria de pulso diferencial (VPD) para o CBD, THC e para as diferentes proporções.

CBD:THC (m/m)	E_{pa} (mV)*
CBD	448,2 ± 1,0 d
THC	463,2 ± 0,8 e
90:10	438,1 ± 1,0 c
75:25	420,0 ± 0,3 b
50:50	488,4 ± 0,1 f
25:75	503,5 ± 0,1 g
10:90	423,0 ± 0,1 a

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes (a-g) em cada coluna diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Fonte: A autora.

3.4.5 Correlação entre os resultados de atividade antioxidante obtidos pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos

Uma boa correlação negativa foi observada entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (CI_{50}) obtida pelos métodos de DPPH $^{\bullet}$ ($r = -0,7724$) e ABTS $^{+\bullet}$ ($r = -0,8180$) para os extratos de *C. sativa* (Tabela 3.7). Neste caso, a presença de compostos fenólicos pode ser, em parte, responsável pelo efeito antioxidante observado para os extratos. Entretanto, uma baixa correlação foi verificada para o conteúdo de flavonoides totais e a atividade antioxidante pelos métodos utilizados nesse estudo. Isso sugere que os não-flavonoides, assim como os canabinóides, contribuem para a atividade antioxidante observada para os extratos. Além disso, uma baixa correlação foi observada entre os métodos de HOCl, DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{+\bullet}$ ou DPV (E_{pa}) para os extratos, o que indica que os antioxidantes que reagem rapidamente com os radicais *in vivo* (como o HOCl) podem reagir lentamente ou serem inertes aos radicais DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{+\bullet}$. Desta forma, as diferentes classes de compostos que estão presentes nos extratos podem, de fato, possuírem diferentes mecanismos de ação antioxidante.

Tabela 3.7 – Correlação de Pearson entre o conteúdo de compostos fenólicos totais, conteúdo de flavonoides totais e atividade antioxidante dos extratos de *Cannabis sativa* obtida por métodos espectrofotométricos e eletroquímicos.

	Fenólicos totais	Flavonoides totais	DPPH $^{\bullet}$	ABTS $^{+\bullet}$	HOCl	DPV
Fenólicos totais	1	-0,2074	-0,7724	-0,8180	-0,5221	-0,6793
Flavonoides totais		1	-0,1914	0,3751	0,2004	0,2443
DPPH $^{\bullet}$			1	0,7327	-0,0042	0,7629
ABTS $^{+\bullet}$				1	0,3540	0,9064
HOCl					1	0,2165
DPV						1

Fonte: A autora.

As análises de correlação de Pearson revelaram uma boa correlação entre a atividade antioxidante obtida para os métodos de DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{+\bullet}$ ($r = 0,7327$), DPPH $^{\bullet}$ e DPV ($r = 0,7629$) e ABTS $^{+\bullet}$ e DPV ($r = 0,9064$) para os extratos de *C. sativa* (Tabela 3.7). Estes resultados sugerem que estes extratos são constituídos por compostos doadores de átomos de hidrogênio e elétrons, o que justifica a alta atividade antioxidante. As análises de correlação de Pearson também demonstraram uma boa correlação entre os métodos de ABTS $^{+\bullet}$ e DPV ($r = 0,8994$) e HOCl e DPV ($r = 0,7734$) para as diferentes proporções entre CBD e THC (Tabela 3.8). Como mencionado anteriormente, sugere-se que o CBD e o THC podem exercer seus efeitos

antioxidantes por meio da doação de átomos de hidrogênio e de elétrons. Contudo, uma baixa correlação foi observada entre o ensaio de DPPH[•] e os resultados obtidos pelos ensaios eletroquímicos. Isto pode ser justificado devido pelo fato de que os canabinóides podem reagir lentamente com os radicais DPPH[•]. As diferenças entre os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos podem ser explicadas como devidas aos diferentes mecanismos envolvidos na ação antioxidante do CBD e THC.

Tabela 3.8 – Correlação de Pearson entre a atividade antioxidante obtida pelos métodos espectrofotométricos e eletroquímicos para as proporções entre CBD:THC.

	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	HOCl	DPV
DPPH [•]	1	-0,4294	0,2730	-0,2934
ABTS ^{•+}		1	0,6492	0,8994
HOCl			1	0,7734
DPV				1

Fonte: A autora.

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste estudo, foi demonstrado que extratos de *C. sativa* são constituídos por canabinóides, compostos fenólicos e flavonoides, e apresentaram promissora atividade antioxidante por métodos espectrofotométricos (poder redutor, DPPH[•], ABTS^{•+} e HOCl) e eletroquímicos (VC e VPD). Entretanto, diferenças no efeito foram observadas de acordo com o método utilizado e a constituição química de cada extrato. Os resultados revelaram um baixo teor de flavonoides, o que sugeriu que os extratos são constituídos principalmente por não-flavonoides. O extrato E1 apresentou o maior teor de polifenóis quando comparado com os demais extratos deste estudo.

As diferentes proporções entre CBD e THC também exibiram efeito antioxidante nos métodos utilizados. Entretanto, no ensaio de DPPH[•] foi observado que o CBD exibiu maior efeito comparado ao THC, devido à sua maior habilidade em doar átomos de hidrogênio para estabilizar este radical. Além disso, observou-se que as proporções formadas principalmente por CBD exibiram os maiores efeitos. Os resultados também sugeriram que os polifenóis presentes nos extratos parecem contribuir na ação antioxidante.

Todos os extratos de *C. sativa* exibiram atividade antioxidante no ensaio de ABTS^{•+} e poder redutor, o que sugeriu que estes atuam como doadores de elétrons neste efeito. O CBD e o THC, assim como as suas diferentes proporções, também exibiram efeito considerável por este método. Entretanto, a proporção formada por 10:90 (m/m) (CBD:THC) exibiu o maior

efeito, enquanto a proporção 90:10 (m/m) (CBD:THC) apresentou o menor efeito, quando comparados com os resultados dos canabinóides isolados. Além disso, todas as amostras analisadas também foram eficientes no sequestro de HOCl e resultados similares aos obtidos no ensaio de ABTS^{•+} foram observados.

Neste estudo, verificou-se que os extratos de *C. sativa* apresentaram atividade antioxidante por métodos eletroquímicos, e os resultados sugeriram que estes são constituídos por espécies eletroativas semelhantes, já que apresentaram valores de potencial de oxidação análogos. Como observado nos ensaios de ABTS^{•+} e HOCl, dependendo da razão entre CBD e THC, houve um aumento ou redução na atividade antioxidante destes canabinóides. Ainda, foi observada uma boa correlação entre os resultados obtidos pelos métodos eletroquímicos e espectrofotométricos.

Este estudo permitiu concluir que os extratos de *C. sativa* e de seus principais constituintes químicos apresentaram atividade antioxidante por diferentes métodos, e atuam como doadores de elétrons e átomos de hidrogênio. Ainda, dependendo da razão entre CBD e THC presente em uma amostra, pode-se verificar um aumento ou redução da atividade antioxidante. Além disso, este trabalho permitiu concluir que as técnicas eletroquímicas podem ser eficazmente empregadas na avaliação de amostras contendo canabinóides. No entanto, mais estudos são necessários em relação à atividade antioxidante *in vivo* destas amostras.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho foi avaliada a citotoxicidade de extratos, frações e do óleo essencial de *C. citratus*, assim como dos principais terpenos (cital e geraniol) presentes nesta planta. Foi demonstrado que as frações acetato de etila, as quais mostraram uma potente atividade antioxidante avaliada por diferentes métodos *in vitro* e com altos teores de polifenóis, foram consideradas citotóxicas para as células humanas apenas em altas concentrações. O citral, geraniol e o óleo essencial também foram citotóxicos e interagiram com os componentes das membranas dos eritrócitos apenas em concentrações elevadas. Vale ressaltar que os extratos e frações exibiram atividade antioxidante [1] em concentrações inferiores às avaliadas neste trabalho.

O peixe-zebra mostrou ser um modelo animal alternativo eficiente na avaliação dos efeitos ansiolítico e anticonvulsivante de extratos provenientes da *C. citratus*, assim como de compostos relacionados. Neste estudo, foi demonstrado que os receptores GABA_A estão envolvidos nos efeitos observados para estas amostras. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar o envolvimento de outros receptores nos efeitos. Portanto, os resultados obtidos corroboraram o uso tradicional da *C. citratus* na prevenção de distúrbios relacionados ao SNC.

De maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram o efeito sinérgico entre compostos isolados em determinadas misturas, como o citral e o geraniol, nos efeitos ansiolítico e anticonvulsivante, e o CBD e THC na atividade antioxidante, por métodos espectrofotométricos e eletroquímicos. Além disso, os extratos de *C. sativa* também são constituídos por polifenóis e canabinóides, e a mistura entre estes compostos ocasionou um aumento no efeito antioxidante. Por fim, as técnicas eletroquímicas se mostraram uma ferramenta útil na avaliação da atividade antioxidante de extratos de *C. sativa* e de canabinóides.

4.2 PERSPECTIVAS

Os resultados promissores obtidos com os extratos de *C. citratus* e *C. sativa* apresentados abriram novas perspectivas de estudo que podem ser exploradas em trabalhos futuros, tanto em relação à extração de compostos bioativos, quanto à avaliação de outras atividades biológicas e toxicidade destas plantas. Entre tais perspectivas, pode-se citar:

- Emprego de novos procedimentos de extração, assim como de solventes para a identificação de componentes bioativos;
- Avaliação da toxicidade das frações das plantas e dos compostos isolados em modelos *in vivo*;
- Avaliação de outros mecanismos envolvidos nos efeitos ansiolítico e anticonvulsivante das amostras de *C. citratus*, citral e geraniol;
- Investigação do efeito neuroprotetor dos extratos de *C. sativa*, assim como dos compostos isolados CBD e THC em células humanas neuronais.

REFERÊNCIAS

- [1] HACKE, A. C. M. et al. Ethyl acetate fraction of *Cymbopogon citratus* as a potential source of antioxidant compounds. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 3642–3652, 2018.
- [2] DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- [3] NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.
- [4] GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43–49, 2005.
- [5] CARMONA, F.; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 379–385, 2013.
- [6] DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- [7] ESTEVES, C. O. et al. Phytotherapeutic drugs: prevalence, advantages, and disadvantages of use in clinical practice, profile and evaluation of users. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 5, 2020.
- [8] MENSAH, M. L. K. et al. **Toxicity and Safety Implications of Herbal Medicines Used in Africa**. In: Herbal Medicine. Ed. P. Builders. London: IntechOpen, 2019.
- [9] RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018.
- [10] BHAGYANATHAN, N. K.; THOPPIL, J. E. Pre-apoptotic activity of aqueous extracts of *Cynanchum sarcomedium* Meve & Liede on cells of *Allium cepa* and human erythrocytes. **Protoplasma**, v. 253, n. 6, p. 1433–1438, 2016.
- [11] SUWALSKY, M. et al. Morphological Effects and Antioxidant Capacity of *Solanum crispum* (Natre) In Vitro Assayed on Human Erythrocytes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 249, p. 349–361, 2016.
- [12] FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205–217, 2004.
- [13] GULDIKEN, B. et al. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 37–49, 2018.
- [14] CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.
- [15] SARRIS, J. et al. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of

psychopharmacology and clinical evidence. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 841–860, 2011.

[16] SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders : 10 - year updated review. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1147–1162, 2018.

[17] SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Medica**, v. 85, n. 8, p. 619–636, 2019.

[18] HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. **Herbal Medicine**; Builders, P., Ed.; IntechOpen Limited: London, UK, 2018.

[19] JUNIOR, V. F. V; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

[20] ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.

[21] ALVAREZ, M. A. **Plant Biotechnology for Health: From secondary metabolites to molecular farming**. Ed. Springer, Cham., 2014.

[22] ZAYNAB, M. et al. Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, p. 103728, 2019.

[23] BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617–633, 1994.

[24] ZAYNAB, M. et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198–202, 2018.

[25] ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 3, p. 403–412, 2005.

[26] CUTRIM, C. S.; CORTEZ, M. A. S. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 3, p. 564–578, 2018.

[27] GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

[28] LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, 2020.

[29] AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

[30] FANG, C.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 83–98, 2019.

[31] BUHAESCU, I.; IZZEDINE, H. Mevalonate pathway: A review of clinical and

therapeutical implications. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 9–10, p. 575–584, 2007.

[32] COX-GEORGIAN, D. et al. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. **Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy**, v. 12, p. 333–359, 2019.

[33] HUANG, A. C.; OSBOURN, A. Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. **Pest Management Science**, v. 75, n. 9, p. 2368–2377, 2019.

[34] EISENREICH, W. et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 12, p. 1401–1426, 2004.

[35] DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**. Ed. John Wiley & Sons, 2002.

[36] GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, p. 425–430, 1990.

[37] AUGUSTYNIAK, A. et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1216–1262, 2010.

[38] RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

[39] BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

[40] KABERA, J. N. et al. Plant secondary metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377–392, 2014.

[41] SANTOS-SÁNCHEZ, N. F. et al. **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. Ed. IntechOpen, 2019.

[42] SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

[43] KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.

[44] CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

[45] PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural products**, v. 63, n. 42, p. 1035–1042, 2000.

[46] LA ROSA, L. A. et al. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and**

Vegetables. Ed. Elsevier Inc., 2018.

[47] EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 5, p. 321–337, 2015.

[48] HAQUE, A. N. M. A.; REMADEVI, R.; NAEBE, M. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. **Cellulose**, v. 25, p. 5455–5477, 2018.

[49] OLADEJI, O. S. et al. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scientific African**, v. 6, p. e00137, 2019.

[50] DUDHGAONKAR, S. et al. Evaluation of anti-depressant effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) in albino mice. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 656, 2014.

[51] GBENOU, J. D. et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1127–1134, 2013.

[52] NAMBIAR, V.; MATELA, H. Potential functions of Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) in health and disease. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v. 3, n. 5, p. 1035–1043, 2012.

[53] SAAD, B. et al. **Anti-diabetes and anti-obesity medicinal plants and phytochemicals.** Ed. Springer: Basel, Switzerland, 2017.

[54] CERCATO, L. M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 286–296, 2015.

[55] OCHWANG'I, D. O. et al. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1040–1055, 2014.

[56] BIDINOTTO, L. T. et al. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 536–544, 2011.

[57] WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SOONTORNTANASART, T. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 7, p. 551–554, 1996.

[58] TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 253–258, 2007.

[59] SIMÕES, D. M. et al. Vascular activity of infusion and fractions of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in human arteries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, p. 112947, 2020.

- [60] FIGUEIRINHA, A. et al. Anti-Inflammatory Activity of *Cymbopogon citratus* Leaf Infusion in Lipopolysaccharide-Stimulated Dendritic Cells: Contribution of the Polyphenols. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 3, p. 681–690, 2010.
- [61] UMUKORO, S. et al. *Cymbopogon citratus* aqueous leaf extract attenuates neurobehavioral and biochemical changes induced by social defeat stress in mice. **Chinese Herbal Medicines**, v. 12, n. 3, p. 303–309, 2020.
- [62] PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *melissa officinalis*, *matricaria recutita* and *cymbopogon citratus*. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 5, p. 973–983, 2009.
- [63] CAMPOS, J. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein. **Food Chemistry**, v. 151, p. 175–181, 2014.
- [64] CÁPIRO, N. et al. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus*(dc.) stapf. ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, v. 20, n. 1, p. 33–37, 2001.
- [65] EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E. E.; DANIEL, N. E. Phytochemical Constituents , Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 1, p. 133–141, 2014.
- [66] TAVARES, F. et al. *Cymbopogon citratus* industrial waste as a potential source of bioactive compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 13, p. 2652–2659, 2015.
- [67] COSTA, G. et al. Flavan hetero-dimers in the *Cymbopogon citratus* infusion tannin fraction and their contribution to the antioxidant activity. **Food and Function**, v. 6, n. 3, p. 932–937, 2015.
- [68] CHEEL, J. et al. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2511–2517, 2005.
- [69] HAQUE, A. N. M. A.; REMADEVI, R.; NAEBE, M. Lemongrass (*Cymbopogon*) : a review on its structure , properties, applications and recent developments. **Cellulose**, v. 25, n. 10, p. 5455–5477, 2018.
- [70] ASAOLU, M. F.; OYEYEMI, O. A.; OLANLOKUN, J. O. Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus*. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 12, p. 1920–1922, 2009.
- [71] DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.
- [72] SCHANEBERG, B. T.; KHAN, I. A. Comparison of extraction methods for marker

compounds in the essential oil of lemon grass by GC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1345–1349, 2002.

[73] TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.

[74] RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

[75] BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

[76] RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

[77] MAJEWSKA, E. et al. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 69, n. 4, p. 327–341, 2019.

[78] BARBOSA, L. C. A. et al. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf samples. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1864–1874, 2008.

[79] COSTA, C. A. R. D. A. et al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 828–836, 2011.

[80] GOES, T. C. et al. Effect of lemongrass aroma on experimental anxiety in humans. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 12, p. 766–773, 2015.

[81] FRANCISCO, V. et al. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 818–827, 2011.

[82] ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601–611, 2015.

[83] PEDROSO, R. B. et al. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. **Acta Protozoologica**, v. 45, n. 3, p. 231–240, 2006.

[84] AVOSEH, O. et al. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438–7453, 2015.

[85] GANJEWALA, D.; GUPTA, A. K.; MUHURY, R. An Update on Bioactive Potential of a Monoterpene Aldehyde Citral: **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 2, n. 4, p. 186–199, 2012.

[86] QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Carvacrol, (-)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6566–6572, 2010.

- [87] QUINTANS, L. J. et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 497–502, 2011.
- [88] VALE, T. G. et al. Central effects of citral , myrcene and limonene , constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N . E . Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709–714, 2002.
- [89] CARVALHO, K. I. M. DE et al. Geraniol - A flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 4, p. 355–365, 2014.
- [90] MACZKA, W.; WINSKA, K.; GRABARCZYK, M. One hundred faces of Geraniol. **Molecules**, v. 25, p. 3303, 2020.
- [91] CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643–651, 2010.
- [92] REKHA, K. R.; INMOZHI SIVAKAMASUNDARI, R. Geraniol Protects Against the Protein and Oxidative Stress Induced by Rotenone in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 10, p. 1947–1962, 2018.
- [93] HASSAN, M. et al. Monoterpene alcohol metabolism: Identification, purification, and characterization of two geraniol dehydrogenase isoenzymes from *Polygonum minus* leaves. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 8, p. 1463–1470, 2012.
- [94] GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in genus *Cymbopogon*. **Natural product Communications**, v. 5, n. 1, p. 163–172, 2014.
- [95] VUONG, Q. V. **Utilisation of bioactive compounds from Agricultural and Food Waste**. Ed. CRC Press: Boca Raton, EUA, 2017.
- [96] MOREIRA, D. DE L. et al. Traditional use and safety of herbal medicines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 2, p. 248–257, 2014.
- [97] CHANDA, S. et al. Medicinal Plants - From traditional use to toxicity assessment: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 7, p. 2652–2670, 2015.
- [98] NDHLALA, A. R. et al. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 609–621, 2013.
- [99] MCGAW, L. J.; ELGORASHI, E. E.; ELOFF, J. N. **Toxicological survey of African medicinal plants**. Ed. Elsevier Inc., 2014.
- [100] SUWALSKY, M.; DUGUET, J.; SPEISKY, H. An In Vitro Study of the Antioxidant and Antihemolytic Properties of *Buddleja globosa* (Matico). **Journal of Membrane Biology**, v. 250, n. 3, p. 239–248, 2017.
- [101] SUWALSKY, M. et al. Morphological Effects and Antioxidant Capacity of *Solanum crispum* (Natre) In Vitro Assayed on Human Erythrocytes. **Journal of Membrane Biology**, v.

249, n. 3, p. 349–361, 2016.

[102] SUWALSKY, M. et al. Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolochia chilensis* (Maqui) leaves. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1–2, p. 85–90, 2008.

[103] PHAN, H. T. T. et al. Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2670–2677, 2014.

[104] SINHA, S. et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71–77, 2014.

[105] KOFFI, K. et al. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 29–34, 2009.

[106] CHIAMENTI, L. et al. Cytotoxicity and antiviral activity evaluation of cymbopogon spp hydroethanolic extracts. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–9, 2019.

[107] KPOVIESSI, S. et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652–659, 2014.

[108] SOUZA, A. C. S. et al. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 435–440, 2020.

[109] QUEIROZ, T. B. et al. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1–12, 2017.

[110] LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 9–27, 2015.

[111] MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31 - 34, 1982.

[112] MISCHELL, B. B.; SHIINGI, S. M. **Selected Methods in Cellular Immunology**. Ed. Freeman Company, 1980.

[113] GODAL, H. C.; HEISTØ, H. High Prevalence of Increased Osmotic Fragility of Red Blood Cells among Norwegian Blood Donors. **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 27, n. 1, p. 30–34, 1981.

[114] SOARES, V. C. G.; VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 835–838, 2006.

[115] SOBRAL, M. V. et al. Review Article Antitumor Activity of Monoterpenes Found in

Essential Oils. **Hindawi Publishing Corporation e Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

[116] MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513–524, 1998.

[117] LIBRALATO, G. et al. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 35–49, 2016.

[118] AKHALWAYA, S.; VUUREN, S. VAN; PATEL, M. An in vitro investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 359–371, 2018.

[119] PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.

[120] HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 1, p. 9–18, 2014.

[121] SALEH-E-IN, M. M. et al. Pharmacological effects of the phytochemicals of *Anethum sowa* L. root extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, 2016.

[122] KARCHESY, Y. M. et al. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2016.

[123] AKHALWAYA, S.; VUUREN, S. VAN; PATEL, M. An in vitro investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 359–371, 2018.

[124] LOPALCO, P. et al. Lipid profile changes during the development of *Artemia franciscana*, from cysts to the first two naupliar stages. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1–11, 2019.

[125] **How To Hatch Brine Shrimp**. Disponível em: <<https://www.thesaltsyde.com/how-to-hatch-brine-shrimp/>>. Acesso em: 7 apr. 2021.

[126] BUSSMANN, R. W. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 121–140, 2011.

[127] LEITE, A. M. et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 842–846, 2009.

[128] SUBHADRA, S. et al. Comparative toxicity assessment of three *Tephrosia* species on *Artemia salina* and animal cell lines. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 2, n. 3, p. 143, 2011.

[129] HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 1,

p. 27–40, 2006.

[130] SELVARAJ, S. et al. Influence of membrane lipid composition on flavonoid-membrane interactions: Implications on their biological activity. **Progress in Lipid Research**, v. 58, p. 1 - 13, 2015.

[131] KAJIYA, K. et al. Role of Lipophilicity and Hydrogen Peroxide Formation in the Cytotoxicity of Flavonols. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 1227–1229, 2001.

[132] CRISTANI, M. et al. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300–6308, 2007.

[133] NTUNGWE N, E. et al. Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 2020.

[134] R. HAMIDI, M.; JOVANOVA, B.; KADIFKOVA PANOVSKA, T. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, p. 9–18, 2014.

[135] OTANG, M. Assessment of potential toxicity of three South African medicinal plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) assay. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 20, p. 1272–1279, 2013.

[136] FILHO, V. M. B. et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280–288, 2014.

[137] CUNHA, F. A. B. DA et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 2016.

[138] DUARTE, A. E. et al. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of raphiodon echinus (Nees & Mart.) schauer. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2016.

[139] STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, p. 1–3, 2015.

[140] HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 1, p. 27–40, 2006.

[141] PRASAD, K. D. et al. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 5, p. 846–854, 2007.

[142] ALÍA, M. et al. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). **Journal of Biochemical and**

Molecular Toxicology, v. 19, n. 2, p. 119–128, 2005.

[143] PAGANO, M.; FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, n. 6, p. 351–355, 2015.

[144] ARAÚJO, M. G. DE F. et al. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 9260–9277, 2012.

[145] WACZUK, E. P. et al. Euphorbia tirucalli aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 739–748, 2015.

[146] CHIKEZIE, P.; UWAKWE, A. Membrane stability of sickle erythrocytes incubated in extracts of three medicinal plants: *Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, and *Terminalia catappa*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 26, p. 121, 2011.

[147] FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73–83, 2018.

[148] FREITAS, M. V. et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 219–224, 2008.

[149] ROSSI, R. et al. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 37, n. 3, p. 180–187, 2006.

[150] **Hemolytic Anemia**. Disponível em: <<https://factdr.com/health-conditions/haemolytic-anaemia/>>. Acesso em: 22 feb. 2021.

[151] ALHANATY, E.; SHEETZ, M. P. Control of the erythrocyte membrane shape: Recovery from the effect of crenating agents. **Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 3 I, p. 884–888, 1981.

[152] BARROS, F. J. et al. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n. 4, p. 505–512, 2016.

[153] TAMIR, I. et al. The hemolytic activity of citral: Evidence for free radical participation. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 19, p. 2945–2950, 1984.

[154] RUDENKO, S. V. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 9, p. 1767–1778, 2010.

[155] SEGAL, R.; MILO-GOLDZWEIG, I. The hemolytic activity of citral-II. Glutathione depletion in citral treated erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 23, p. 4117–4119, 1985.

[156] MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 27, n. 1, p. 323–329, 2013.

- [157] CRASKE, M. G. et al. What is an anxiety disorder? **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 12, p. 1066–1085, 2009.
- [158] WHO. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, p. 1–24, 2017.
- [159] GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545–552, 2004.
- [160] LEONARDO, E. D.; HEN, R. Anxiety as a developmental disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 134–140, 2008.
- [161] FEDOTOVA, J. et al. Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, p. 437–446, 2017.
- [162] SLEE, A. et al. Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, v. 393, n. 10173, p. 768–777, 2019.
- [163] KUMAR, A.; CHANANA, P. Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target. **Vitamins and Hormones**, v. 103, p. 147 - 167, 2017.
- [164] SINCLAIR, L. I.; NUTT, D. J. **Handbook of Clinical Neurology**. 3^a ed. Elsevier, 2012.
- [165] HOOD, S. D. et al. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 285–294, 2012.
- [166] UZUN, S. et al. Side effects of treatment with benzodiazepines. **Psychiatria Danubina**, v. 22, n. 1, p. 90–93, 2010.
- [167] WHO. **Epilepsy: a public health imperative**. 2019.
- [168] DEVINSKY, O. et al. Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–24, 2018.
- [169] SHORVON, S. D. The causes of epilepsy: Changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. **Epilepsia**, v. 52, p. 1033–1044, 2011.
- [170] SHIN, H. W. et al. Review of Epilepsy - Etiology, Diagnostic Evaluation and Treatment. **International Journal of Neurorehabilitation**, v. 1, p. 1–8, 2014.
- [171] ELGER, C. E.; SCHMIDT, D. Modern management of epilepsy: A practical approach. **Epilepsy and Behavior**, v. 12, p. 501–539, 2008.
- [172] ENGEL, J.; PEDLEY, T. A. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- [173] **Epilepsy**. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/ency/article/000694.htm>>. Acesso em: 13 feb. 2021.
- [174] FRIEDMAN, D.; DEVINSKY, O. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. **New**

England Journal of Medicine, v. 373, n. 11, p. 1048–1058, 2015.

[175] ZHU, S. et al. Structure of a human synaptic GABAA receptor. **Nature**, v. 559, n. 7712, p. 67–88, 2018.

[176] TREIMAN, D. M. GABAergic mechanisms in epilepsy. **Epilepsia**, v. 42, p. 8–12, 2001.

[177] FLYNN, S.; BABI, M. A. **Pharmacology and Therapeutics for Dentistry**. 7^a ed. Elsevier, 2017.

[178] FAJEMIROYE, J. O. et al. Treatment of anxiety and depression: Medicinal plants in retrospect. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 198–215, 2016.

[179] SAVAGE, K. et al. GABA-modulating phytochemicals for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 1, p. 3–18, 2018.

[180] ZHU, H. L. et al. Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 3–16, 2014.

[181] REHMAN, M. U. et al. Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 3, p. 247–267, 2018.

[182] BROGDEN, R. N.; GOA, K. L. Flumazenil: A Preliminary Review of its Benzodiazepine Antagonist Properties, Intrinsic Activity and Therapeutic Use. **Drugs**, v. 35, n. 4, p. 448–467, 1988.

[183] WALIA, K. S. et al. Side Effects of Antiepileptics- A Review. **Pain Practice**, v. 4, n. 3, p. 194–203, 2004.

[184] XU, Y. et al. Novel Therapeutic Targets in Depression and Anxiety: Antioxidants as a Candidate Treatment. **Current Neuropharmacology**, v. 12, n. 2, p. 108–119, 2014.

[185] WASOWSKI, C.; MARDER, M. Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 4, p. 9–24, 2012.

[186] HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid modulation of GABA A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 234–245, 2011.

[187] WANG, Z. J.; HEINBOCKEL, T. Essential oils and their constituents targeting the gabaergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1061, 2018.

[188] CHIOCA, L. R. et al. Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 412–418, 2013.

[189] MANCHISHI, S. M. Recent Advances in Antiepileptic Herbal Medicine. **Current Neuropharmacology**, v. 16, p. 79–83, 2018.

[190] BLANCO, M. M. et al. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus*

in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 265–270, 2009.

[191] GOES, T. C. et al. Effect of Lemongrass Aroma on Experimental Anxiety in Humans. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 12, p. 766–773, 2015.

[192] SILVA, M. R. et al. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 381, n. 5, p. 415–426, 2010.

[193] PINA, L. T. S. et al. Monoterpenes as a perspective for the treatment of seizures: A Systematic Review. **Phytomedicine**, v. 81, p. 153422, 2021.

[194] ARAÚJO-FILHO, J. V. DE et al. Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 294–299, 2018.

[195] MELO, M. S. et al. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 697–703, 2011.

[196] SONG, Y. et al. Limonene has anti-anxiety activity via adenosine A2A receptor-mediated regulation of dopaminergic and GABAergic neuronal function in the striatum. **Phytomedicine**, v. 83, p. 153474, 2021.

[197] SOUSA, D. P. DE et al. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 231–235, 2006.

[198] LINS, L. C. R. F. et al. The anticonvulsant effect of geraniol and inclusion complex geraniol: β -cyclodextrin. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 5, p. 557–565, 2014.

[199] ZIEMBA, P. M. et al. Activation and modulation of recombinantly expressed serotonin receptor type 3A by terpenes and pungent substances. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 1090–1096, 2015.

[200] DINIZ, T. C. et al. Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074–1087, 2019.

[201] VIOLA, H. et al. Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand with Anxiolytic Effects. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 213–216, 1995.

[202] SHEN, M. L. et al. Luteolin inhibits GABA A receptors in HEK cells and brain slices. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

[203] KOLA, P. K. et al. Naringin in a combined therapy with phenytoin on pentylenetetrazole-induced kindling in rats. **Epilepsy and Behavior**, v. 89, p. 159–168, 2018.

[204] SZWAJGIER, D.; BOROWIEC, K.; PUSTELNIAK, K. The neuroprotective effects of phenolic acids: Molecular mechanism of action. **Nutrients**, v. 9, p. 1–21, 2017.

- [205] GIRISH, C. et al. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 710, p. 49–58, 2013.
- [206] GRIGOLETTO, J. et al. Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. **Epilepsy and Behavior**, v. 62, p. 27–34, 2016.
- [207] COELHO, V. R. et al. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. **Life Sciences**, v. 122, p. 65–71, 2015.
- [208] ÇIÇEK, S. S. Structure-Dependent Activity of Natural GABA(A) Receptor Modulators. **molecules**, v. 23, p. 1512, 2018.
- [209] ZHU, S. et al. Structure of a human synaptic GABA A receptor. **Nature**, v. 559, n. 7712, p. 67–88, 2018.
- [210] SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40224–40231, 2012.
- [211] GOETZ, T. et al. GABAA receptors: structure and function in the basal ganglia. **Progress in Brain Research**, v. 160, p. 21–41, 2007.
- [212] GOLAN, D.; TASHJIAN, A. H. **Principios de farmacologia - A base fisiopatologica da farmacologia**, 2^a ed, Guanabara Koogan, 2009.
- [213] SUCHER, N. J.; CARLES, M. C. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 52, p. 308–318, 2015.
- [214] FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 157–171, 2018.
- [215] SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.
- [216] KALUEFF, A. V; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2015.
- [217] MESHALKINA, D. A. et al. Understanding zebrafish cognition. **Behavioural Processes**, v. 141, p. 229–241, 2017.
- [218] SHAMS, S. et al. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 85, p. 176–190, 2018.
- [219] VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 347, 2018.
- [220] FLINN, L. et al. Zebrafish as a new animal model for movement disorders. **Journal of**

Neurochemistry, v. 106, n. 5, p. 1991–1997, 2008.

[221] FEITSMA, H.; CUPPEN, E. Zebrafish as a Cancer Model. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 685–694, 2008.

[222] MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 66–72, 2010.

[223] ADAMSON, K. I.; SHERIDAN, E.; GRIERSON, A. J. Use of zebrafish models to investigate rare human disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 10, p. 641–654, 2018.

[224] LESSMAN, C. A. The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. **Birth Defects Research Part C**, v. 93, n. 3, p. 268–280, 2011.

[225] **Could the Tiny Zebrafish Teach Us to Cure Blindness?** Disponível em: <<https://www.smithsonianmag.com/innovation/could-tiny-zebrafish-teach-us-cure-blindness-180962626/>>. Acesso em: 22 aug. 2020.

[226] STEWART, A. et al. Modeling Anxiety in Zebrafish Review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135–143, 2013.

[227] MAGNO, L. D. P. et al. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 169–176, 2015.

[228] HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

[229] TERAOKA, H.; DONG, W.; HIRAGA, T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. **Congenital Anomalies**, v. 43, p. 123–132, 2003.

[230] SAKAI, C.; IJAZ, S.; HOFFMAN, E. J. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Past, Present, and Future. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 1–18, 2018.

[231] LI, Y. et al. Zebrafish: A promising in vivo model for assessing the delivery of natural products, fluorescence dyes and drugs across the blood-brain barrier. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 246–257, 2017.

[232] KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J.; STEWART, A. M. Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 55, p. 1–6, 2014.

[233] SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1551–1553, 1999.

[234] STEVENS, C. H.; REED, B. T.; HAWKINS, P. Enrichment for Laboratory Zebrafish—

A Review of the Evidence and the Challenges. **Animals**, v. 11, n. 698, p. 1–22, 2021.

[235] STEWART, A. M. et al. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next? **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 2–3, p. 135–143, 2012.

[236] SAMPAIO, T. I. S. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 563–578, 2018.

[237] TORRES-HERNÁNDEZ, B. A.; VALLE-MOJICA, L. M. DEL; ORTÍZ, J. G. Valerenic acid and *Valeriana officinalis* extracts delay onset of Pentylentetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult *Danio rerio* (Zebrafish). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2015.

[238] ROSA-FALERO, C. et al. Citrus aurantium increases seizure latency to PTZ induced seizures in zebrafish thru NMDA and mGluR's I and II. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1–12, 2015.

[239] MUNIANDY, Y. The Use of Larval Zebrafish (*Danio rerio*) Model for Identifying New Anxiolytic Drugs from Herbal Medicine. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 321–339, 2018.

[240] STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

[241] STEWART, A. et al. The developing utility of zebrafish in modeling neurobehavioral disorders. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 104–120, 2010.

[242] VALLE-MOJICA, L. M. DEL; ORTÍZ, J. Anxiolytic properties of *Valeriana officinalis* in the zebrafish: A possible role for metabotropic glutamate receptors. **Planta Medica**, v. 78, p. 1719–1724, 2012.

[243] BENNEH, C. K. et al. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 129–145, 2017.

[244] MELO, N. C. DE et al. Anxiolytic and antidepressant effects of the hydroethanolic extract from the leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) moldenke: A study on zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, 2019.

[245] GONÇALVES, N. G. G. et al. Protein fraction from *Artocarpus altalis* pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotonergic system. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 1037772, 2020.

[246] MAPHANGA, V. B. et al. Screening selected medicinal plants for potential anxiolytic activity using an in vivo zebrafish model. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 12, p. 3641–3652, 2020.

[247] WIDELSKI, J. et al. Coumarins from *seseli devenyense* simonk.: Isolation by liquid–liquid chromatography and potential anxiolytic activity using an in vivo zebrafish larvae model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1829, 2021.

- [248] BRILLATZ, T. et al. Zebrafish bioassay-guided isolation of antiseizure compounds from the Cameroonian medicinal plant *Cyperus articulatus* L. **Phytomedicine**, v. 70, p. 153175, 2020.
- [249] ORELLANA-PAUCAR, A. M. et al. Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. **Epilepsy and Behavior**, v. 24, n. 1, p. 14–22, 2012.
- [250] COPMANS, D.; SIEKIERSKA, A.; WITTE, P. A. M. DE. **Zebrafish Models of Epilepsy and Epileptic Seizures**. 2^a ed. Elsevier Inc., 2017.
- [251] COOPER, K.; FINK, M. The chemical induction of seizures in psychiatric therapy: Were flurothyl (Indoklon) and pentylenetetrazol (Metrazol) abandoned prematurely? **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 34, n. 5, p. 602–607, 2014.
- [252] WHITE, H. S. et al. **Models of Seizures and Epilepsy**. Burlington: Elsevier, 2006
- [253] CORTEZ, M. A.; SNEAD, O. C. **Models of Seizures and Epilepsy**. Burlington: Elsevier, 2007.
- [254] GAWEL, K. et al. Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 116, p. 1–20, 2020.
- [255] FONTANA, B. D. et al. Taurine Protects from Pentylenetetrazole-Induced Behavioral and Neurochemical Changes in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 583–594, 2019.
- [256] YAKSI, E. et al. Past, present and future of zebrafish in epilepsy research. **FEBS Journal**, p. 1–13, 2021.
- [257] KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. Humana Press, 2012.
- [258] MUSSULINI, B. H. M. et al. Seizures Induced by Pentylenetetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- [259] SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.
- [260] KOSALEC, I. et al. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 54, n. 1, p. 65–72, 2004.
- [261] GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011.
- [262] CANZIAN, J. et al. Stress increases susceptibility to pentylenetetrazole-induced seizures in adult zebrafish. **Epilepsy and Behavior**, v. 114, p. 107557, 2021.

- [263] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- [264] WILBUR, K. M.; BERNHEIM, F.; SHAPIRO, O. W. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. **Archives of Biochemistry**, v. 24, p. 305–313, 1949.
- [265] ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.
- [266] AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- [267] GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.
- [268] KALUEFF, A. V. **The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish**. 2017.
- [269] PARKER, M. O. et al. Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2012.
- [270] SOUSA, D. P. DE et al. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18620–18660, 2015.
- [271] ULRICH-MERZENICH, G. et al. Drug development from natural products: Exploiting synergistic effects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 3, p. 208–219, 2010.
- [272] FARIA, A.; MATEUS, N.; CALHAU, C. Flavonoid transport across blood-brain barrier: Implication for their direct neuroprotective actions. **Nutrition and Aging**, v. 1, n. 2, p. 89–97, 2012.
- [273] QIU, T. et al. Exploring the mechanism of flavonoids through systematic bioinformatics analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–12, 2018.
- [274] TAKAHASHI, M. et al. Interspecies Comparison of Chemical Composition and Anxiolytic-like Effects of Lavender Oils upon Inhalation. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 1, p. 1769 - 1774, 2011.
- [275] MEDEIROS, K. A. A. L. et al. Depressant effect of geraniol on the central nervous system of rats : Behavior and ECoG power spectra. **Biomedical Journal**, v. 41, p. 298–305, 2018.
- [276] LINCK, V. DE M. et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 303–307, 2009.
- [277] STEWART, A. et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1421–1431, 2011.

- [278] ZIV, L. et al. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v. 18, p. 681–691, 2013.
- [279] GHORBANI, M. Iranian traditional medicine for treatment of type II diabetes , anxiety and hypertension with introduction of zebrafish model system for their screening. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 5, p. 13–19, 2014.
- [280] DANNERBERG, P.; WEBER, K. H. Chemical structure and biological activity of the diazepines. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 231S–243S, 1983.
- [281] NUSS, P. Neuropsychiatric Disease and Treatment Dovepress Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 165–175, 2015.
- [282] HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 436–443, 2012.
- [283] TANKAM, J. M.; ITO, M. Inhalation of the essential oil of Piper guineense from Cameroon shows sedative and anxiolytic-like effects in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 36, n. 10, p. 1608–14, 2013.
- [284] MOHAMMADI, B. et al. Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA A receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 85–91, 2001.
- [285] HALL, A. C. et al. Modulation of human GABA A and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, p. 9–16, 2004.
- [286] KESSLER, A. et al. GABAA receptor modulation by terpenoids from Sideritis extracts. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 4, p. 851–862, 2014.
- [287] HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 105–113, 2004.
- [288] HUANG, R. Q. et al. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: Mechanism and site of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 3, p. 986–995, 2001.
- [289] DHIR, A. Natural polyphenols in preclinical models of epilepsy. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 6, p. 1268–1281, 2020.
- [290] GALANOPOULOU, A. GABAA Receptors in Normal Development and Seizures: Friends or Foes? **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2008.
- [291] ROGANOVIC, M.; PANTOVIC, S.; DIZDAREVIC, S. Role of the oxidative stress in

the pathogenesis of epilepsy. **Neurological Sciences and Neurophysiology**, v. 36, n. 1, p. 1–8, 2019.

[292] COBLEY, J. N.; FIORELLO, M. L.; BAILEY, D. M. 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. **Redox Biology**, v. 15, p. 490–503, 2018.

[293] SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, p. 201–205, 2017.

[294] PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

[295] MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. **Current Neuropharmacology**, v. 12, p. 527–550, 2014.

[296] GERONZI, U.; LOTTI, F.; GROSSO, S. Oxidative stress in epilepsy. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 18, p. 427–434, 2018.

[297] MORALES-GONZALEZ, J. A. et al. **A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2**. London: IntechOpen, 2016.

[298] AKBAS, S. H.; YEGIN, A.; OZBEN, T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1009–1014, 2005.

[299] SABIR, S. M. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 741–747, 2012.

[300] OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

[301] CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N. et al. Relevance of the glutathione system in temporal lobe epilepsy: Evidence in human and experimental models. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–12, 2014.

[302] RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159–3165, 2007.

[303] SUDHA, K.; RAO, A. V.; RAO, A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. **Clinica Chimica Acta**, v. 303, p. 19–24, 2001.

[304] BHARDWAJ, M.; KUMAR, A. Neuroprotective Effect of Lycopene Against PTZ-induced Kindling Seizures in Mice: Possible Behavioural, Biochemical and Mitochondrial Dysfunction. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 306–313, 2016.

[305] BIKJDAOUENE, L. et al. Changes in brain amino acids and nitric oxide after melatonin

administration in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. **Journal of Pineal Research**, v. 35, n. 1, p. 54–60, 2003.

[306] SHIVA, S.; CASTRO, L.; BROOKES, P. S. **Mitochondria and Nitric Oxide**. 3^a Ed, Elsevier Inc., 2017.

[307] BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007.

[308] HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

[309] BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Cells. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 8, p. 9–19, 2012.

[310] KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620–650, 2002.

[311] VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

[312] PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

[313] **What is Oxidative Stress and how to Analyze it?** Disponível em: <<https://www.h-h-c.com/what-is-oxidative-stress-and-how-to-analyze-it/>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

[314] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGET, J. M. C. Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine: Some problems and Concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, n. 2, p. 501–514, 1986.

[315] UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 65–74, 2009.

[316] PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

[317] SCHAFFER, S. et al. Hypochlorous acid scavenging properties of local Mediterranean plant foods. **Lipids**, v. 39, n. 12, p. 1239–1247, 2004.

[318] HAWKINS, C. L.; BROWN, B. E.; DAVIES, M. J. Hypochlorite-and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 395, n. 2, p. 137–145, 2001.

[319] PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

- [320] BOREK, C. Dietary antioxidants and human cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, n. 4, p. 333–341, 2004.
- [321] BLOOMFIELD, M. A. P. et al. The neuropsychopharmacology of cannabis: A review of human imaging studies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 195, p. 132–161, 2019.
- [322] HINDOCHA, C. et al. The effectiveness of cannabinoids in the treatment of posttraumatic stress disorder (PTSD): A systematic Review. **Journal of Dual Diagnosis**, v. 16, p. 120 - 139, 2018.
- [323] BONINI, S. A. et al. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 300–315, 2018.
- [324] LEONARD, W. et al. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 19, p. 282–308, 2020.
- [325] RUPASINGHE, H. P. V et al. Industrial Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4078, 2020.
- [326] **Uso do cannabidiol para tratamento de epilepsia.** Disponível em: <<https://epilepsiabrasil.org.br/noticias/uso-do-cannabidiol-para-tratamento-de-epilepsia>>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- [327] WILLIAMS, C. M.; STEPHENS, G. J. Development of cannabidiol as a treatment for severe childhood epilepsies. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 24, p. 5509–5517, 2020.
- [328] PREEDY, V. **Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment.** Academic Press, 2016.
- [329] STEELE, G.; ARNESON, T.; ZYLLA, D. A Comprehensive Review of Cannabis in Patients with Cancer: Availability in the USA, General Efficacy, and Safety. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2019.
- [330] DOWNER, E. J. Anti-inflammatory Potential of Terpenes Present in Cannabis sativa L. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 659–662, 2020.
- [331] LAL, S. et al. Cannabis and its constituents for cancer: History, biogenesis, chemistry and pharmacological activities. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105302, 2021.
- [332] HOSAMI, F. et al. The pro-apoptosis effects of Echinacea purpurea and Cannabis sativa extracts in human lung cancer cells through caspase-dependent pathway. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, p. 1–12, 2021.
- [333] COMELLI, F. et al. Beneficial Effects of a Cannabis sativa Extract Treatment on Diabetes-induced Neuropathy and Oxidative Stress. **Phytotherapy research**, v. 23, p. 1678–

1684, 2009.

[334] GUGLIANDOLO, A. et al. Cannabidiol exerts protective effects in an in vitro model of Parkinson's disease activating AKT/mTOR pathway. **Fitoterapia**, v. 143, 2020.

[335] SHEBABY, W. et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity evaluation of Lebanese Cannabis sativa L. ssp. indica (Lam.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 270, p. 113743, 2021.

[336] APPENDINO, G. et al. Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: A structure-activity study. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1427–1430, 2008.

[337] NAFIS, A. et al. Antioxidant activity and evidence for synergism of Cannabis sativa (L.) essential oil with antimicrobial standards. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 396–400, 2019.

[338] ISEPPI, R. et al. Chemical characterization and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from fibre-type cannabis sativa L. (Hemp). **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 7–12, 2019.

[339] NOVAK, J. et al. Essential oils of different cultivars of Cannabis sativa L. And their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 4, p. 259–262, 2001.

[340] CRIPPA, J. A. et al. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 24, p. 515–523, 2009.

[341] ZUARDI, A. W. et al. Inverted U-shaped dose-response curve of the anxiolytic effect of cannabidiol during public speaking in real life. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 259, p. 1–9, 2017.

[342] THORNTON, C. et al. Cannabis constituents reduce seizure behavior in chemically-induced and scn1a-mutant zebrafish. **Epilepsy and Behavior**, v. 110, p. 107152, 2020.

[343] PATRA, P. H. et al. Cannabidiol improves survival and behavioural co-morbidities of Dravet syndrome in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 12, p. 2779–2792, 2020.

[344] JONES, N. A. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 569–577, 2010.

[345] WANG, B. et al. In search of preventive strategies: novel high-CBD Cannabis sativa extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues. **Aging**, v. 12, n. 22, p. 22425–22440, 2020.

[346] KHODADADI, H. et al. Cannabidiol Modulates Cytokine Storm in Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Simulated Viral Infection Using Synthetic RNA. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 5, n. 3, p. 197–201, 2020.

[347] GRACZYK, M.; ŁUKOWICZ, M.; DZIERZANOWSKI, T. Prospects for the Use of Cannabinoids in Psychiatric Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 1–9, 2021.

- [348] ALVES, P. et al. Cannabis sativa: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104822, 2020.
- [349] NELSON, K. M. et al. The Essential Medicinal Chemistry of Cannabidiol (CBD). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12137–12156, 2020.
- [350] ERRIDGE, S. et al. Cannflavins – From plant to patient: A scoping review. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104712, 2020.
- [351] ELSOHL, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 539–548, 2005.
- [352] POLLASTRO, F.; MINASSI, A.; FRESU, L. G. Cannabis Phenolics and their Bioactivities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1160–1185, 2018.
- [353] MACCARRONE, M. Phytocannabinoids and endocannabinoids: different in nature. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 31, p. 931–938, 2020.
- [354] TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, 2018.
- [355] NUUTINEN, T. Medicinal properties of terpenes found in Cannabis sativa and Humulus lupulus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 198–228, 2018.
- [356] REA, K. A. et al. Biosynthesis of cannflavins A and B from Cannabis sativa L. **Phytochemistry**, v. 164, p. 162–171, 2019.
- [357] JIN, D. et al. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. **Scientific Reports**, v. 10, p. 3309, 2020.
- [358] ANDRE, C. M.; HAUSMAN, J. F.; GUERRIERO, G. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–17, 2016.
- [359] IZZO, L. et al. Analysis of Phenolic Compounds in Commercial Cannabis sativa L inflorescences using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. **Molecules**, v. 25, n. 631, p. 1–12, 2020.
- [360] ANDRE, C. M.; HAUSMAN, J.-F.; GUERRIERO, G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–17, 2016.
- [361] THAKUR, G. A.; DUCLOS, R. I.; MAKRIYANNIS, A. Natural cannabinoids: Templates for drug discovery. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 454–466, 2005.
- [362] BREIJYEH, Z. et al. Cannabis: A Toxin-Producing Plant with Potential Therapeutic Uses. **Toxins**, v. 13, p. 2–2, 2021.
- [363] JANATOVÁ, A. et al. Yield and cannabinoids contents in different cannabis (Cannabis sativa L.) genotypes for medical use. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. 2017, p. 363–367, 2018.

- [364] RUSSO, E.; GUY, G. W. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **Medical Hypotheses**, v. 66, n. 2, p. 234–246, 2006.
- [365] RUSSO, E. B. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344–1364, 2011.
- [366] BRIGHENTI, V. et al. Emerging challenges in the extraction, analysis and bioanalysis of cannabidiol and related compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, p. 113633, 2021.
- [367] SMITH, J. P.; SUTCLIFFE, O. B.; BANKS, C. E. An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs). **Analyst**, v. 140, n. 15, p. 4932–4948, 2015.
- [368] MCPARTLAND, J. M.; RUSSO, E. B. Cannabis and Cannabis extracts: Greater than the sum of their parts? **Journal of Cannabis Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 103–132, 2012.
- [369] AMAR, M. B. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 1–25, 2006.
- [370] MARCU, J. P. et al. Cannabidiol enhances the inhibitory effects of Δ^9 - tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 180–189, 2010.
- [371] GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. **Biomolecules**, v. 10, n. 1575, 2020.
- [372] ZLEBNIK, N. E.; CHEER, J. F. Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for disorders of motivation? **Annual Review of Neuroscience**, v. 39, p. 1–17, 2016.
- [373] JONES, P. G. et al. Cannabidiol. **Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 3211–3214, 1977.
- [374] ELSOHL, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 539–548, 2005.
- [375] MECHOULAM, R.; HANUŠ, L. Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 121, p. 35–43, 2002.
- [376] BOGGS, D. L. et al. Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 142–154, 2018.
- [377] PISANTI, S. et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 175, p. 133–150, 2017.
- [378] HAYAKAWA, K. et al. Repeated treatment with cannabidiol but not Δ^9 -

tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 4, p. 1079–1087, 2007.

[379] VARVEL, S. A. et al. Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 2, p. 226–234, 2006.

[380] KLEIN, C. et al. Cannabidiol potentiates Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 2, p. 443–457, 2011.

[381] MICALIZZI, G. et al. Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, p. 461864, 2021.

[382] FATHORDOOBADY, F. et al. Hemp (Cannabis Sativa L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. **Food Reviews International**, v. 35, n. 7, p. 664–684, 2019.

[383] HAMPSON, A. J. et al. Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 8268–8273, 1998.

[384] CHEN, Y.; BUCK, J. Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 293, n. 3, p. 807–812, 2000.

[385] GARCÍA-ARENCIBIA, M. et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Research**, v. 1134, n. 1, p. 162–170, 2007.

[386] GIACOMO, V. DI et al. Antioxidant and neuroprotective effects induced by cannabidiol and cannabigerol in rat CTX-TNA2 astrocytes and isolated cortexes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3575, 2020.

[387] BORGES, R. S. et al. Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12663–12674, 2013.

[388] VACEK, J. et al. Free Radical Biology and Medicine Antioxidant function of phytocannabinoids: Molecular basis of their stability and cytoprotective properties under UV-irradiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 164, p. 258–270, 2021.

[389] LIPINA, C.; HUNDAL, H. S. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. **Open Biology**, v. 6, p. 150276, 2016.

[390] FOUDA, M. A.; GHOVANLOO, M. R.; RUBEN, P. C. Cannabidiol protects against high glucose-induced oxidative stress and cytotoxicity in cardiac voltage-gated sodium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 13, p. 2932–2946, 2020.

[391] MUSCARÀ, C. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of two standardized extracts from a new Chinese accession of non-psychotropic Cannabis sativa L. **Phytotherapy Research**, v. 35, p. 1099–1112, 2021.

- [392] SMERIGLIO, A. et al. Promising in vitro antioxidant , anti-acetylcholinesterase and neuroactive effects of essential oil from two non-psychotropic Cannabis sativa L. biotypes. **Phytotherapy Research**, v. 34, p. 2287–2302, 2020.
- [393] RAJA, A. et al. Attenuation of oxidative stress by cannabinoids and cannabis extracts in differentiated neuronal cells. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 1–16, 2020.
- [394] VITOROVI, J. et al. Antioxidant Activity of Hemp (Cannabis sativa L.) Seed Oil in Drosophila melanogaster Larvae under Non-Stress and H₂O₂ -Induced Oxidative Stress Conditions. **Antioxidants**, v. 10, p. 830, 2021.
- [395] ROVETTO, L. J.; AIETA, N. V. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 16–27, 2017.
- [396] BJORNCRANTZ, W. Winterized crude cannabis extracts and methods of preparation and use, USA patente 9333229, 2016.
- [397] MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (Cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 520–528, 2006.
- [398] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- [399] PELLEGRINI, N. et al. Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline- 6-sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379–389, 1999.
- [400] COSTA, M. DA; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. DA. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1183–1187, 2004.
- [401] HUANG, D.; BOXIN, O.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.
- [402] MARSICANO, G. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: Role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 3, p. 448–456, 2002.
- [403] RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- [404] PEYRAT-MAILLARD, M. N.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 10, p. 1007–1012, 2003.

- [405] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Fundamentals and Applications Fundamentals and Applications**. 2^a ed, Nova York: John Wiley & Sons, 2001.
- [406] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles , Methods , and Applications**. Oxford University, 1994.
- [407] HAQUE, M. A. et al. Electrochemical Methods to Evaluate the Antioxidant Activity and Capacity of Foods: A Review. **Electroanalysis**, v. 33, n. 6, p. 1419–1435, 2021.
- [408] SOCHOR, J. et al. Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 6, p. 8464–8489, 2013.
- [409] GATTRELL, M.; KIRK, D. W. A Study of Electrode Passivation during Aqueous Phenol Electrolysis. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 140, n. 4, p. 903–911, 1993.
- [410] REBELO, M. J. et al. Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 566–573, 2013.
- [411] NISSIM, R.; COMPTON, R. G. Absorptive stripping voltammetry for cannabis detection. **Chemistry Central Journal**, v. 9, n. 1, p. 41, 2015.
- [412] BALBINO, M. A. et al. Voltammetric determination of Δ^9 -THC in glassy carbon electrode: An important contribution to forensic electroanalysis. **Forensic Science International**, v. 221, n. 1–3, p. 29–32, 2012.
- [413] NOVAK, I.; MLAKAR, M.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š. Voltammetry of immobilized particles of cannabinoids. **Electroanalysis**, v. 25, n. 12, p. 2631–2636, 2013.
- [414] BARROS, L. et al. Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 61–66, 2008.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Cymbopogon citratus*

Pesquisador: ANA CAROLINA MENDES HACKE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 98156118.2.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.896.949

Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Cymbopogon citratus*. Trata-se de um estudo experimental para avaliação da toxicidade de extratos e frações de *Cymbopogon citratus*.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a possível toxicidade de diferentes extratos e frações de *Cymbopogon citratus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A execução do presente projeto não oferece riscos aos doadores, uma vez que as coletas de sangue serão realizadas por profissionais capacitados e utilizando materiais estéreis descartáveis adequados.

Benefícios:

A realização do projeto oferece inúmeros benefícios, considerando que a planta em estudo, *C. citratus*, é amplamente consumida pela população para diversas finalidades. Desta forma, com a realização deste estudo, poderão ser obtidos dados experimentais que demonstrarão se as frações com altos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante apresentam toxicidade em células

humanas, oferecendo maior segurança

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 2.896.949

associada ao consumo dos extratos desta planta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As plantas medicinais têm sido empregadas para prevenir ou tratar várias doenças desde o início da civilização e, devido a vantagens como o baixo custo e fácil acesso, seu uso aumentou substancialmente em muitos países. Suas propriedades farmacológicas podem ser atribuídas aos constituintes químicos que estão presentes em seus extratos brutos. As plantas medicinais são ricas em compostos fenólicos, que são metabólitos secundários responsáveis por seu desenvolvimento e defesa contra herbívoros e patógenos. É conhecido que estes compostos possuem atividade antioxidante, e esta propriedade potencializa o uso terapêutico das plantas medicinais. A espécie *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*), pertencente à família Gramineae, popularmente conhecida como “capim-limão”, é uma planta perene que possui valor econômico atrativo devido às suas propriedades medicinais e bioquímicas. A infusão desta planta é frequentemente utilizada em vários países para o tratamento e prevenção de algumas doenças, como os distúrbios gastrointestinais e as doenças cardiovasculares. Vários estudos têm estabelecido que as propriedades benéficas de *C. citratus* podem estar relacionadas com a atividade antioxidante demonstrada pela planta. Entretanto, apesar dos benefícios exibidos pelos extratos de plantas, estes podem ser tóxicos. Além disso, não existem estudos avaliando os efeitos citotóxicos de frações ricas em compostos fenólicos de *C. citratus*. Portanto, torna-se importante determinar sua segurança para possível utilização em preparações fitomédicas. Desta forma, considerando o amplo uso popular e os efeitos biológicos da *C. citratus*, o objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a possível toxicidade dos extratos e frações desta planta em células humanas por meio dos ensaios de viabilidade celular (citotoxicidade) e fragilidade osmótica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas da resolução 466/2012

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 2.896.949

Recomendações:

Enviar o relatório final ao término do projeto por notificação via plataforma Brasil para evitar pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1136068.pdf	10/08/2018 22:06:17		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	10/08/2018 22:03:00	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.doc	10/08/2018 21:52:05	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Outros	CurriculoLattesRomaianaPicada.pdf	10/08/2018 21:50:26	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Outros	CurriculoLattesAnaHacke.pdf	10/08/2018 21:48:38	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Outros	autorizacaodoutorado.pdf	10/08/2018 10:07:51	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisador2.pdf	07/08/2018 22:01:59	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisador1.pdf	07/08/2018 21:59:32	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto.doc	07/08/2018 20:14:20	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	01/08/2018 15:47:58	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	01/08/2018 15:46:34	ANA CAROLINA MENDES HACKE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 052/2016

Protocolo UEPG – 9064/2016

Título – *Projeto de pesquisa “determinação da composição química e atividade antioxidante dos extratos de Cymbopogon citratus e avaliação da sua ação ansiolítica e/ou anticonvulsivante em peixes zebrafish (Danio rerio).”*

Interessado: Edmar Miyoshi

Data de Entrada – 07/06/2016

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 14/10/2016 a 14/10/2018

Considerações

Prezado Professor Edmar Miyoshi

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de trezentos e vinte e dois peixes.

Ponta Grossa, 14 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Dionizia Xavier Scomparin
COORDENADORA