

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Érica Vanessa Furlan Rosa

**BETA-CARIOFILENO ATENUA DANO COGNITIVO INDUZIDO PELA
EXPOSIÇÃO AO ASPARTAME EM RATOS PELA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA VIA BDNF/ TrKB**

Santa Maria, RS

2021

Érica Vanessa Furlan Rosa

**BETA-CARIOFILENO ATENUA DANO COGNITIVO INDUZIDO PELA
EXPOSIÇÃO AO ASPARTAME EM RATOS PELA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA VIA BDNF/ TrKB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Farmacologia**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Ana Flávia Furian

Coorientador: Prof.^o. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rosa, Érica

BETA-CARIOFILENO ATENUA DANO COGNITIVO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO AO ASPARTAME EM RATOS PELA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA VIA BDNF/ TrkB / Érica Rosa.- 2021.

74 p.; 30 cm

Orientadora: Ana Flávia Furian

Coorientador: Mauro Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Adoçante 2. Beta-cariofileno 3. memória 4. sistema colinérgico 5. fator neurotrófico derivado do cérebro I. Furian, Ana Flávia II. Oliveira, Mauro III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ÉRICA ROSA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Érica Vanessa Furlan Rosa


**BETA-CARIOFILENO ATENUA DANO COGNITIVO INDUZIDO PELA
EXPOSIÇÃO AO ASPARTAME EM RATOS PELA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA VIA BDNF/ TrKB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Farmacologia**.


Aprovado em 26 de agosto de 2021:



Ana Flávia Furian, Dra.
(UFSM)(Presidente/Orientadora)



Maria Amália Pavanato, Dra. (UFSM)



Daiana Silva de Avila, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2021

*Dedico esta realização aos meus pais
Jocelaine F. Rosa e Marcio B. Rosa, pelos
grandes exemplos de pessoas que são, por
me guiarem pelo caminho do bem, e por todo
apoio e amor dedicado a mim.*

AGRADECIMENTOS

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”; - É com esta reflexão que quero começar a agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, caminharam ao meu lado e contribuíram para o meu crescimento e para a realização deste sonho.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Jocelaine F. Rosa e Marcio B. Rosa pelo apoio incondicional, força e amor, principalmente pelo amor. Obrigada por acreditarem em mim (às vezes mais do que eu mesma), por abraçarem meus sonhos como seus e nunca me deixarem desanimar. Obrigada! Eu amo vocês!

Às minhas primeiras colegas de laboratório Micheli Dassi, Ana Braga e Naieli Souto pelos intermináveis dias de experimento, conversas, risadas e conhecimento compartilhado.

À Alice, com quem dividi todas as expectativas, emoções, trabalho, frustrações e vitórias desde o processo seletivo até aqui. Obrigada por tudo!

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian, pela oportunidade de continuar no laboratório durante a pós-graduação e por toda ajuda no desenvolvimento desse projeto. Ao prof.^o Mauro S. Oliveira por ceder espaço e recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

*À Tuane B. Sampaio pelo conhecimento compartilhado desde a fase dos testes piloto, pela disponibilidade em tantos dias intermináveis de experimento, pelo exemplo de pesquisadora e pela amizade que construímos e ultrapassou os limites do “arco”.
Contar com você fez toda a diferença, obrigada!*

À todos aqueles que trabalharam e cederam recursos para que esse trabalho fosse realizado: Sabrina, Jamila, Alice, Marcelo, Marcela, Tuane, Shaiana, Marcel. Obrigada, por me ajudarem a crescer! Em especial, a minha grande amiga e também parceira de laboratório, Jamila, pelos dias de trabalho, risadas, conversas, apoio e principalmente pela amizade leal e sincera. Obrigada por tanto!

Ao Marcel, que foi incansável e sempre disposto a ajudar. – Encontrar contigo no meio desta jornada foi uma sorte e uma alegria. Obrigada pela tua ajuda na idealização do projeto, pelo empenho em todas as etapas do desenvolvimento do experimento e pela tua orientação na fase conturbada que foi, para mim, a escrita e finalização da dissertação. Saiba que tu tens, em mim, uma admiradora do professor, pesquisador e pessoa incrível que tu és. Não tenho palavras para agradecer o quanto nossa convivência me fez ter vontade de ser melhor. Obrigada! Obrigada! Obrigada!

Às minhas primas e amigas queridas, Maria Danyela e Maria Klara, pelo incentivo, carinho, risadas e presença em todos os momentos. Às minhas amigas Paula e Shaiana, presentes da graduação, pelas inúmeras vezes que emprestaram seus ouvidos, pelas palavras de apoio e amizade verdadeira.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), minha segunda casa por tantos anos, pelas grandes oportunidades oferecidas. Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e seus professores que tanto contribuíram para meu crescimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte e apoio financeiro.

Finalmente, a todos aqueles que trabalham diariamente, sendo resistência e acreditando no poder transformador da ciência, mesmo em tempos tão difíceis.

Obrigada por não desistirem!

MUITO OBRIGADA!!!

“Em algumas atividades nós ganhamos o dinheiro que nos permite pagar as contas; noutras nós encontramos o que mantém nossa sanidade.

Às vezes, com muita sorte, conseguimos os dois num lugar só. ”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

BETA-CARIOFILENO ATENUA DANO COGNITIVO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO AO ASPARTAME EM RATOS PELA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA VIA BDNF/ TrkB

AUTORA: Érica Vanessa Furlan Rosa
ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Ana Flávia Furian
COORDENADOR: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

O aspartame (ASP) é um adoçante substituto da sacarose em muitas matrizes alimentares, amplamente utilizado como adoçante de mesa. No entanto, vários estudos já relataram que a exposição ao ASP pode causar danos a diversos tecidos biológicos, como o sistema nervoso central. A exposição ao ASP pode levar a mudanças comportamentais, como déficits de aprendizagem e memória. Nesse sentido, o β -cariofileno (BCP) é uma molécula natural farmacologicamente ativa que pode ser encontrada em diversos alimentos como pão, café, bebidas alcoólicas e temperos. De particular importância, tanto ASP quanto BCP são comumente consumidos e podem até estar presentes na mesma refeição. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial efeito protetor do BCP contra danos cognitivos induzidos pela exposição repetida a ASP em ratos, bem como o envolvimento da via de sinalização BDNF/TrkB, e a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Além disso, alguns marcadores plasmáticos da função hepática e renal e o perfil lipídico também foram avaliados. Os protocolos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria. Ratos *Wistar* machos receberam ASP (75 mg/kg; i.g) e/ou BCP (100 mg/kg; i.p) uma vez ao dia, durante 14 dias. Ao final do protocolo de tratamento, os animais realizaram as tarefas comportamentais de campo aberto e reconhecimento de objetos e, após foram coletadas as amostras do córtex cerebral, hipocampo e sangue para análises bioquímicas e moleculares. Os resultados mostraram que a exposição ao ASP prejudicou a memória de curto e longo prazo em comparação ao grupo controle. O tratamento com BCP foi eficaz em proteger contra o dano cognitivo. Além disso, a exposição ao ASP aumentou a atividade da AChE, o que foi prevenido pela administração de BCP. Os marcadores moleculares indicaram aumento nos níveis de BDNF e TrkB no hipocampo de ratos tratados com BCP, sugerindo maior ativação desta via. Em relação aos parâmetros plasmáticos, o ASP induziu alterações na atividade da ALT e nos níveis de HDL, enquanto o BCP foi eficaz em reduzir os valores aos do grupo controle. Em conclusão, o estudo demonstrou que o BCP protegeu contra o comprometimento da memória induzido pela exposição a ASP, o que pode estar associado a uma modulação da atividade da AChE e da via de sinalização do BDNF/TrkB.

Palavras chave: Adoçante; memória; sistema colinérgico; fator neurotrófico derivado do cérebro; receptor tropomiosina quinase; β -cariofileno.

ABSTRACT

BETA-CARYOPHYLLENE MITIGATES COGNITIVE DAMAGE INDUCED BY ASPARTAME EXPOSURE IN RATS BY MODULATING ACETYLCHOLINESTERASE AND BDNF/TrkB VIA ACTIVITY

AUTHOR: Érica Vanessa Furlan Rosa
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Aspartame (ASP) is a widely used as a tabletop sweetener and sucrose substitute in many food matrices. However, several studies have reported that exposure to ASP can damage biological tissues, such as the central nervous system and causing behavioral changes, such as learning and memory deficits. In this sense, β -caryophyllene (BCP) is a natural pharmacologically active molecule that can be found in several foods such as bread, coffee, alcoholic beverages and spices. Of particular importance, both ASP and BCP are commonly consumed and may even be present at the same meal. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential protective effect of BCP against cognitive damage induced by repeated exposure to ASP in rats as well as the putative involvement of the BDNF / TrkB signaling pathway and the activity of acetylcholinesterase (AChE). In addition, some plasma markers of liver and kidney function and lipid profile were also evaluated. The Ethical Research Committee of Federal University of Santa Maria approved all experimental procedures carried out in the present study. Male Wistar rats received ASP (75 mg/kg; i.g.) and/or BCP (100 mg/kg; i.p.) once daily for 14 days. At the end of the treatment protocol, the animals performed the behavioral tasks of open field and object recognition, and then samples of cerebral cortex, hippocampus and blood were collected for biochemical and molecular analyses. The results showed that ASP exposure impaired short- and long-term memory compared to the control group. Treatment with BCP was effective in protecting against cognitive damage. In addition, ASP exposure increased AChE activity, which was prevented by BCP administration. Molecular markers indicated increased levels of BDNF and TrkB in the hippocampus of rats treated with BCP, suggesting greater activation of this pathway. Regarding plasma parameters, ASP induced changes in ALT activity and HDL levels, while BCP was effective in reducing values to those of the control group. In conclusion, the study demonstrated that BCP protected against memory impairment induced by exposure to ASP, which may be associated with a modulation of AChE activity and the BDNF / TrkB signaling pathway.

Keywords: Sweetener; memory; cholinergic system; brain-derived neurotrophic factor; tropomyosin kinase receptor; β -caryophyllene.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Estrutura química do aspartame. p.20.

Figura 2 - Metabolismo humano do aspartame. p.22.

Figura 3 - Diferenças no metabolismo do metanol entre humanos e roedores. p.23.

Figura 4 - Via de sinalização BDNF/TrK. p.26.

Figura 5 - Estrutura molecular do β -cariofileno, p.28.

MANUSCRITO

Figure 1. Schematic representation of the experimental design of this study. p.37.

Figure 2. Effect of ASP (75 mg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p.) on open field parameters: crossing (A), rearing (B), grooming behavior (C), latency to exploration (D), feces number (E), time spent in center (F). Data are mean + S.E.M. for n=10 animals in each group. Two-way ANOVA showed no significant differences among the groups ($P>0.05$). **Abbreviations:** ASP Aspartame; BCP β -cariophyllene; p.44.

Figure 3. Effects of ASP (75 mg/kg, i.g.) and/or BCP (100mg/kg, i.p.) on the object recognition test. (A) Object recognition index for short-term memory; (B) Object recognition index for long-term memory. Data are mean + S.E.M. for n = 10 animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl).p.45.

Figure 4. Effects of BCP (100 mg/kg, i.p.) and / or ASP (75mg / kg, i.g.) on the activity of AChE in the hippocampus and cerebral cortex. Data are mean + S.E.M. for n = 6 animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). + Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the BCP group (BCP + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl).p.47.

Figure 5. Effects of BCP (100 mg/kg, i.p.) and / or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the immunocontent of: (A)TrKB in hippocampus; (B) TrKB in cerebral cortex; (C) BDNFp in hippocampus; (D) BDNFp in cerebral cortex; (E) BDNF in hippocampus; (F) BDFN in cerebral cortex. Data are mean + S.E.M. for n = 5 animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl). + Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the BCP group (BCP + NaCl).p.48.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Grau de doçura dos principais adoçantes artificiais aprovados para uso, no Brasil, em comparação com o açúcar comum. p.19.

Tabela 2. Limites máximos permitidos do ASP como aditivo alimentar no Brasil. p.21.

MANUSCRITO

Table 1. Effect of BPC (100 mg/kg, i.p.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the organ absolute weight of animals.p.42.

Table 2. Effect of BPC (100 mg/kg, i.p.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio.p.43.

Table 3. Effect of BPC (100 mg/kg, i.p.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on plasm ALT, AST, Glucose, TC, TG, LDL, HDL, LDL, VLDL, and creatinine levels of Wistar male rats.p.46.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASP	Aspartame
AST	Aspartato aminotransferase
BCP	β -cariofileno
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
COX-2	Ciclooxigenase-2
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatinoquinase-MB
EFSA	European Food Safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
IDA	Ingestão diária aceitável
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MAO	Monoaminoxidase
NO	Óxido nítrico
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PI3-K	Fosfodilinositol-3 quinase
PLC	Fosfolipase C
PNO	<i>Pinus halepensis</i>
SCF	Scientific Committee on Food
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	fator de necrose tumoral
TrKB	Receptor tirosina quinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 EDULCORANTES	17
2.2 ASPARTAME	19
2.2.1 Aspartame e toxicidade	23
2.2.2 Aspartame e memória	25
2.4. B-CARIOFILENO	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MANUSCRITO	32
5 CONCLUSÕES	61
6 PERSPECTIVAS	62
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO 1	75

1 INTRODUÇÃO

O aspartame (ASP) é um edulcorante artificial, com poder adoçante cerca de 200 vezes superior que a sacarose e de baixa caloria que foi inserido no mercado com o objetivo de ajudar a população diabética no controle glicêmico (MAGNUSON et al, 2016). Sua utilização como “adoçante de uso geral” foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1996. Contudo, diversos estudos pré-clínicos (ABDEL-SALAM et al., 2012; ABU-TAWEEL et al., 2014; ASHOK; SHEELADEVI, 2015; ASHOK et al., 2017; FINAMOR et.al., 2014) e clínicos (HARTE, C. B.; KANAREK, R. B., 2004; LINDSETH, G.N. et al., 2014) tem relatado efeitos tóxicos associados à exposição ao ASP, o que sinaliza uma questão crítica a respeito de sua segurança, especialmente pela grande quantidade de produtos alimentícios que o utilizam e o consumo mundial.

O efeito tóxico do ASP sobre o organismo está associado à sua biotransformação por esterases e peptidases intestinais em seus metabólitos: metanol, ácido aspártico e fenilalanina. Posteriormente, o metanol (principal metabólito tóxico do ASP) acaba sendo oxidado até ácido carboxílico e formato, o qual está relatado como causador da toxicidade do edulcorante (KRUSE, 2012).

Tendo em vista o crescente consumo de ASP no mundo, uma vez que está presente em uma grande variedade de produtos alimentícios e farmacêuticos, além de sua utilização como adoçante de mesa, muitos estudos foram realizados a fim de melhor compreender os possíveis efeitos que a exposição à essa substância tem sobre a saúde (AIC, 2015; AFSSA, 2002). Dessa forma, torna-se interessante o estudo de substâncias naturais também inseridas na alimentação cotidiana com a intenção de demonstrar sua segurança e também a ação preventiva frente a possíveis prejuízos ocasionados pelo consumo de ASP

O cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico, encontrado em óleos essenciais de frutas, especiarias, casca de árvores, raízes e folhas. Apresenta-se na forma de um líquido incolor, levemente amarelado, insolúvel em água e ocorre na natureza na forma de uma mistura de isômeros. As substâncias derivadas do cariofileno como o α -pineno, limoneno, mirceno e o β -cariofileno (BCP), um dos objetos de estudo deste trabalho, entre outros, ocorrem de forma natural em alimentos como café, pão, bebidas alcoólicas, batata cozida e frita, feijão aquecido e chás (ADAMS, 2011; AZAMBUJA, 2017).

O BCP, fitocanabinóide derivado do cariofileno, é um aditivo alimentar aprovado pela FDA e de acordo com a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) essa substância se enquadraria na categoria 5 (substâncias de risco relativamente baixo), uma vez que foi demonstrado que apenas doses superiores a 2000 mg/Kg poderiam desencadear efeitos tóxicos (FIDYT et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). De especial importância como potencial aplicação biológica, estão descritas na literatura científica, diversas atividades farmacológicas para o BCP, como anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, analgésica, anticarcinogênica, antimicrobiana, entre outras, salientando desta forma o promissor potencial biológico do composto (FIDYT, 2016). Além disso, nosso grupo observou que o BCP apresentou atividade neuroprotetora, ao melhorar o déficit cognitivo induzido por pentilenotetrazol em camundongos no teste de reconhecimento de objetos (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Portanto, levando em consideração os efeitos benéficos do consumo de BCP para a saúde, sua segurança e diversas aplicabilidades biológicas, este estudo tem a hipótese de que o BCP poderia atenuar o dano no sistema nervoso central induzido pela exposição repetida a ASP em ratos, especificamente na função cognitiva, considerando a possibilidade do consumo de ambas as substâncias em uma mesma refeição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EDULCORANTES

Edulcorantes são substâncias que possuem elevado poder de doçura e menor valor calórico em comparação ao açúcar de mesa (sacarose), muito utilizados para a substituição destes em diversos alimentos e bebidas (FREITAS, A. S.; ARAUJO, A. B. 2010). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, ao total, são 15 adoçantes permitidos para o uso como aditivos alimentares, entre eles a sacarina, ciclamato de sódio e o ASP estão entre os mais consumidos (ANVISA, 2008).

O consumo de adoçantes vem aumentando significativamente ao longo dos últimos 40 anos. Isto, deve-se ao fato de que a obesidade e outras alterações metabólicas vêm representando um quantitativo crescente e importante na população, considerado um problema de saúde pública mundial. Reforçando esta preocupação, diversos estudos clínicos ainda não chegaram a um consenso sobre quais as combinações dietéticas ideais para promover uma vida saudável (MOORADIAN, A. D., et al., 2017). Entretanto, os estudos mais recentes mostram que o consumo excessivo de dietas com elevada carga glicêmica está relacionado a outras doenças além da obesidade, como distúrbios metabólicos e diabetes mellitus do tipo II (CAROCHO, M. et al., 2017).

Tendo em vista que o sabor doce é mais aceito que o sabor azedo e amargo, inclusive sendo o preferido pelas crianças em comparação aos outros sabores básicos, a indústria alimentícia encontrou nos edulcorantes uma forma de manter seus produtos atrativos aos consumidores (CAROCHO, M. et al., 2017; KIM, J-Y. et al., 2017). Aproximadamente 6000 produtos (entre alimentos e bebidas) contendo ASP estão inseridos no mercado em diferentes países, como, por exemplo, vinhos, refrigerantes, café da manhã instantâneo, balas de hortelã, cereais, goma de mascar sem açúcar, misturas de cacau, chás, produtos lácteos, sobremesas congeladas, sobremesas de gelatina, sucos, (ALI, W. et al., 2019; MAGNUSON et al., 2007) uma vez que possui sabor residual limpo e é de baixo custo, tanto para o fabricante quanto para o consumidor (BUTCHKO e STARGEL, 2001; KRUSE, 2012; LEBDA, et. Al;2017 MAGNUSON et al, 2016). Mas o ASP não se limita apenas à indústria alimentícia, pois também é componente de uma variedade de produtos farmacêuticos como xaropes, laxantes, pastilhas para garganta, suplementos vitamínicos, além de ser permitido como adoçante de mesa em alguns países, incluindo o Brasil (ALI, W. et al., 2019).

Atualmente, ainda persistem algumas divergências em relação ao consumo de edulcorantes. Da mesma forma que alguns estudos sugerem que o uso de adoçantes poderia auxiliar no controle de peso corporal (ROGERS et al., 1990; RABEN et al., 2002), outros estudos demonstram que o consumo dos mesmos pode levar ao aumento da ingestão alimentar ou ainda não apresentarem quaisquer efeitos sobre a saciedade (SWITHERS & DAVIDSON, 2008; SWITHERS et al., 2009; VAN WYMELBEKE et al., 2004).

Como a maior parte dos adoçantes passa pelo trato gastrointestinal sem sofrer metabolização, encontram-se de forma direta com a microbiota intestinal, causando alterações na sua fisiologia, e, conseqüentemente podendo afetar a saúde de quem consome estes aditivos (BYARD, J. L.; GOLBERG, L., 1973; CLEMENTE, J. C. et al., 2012; ROBERTS, A. et al. 2000;). Posteriormente, já foi demonstrado que o consumo de sacarina, sucralose e aspartame induz intolerância à glicose, sendo a sacarina o edulcorante que apresentou o efeito mais pronunciado entre as substâncias testadas (SUEZ, J. et al., 2021). Além disso, Pfeffer e colaboradores (1985) observaram que a administração de sacarina e ciclamato inibe a fermentação da glicose. Sendo assim, é importante ressaltar a necessidade de mais estudos a fim de garantir a segurança de consumo dos adoçantes.

Internacionalmente, a FDA dos Estados Unidos e comitês de especialistas científicos, tais como o *Scientific Committee on Food* (SCF), *European Food Safety Authority* (EFSA) da Comissão Europeia e o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) administrado conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e pela Organização Mundial da Saúde (JECFA/FAO/WHO), são os responsáveis pela avaliação e regulamentação do uso de adoçantes. No Brasil, a responsabilidade é do Ministério da Saúde, por meio da ANVISA, considerando referências internacionais, como *Codex Alimentarius* (JECFA/FAO/WHO) e da FDA, dos EUA (ANVISA, 2008).

Segundo García-Almeida e colaboradores (2013), ASP, ciclamato, acessulfame, sacarina e sucralose são os principais edulcorantes artificiais aprovados pela ANVISA para uso em bebidas e alimentos. A comparação entre o poder de doçura de um edulcorante artificial em relação ao açúcar comum, é vantajosa (**Tabela 1**), uma vez que permite a obtenção do mesmo grau de doçura através da utilização de uma quantidade menor do aditivo. Ainda, o uso de adoçantes contribui para a garantia das características

sensoriais desejadas e redução do custo total de fabricação e do valor calórico do produto alimentício (CAPITAN-VALLVEY et al., 2006; CARDOSO et al., 2004).

Tabela 1: Grau de doçura dos principais adoçantes artificiais aprovados para uso, no Brasil, em comparação com o açúcar comum.

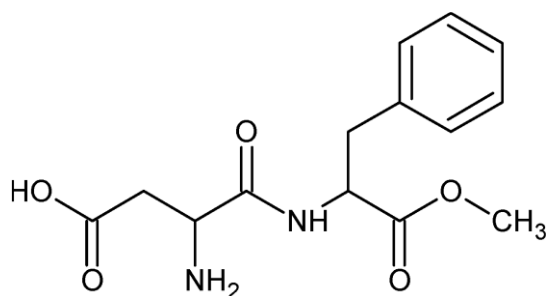
Adoçantes Artificiais	Doçura em relação à sacarose	Valor calórico (Kcal/g)
Aspartame	180-200	4
Ciclamato	30-50	0
Sacarina	300	0
Acessulfame	200	0
Sucralose	600	0

Fonte: Adaptado CHATTOPADHYAY et al., 2014.

Devido à grande aplicação do ASP em diversas matrizes alimentares ao redor do mundo, muitos estudos foram realizados a fim de tentar elucidar os efeitos desse adoçante para saúde. A maioria desses estudos utilizaram da experimentação animal, que visa uma indicação preliminar de risco para a avaliação em seres humanos, sendo, majoritariamente a respeito da toxicidade a órgãos periféricos, como fígado e rins (MOURAD, 2011; KRUSE, J. A.;2012; ASHOK et al., 2015; CHOUDHARY, 2016; FINAMOR et al., 2017) e estudos de carcinogenicidade (LANDRIGAN, P. J. & STRAIF, K., 2021; WIKOFF, D. S. et al., 2020; MAGNUSON, B. & WILLIAMS, G. M., 2008).

2.2 ASPARTAME

O ASP é um edulcorante artificial de baixa caloria que foi descoberto acidentalmente em 1965 pelo químico James M. Schlatter enquanto ele trabalhava na síntese de um fármaco anti-úlceras (MAGNUSON, 2007). Sua fórmula molecular é $C_{14}H_{18}N_2O_5$ e sua estrutura é muito simples (**Figura 1**), consiste em um dipeptídeo contendo 2 aminoácidos: ácido aspártico e fenilalanina (MAGNUSON, 2007).

Figura 1: Estrutura química do Aspartame

Fonte: Magnuson, et al., 2007.

Seu uso foi aprovado para alimentos como um edulcorante nutritivo, uma vez que apresenta poder adoçante cerca de 200 vezes maior que a sacarose, tornando possível que seja utilizado em quantidades menores. O ASP foi aprovado primeiramente em 1981 pela FDA para uso sob certas condições, como adoçante de mesa, em gomas de mascar, cereais matinais frios e bases secas para certos alimentos (bebidas, gelatinas, entre outros). Posteriormente, em 1983 a FDA também autorizou sua utilização em bebidas carbonatadas e bases de xarope de bebidas carbonatadas. Em 1996, a FDA aprovou o uso como um “edulcorante de uso geral”. Este adoçante tem baixa estabilidade à altas temperaturas, em meio ácido e ao armazenamento prolongado, perdendo sua capacidade de doçura em quaisquer destas condições (CHATTOPADHYAY, S., et al 2014; MAGNUSON, B. A. et al., 2007).

Segundo o FDA a ingestão diária aceitável (IDA) para o ASP é 50 mg/kg, enquanto o JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives* FAO/OMS) estipula a IDA de 40mg/kg. O Brasil segue a recomendação da União Europeia quanto a ingestão diária aceitável (IDA=40mg/kg) e a ANVISA estipula os limites máximos de seu uso como aditivo em alimentos dependendo da matriz alimentar (**Tabela 2**).

Tabela 2. Limites máximos permitidos do ASP como aditivo alimentar no Brasil

Alimento	Limite máximo (g/100g ou g/100mL)
<i>Alimentos e bebidas para controle de peso</i>	0,075
<i>Alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares</i>	0,075
<i>Alimentos e bebidas para dietas com restrição de açúcares</i>	0,075
Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	
<i>Com substituição total de açúcares</i>	0,075
<i>Com substituição parcial de açúcares</i>	0,056

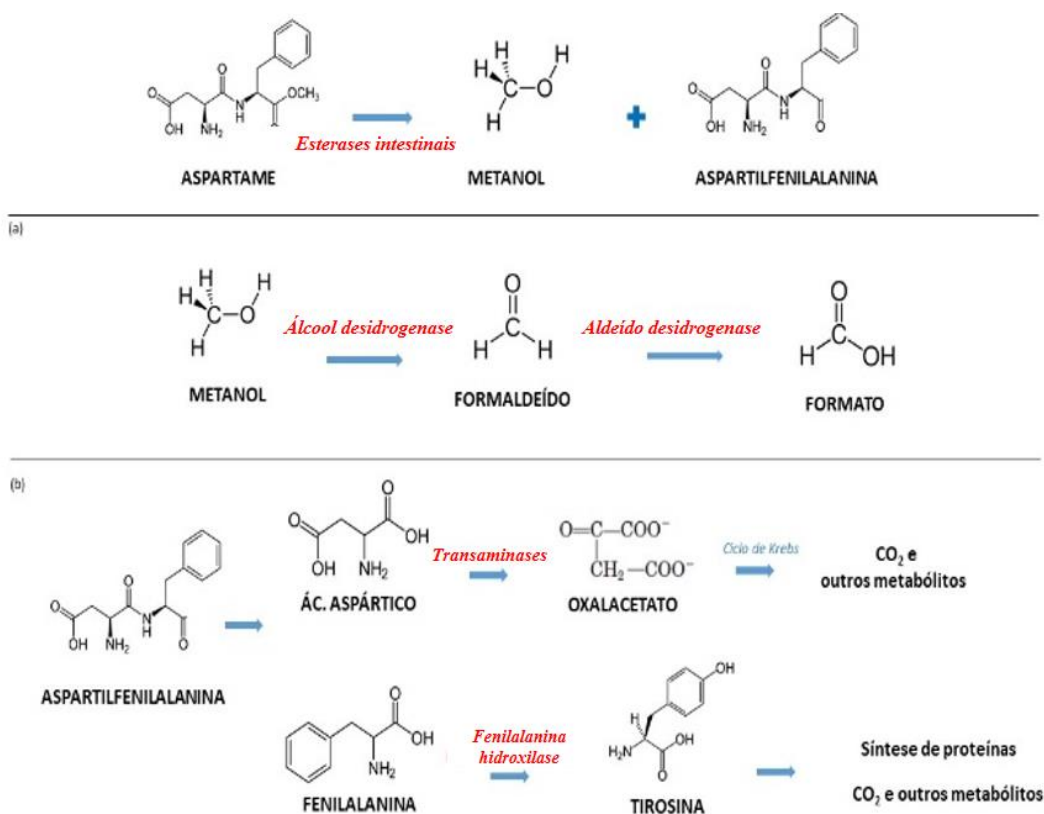
Fonte: Adaptada de ANVISA, 2008.

O consumo de ASP se dá através da ingestão de alimentos e bebidas que o apresentem como ingrediente, por via oral. Após a ingestão, ele é hidrolisado por esterases e peptidases intestinais em seus três componentes principais: fenilalanina, ácido aspártico (ou aspartato) e metanol, os quais são absorvidos para a circulação sanguínea (**Figura 2**). Apesar das quantidades de fenilalanina e ácido aspártico aumentarem em 1 e 2%, respectivamente, para consumidores de ASP, o ácido aspártico já foi associado a distúrbios neurológicos como epilepsia e enxaqueca (KROGER, et al., 2006; HUMPHRIES et al., 2008; EFSA, 2013). O metanol, por sua vez, é metabolizado pela enzima *álcool desidrogenase*, que catalisa a lenta oxidação à formaldeído (passo limitante para a toxicidade). Em seguida, a enzima *aldeído desidrogenase* oxida o aldeído formado ao ácido carboxílico correspondente, o ácido fórmico. Ambos os metabólitos são tóxicos para o organismo, mas o formaldeído é uma forma transitória, portanto, não se acumula. O ácido fórmico se dissocia liberando o íon hidrogênio e o ânion formato. O acúmulo de formato no organismo é o responsável pela toxicidade, podendo levar a lesões e morte celular (KRUSE, J. A.;2012). Neste contexto, alguns estudos apontam o metanol como o principal responsável pela toxicidade do ASP, pois esta substância pode levar ao desequilíbrio do tônus oxidativo tanto nos tecidos cerebrais quanto periféricos (ABHILASH et al., 2011; ASHOK & SHEELADEVI, 2015; ASHOK et al., 2017; MOURAD, 2011; SIMINTZI et al., 2007). Adicionalmente, há evidências de que a administração isolada de metanol na dose de 3mg/kg, via intraperitoneal, em ratos

Sprague-Dawley, durante 3 semanas levou ao aumento de malonaldeído (MDA), óxido nítrico (NO), ciclooxygenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral (TNF- α), monoaminoxidase (MAO), entre outros parâmetros, no fígado e no cérebro dos animais (HAMOUDA, A. F., 2019).

A fenilalanina é um aminoácido essencial que deve ser fornecido através da alimentação, e tem importante papel na síntese das monoaminas no cérebro. Como este aminoácido é consumido em diversos alimentos e é produto do metabolismo do ASP, existe a necessidade do controle da ingestão, principalmente para indivíduos portadores de uma condição hereditária e rara, chamada fenilcetonúria (ANVISA, 2012; CHATTOPADHYAY, S. et al., 2014).

Figura 2. Metabolismo humano do ASP

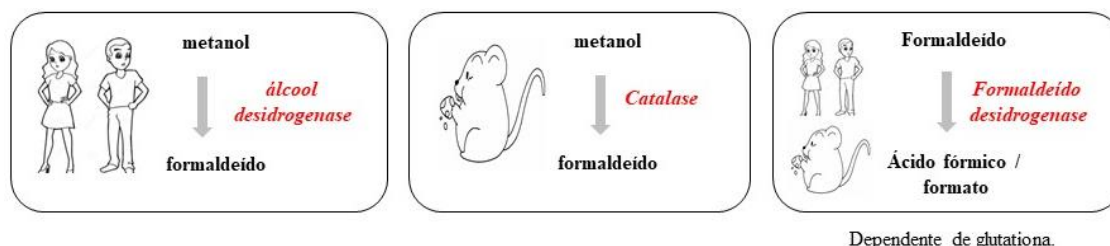


Fonte: A autora.

Semelhante aos processos metabólicos no organismo humano, o aumento dos níveis de metanol também é observado e considerado o principal mecanismo de toxicidade do ASP em roedores (DAVOLI, E. et al; 1986). No entanto, algumas diferenças podem ser observadas, pois enquanto nos humanos a *álcool desidrogenase* é

responsável pela conversão do metanol em formaldeído, a *catalase* assume este papel nos roedores (CEDERBAUM, A. I. & QURESHI, A., 1982). A conversão do formaldeído em formato é realizada pela enzima *formaldeído desidrogenase* (HARRIS, C. et al., 2003) em ambas as espécies (**Figura 3**), e posteriormente o formato será metabolizado em dióxido de carbono por meio de uma via dependente de tetraidrofolato (TEPHLY, T. R., 1991).

Figura 3. Diferenças no metabolismo do metanol entre humanos e roedores



Fonte: A autora.

Além disso, os processos metabólicos que catalisam a biotransformação do ASP em roedores são mais rápidos em comparação aos dos humanos (**Figura 3**). Por exemplo, os roedores precisam de doses cerca de 60 vezes mais altas de ASP para elevar os níveis de tirosina e fenilalanina a níveis comparados aos dos humanos, o que possibilita que as doses entre humanos e roedores possam ser corrigidas por um fator de 5 ou, como proposto por Wurtman & Maher (1987) por um fator de correção de setenta de acordo com um cálculo do transporte competitivo deste aminoácido para o cérebro (FERNSTROM, J. D., 1989).

2.2.1 Aspartame e toxicidade

Embora, o parecer científico da *European Food Safety Authority* tenha demonstrado que doses de até 4000 mg/kg/dia de ASP são consideradas seguras, uma vez que não causaram quaisquer efeitos adversos observáveis em estudos de toxicidade crônica em ratos (EFSA, 2013), o ASP continua sendo alvo de estudos relacionados à segurança de seu consumo para humanos e animais, mesmo quatro décadas após sua aprovação como aditivo alimentar.

Devido à rápida metabolização intestinal do ASP, em fenilalanina, formato e metanol, é difícil compreender como este adoçante poderia influenciar o ambiente

intestinal, especialmente no que tange à microbiota, uma vez que ele não chega na sua forma íntegra ao intestino grosso, mas sim seus metabólitos (SUEZ, J. et al., 2014). Porém, sabe-se que 1 litro de bebida adoçada com ASP promove a geração de cerca de 56 mg de metanol no organismo, 7 vezes mais que o limite diário de ingestão do metanol que é de 7,8 a 8,0 mg (DOROKHOV, 2015). Alguns estudos à curto e longo prazo com roedores detectaram metanol na circulação dos animais tratados com ASP (MOURAD, 2011; KRUSE, J. A.;2012; ASHOK et al., 2015), o que foi relacionado com a geração de espécies reativas e conseqüentemente ao desequilíbrio do estado oxidativo tecidual, evidenciado através do aumento da peroxidação lipídica, do conteúdo de óxido nítrico e da atividade de enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), em diferentes tecidos, inclusive no sistema nervoso central (ABDEL-SALAM et al., 2012; ABU-TAWEEL et al., 2014; ASHOK & SHEELADEVI, 2015; ADARAMOYE & AKANNI, 2016; LEBDA et al., 2017). Finamor e colaboradores (2014), demonstraram que a administração de ASP na dose de 40 mg/kg durante seis semanas, aumentou a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, hidroperóxidos lipídicos e níveis de proteína carbonil no cérebro de ratos *Wistar* machos, além de diminuir a atividade das enzimas SOD, glutathione peroxidase (GPx), e glutathione reductase (GR). O tratamento com N-acetilcisteína na dose de 150 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.), a partir da quinta semana foi capaz de reverter os parâmetros avaliados.

Além disso, o metanol proveniente da metabolização do ASP pode levar a prejuízos em outros tecidos. Alguns estudos observaram alteração no tônus oxidativo no fígado e da função hepática de ratos tratados com 40 mg/kg de ASP durante 90 dias. Os achados indicaram que a hepatotoxicidade poderia estar relacionada ao mecanismo de apoptose celular, ressaltando a necessidade da reavaliação das diretrizes de consumo desse adoçante, bem como do metanol, uma vez que estão presentes em diversas bebidas comumente consumidas (ASHOK et al., 2017). Neste sentido, Finamor e colaboradores (2017) verificaram aumento da atividade das transaminases hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além de lesão hepatocelular, infiltração leucocitária, degeneração dos hepatócitos e diminuição da quantidade de glutathione (GSH) hepática. Outro estudo verificou o aumento da corticosterona plasmática após administração de ASP na dose de 40 mg/kg durante 90 dias, em camundongos *Swiss* somando-se a isso, houve aumento das enzimas creatina quinase (CK) e Creatinoquinase-*MB* (CK-MB), importantes marcadores cardíacos

(CHOUDHARY, 2016), o que sugere que a toxicidade do ASP pode ser sistêmica. Alguns estudos demonstraram que o consumo de ASP pode levar ao aumento da ingestão de alimentos e do peso corporal (FEIJÓ, F. de M. et al., 2013; SILVA, A. E. 2016). Além disso, Tovar, A. P. (2017) observou um aumento de 20% da gordura abdominal dos animais tratados com esse adoçante, sugerindo importante influência metabólica desta substância no organismo. Apesar de seu uso difundido como ingrediente de uma grande variedade de alimentos e bebidas, bem como sua utilização enquanto adoçante de mesa, ainda existem controvérsias quanto a seus efeitos para a saúde, entre eles, um pouco descrito é sua ação a nível de SNC, em especial no que tange a memória.

2.2.2 Aspartame e memória

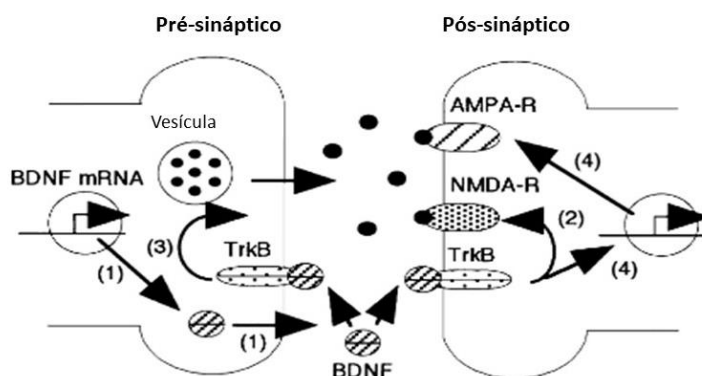
O processo de formação da memória é complexo, envolve diferentes estruturas cerebrais em cada uma de suas etapas, como o córtex cerebral, importante para fase inicial da formação da memória e o hipocampo, fundamental para a memória de longo prazo (IZQUIERDO, I & MEDINA, J. H; 1997; BIRD, CM & BURGESS, N., 2008). Fisiologicamente, esses processos são modulados por fenômenos bioquímicos e mecanismos moleculares associados às vias de sinalização celular, entre as quais se destaca o sistema colinérgico (ABIDIN, I. et al., 2004; ABU -TAWHEEL, G. M. et al., 2014; IYASWAMY, A. et al., 2018; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H.; 1997) e a via molecular do BDNF/TrKB, uma vez que ambos têm a expressão mais abundante no cérebro de mamíferos em desenvolvimento e adultos (CUNHA, C., et al., 2010).

Neste contexto, é amplamente descrito na literatura científica a correlação entre o aumento da atividade da *acetilcolinesterase* (AChE), enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor Acetilcolina (ACh), e prejuízos nas funções de aprendizagem e memória de roedores (AMMARI, M. et al. 2018; HAN, Y. et al., 2019; MAHDAVINIA, M. et al. ,2019; MÜLLER, S. G. et al, 2020). É importante mencionar que a inibição da atividade da AChE é utilizada como uma abordagem farmacológica para o tratamento de doenças neurodegenerativas com acometimento da memória, como a Doença de Alzheimer (MAURER, SV et al; 2017). Adicionalmente, algumas vias de sinalização também já foram relacionadas à modulação de processos cognitivos em modelos experimentais utilizando roedores, como, por exemplo, a via BDNF/TrKB.

De forma simplificada, a atividade neuronal aumenta proporcionalmente a expressão do gene que transcreve o BDNF, conseqüentemente aumentando sua liberação

no neurônio pré-sináptico. Posteriormente, o BDNF liga-se ao receptor TrkB promovendo a dimerização e autofosforilação deste, ativando diferentes vias de sinalização, como a proteína ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase C (PLC) e fosfodilinositol-3 quinase (PI3-K). A ativação da via BDNF/TrkB leva a fosforilação dos receptores de NMDA, aumentando a liberação de neurotransmissores pré-sinápticos e a síntese de proteínas relacionadas com a manutenção da plasticidade sináptica. Adicionalmente, o BDNF modula o crescimento e maturação dos dendritos, podendo participar da memória de longo prazo (**Figura 4**) (YAMADA, K. & NABESHIMA, T., 2003).

Fig. 4 Via de sinalização BDNF/TrkB



Fonte: Adaptado de YAMADA, K. & NABESHIMA, T., 2003.

Um estudo realizado na Nigéria, em 2017, observou que a exposição de camundongos ao ASP nas doses de 80 e 160 mg/kg, via oral (água de beber), durante 28 dias, alterou parâmetros relacionados à cognição, ansiedade, tônus oxidativo e lesão neuronal. Os autores observaram que a exposição ao ASP resultou no prejuízo da memória, avaliada através do teste de labirinto em Y, acompanhado de aumento da atividade da SOD e nos níveis de NO, além de indícios de lesão neuronal (ONALAPO et al, 2017). Ainda, Abu-Taweel e colaboradores (2014) verificaram um déficit nas capacidades de aprendizado e retenção de memória nos testes de esQUIVA ativa e labirinto aquático em animais tratados com ASP na dose de 32 mg/Kg ao dia durante 30 dias.

Christian, B. e colaboradores, em 2004, verificaram um aumento do tempo para encontrar a recompensa no teste do labirinto em T, indicando um prejuízo na memória dos ratos tratados com ASP 250 mg/kg, durante 90 dias. Esse dano cognitivo foi associado ao aumento do número de receptores colinérgicos no hipocampo e córtex cerebral desses

animais, uma vez que alguns estudos apoiam a hipótese que a regulação negativa desses receptores estaria associada com a melhora da função memória (LERER, B. et al., 1984). Outro estudo, utilizando ASP na dose de 40 mg/kg, também por 90 dias, evidenciou prejuízos na aprendizagem através dos testes de labirinto em Y e labirinto aquático de Morris. Tais efeitos comportamentais foram associados à diminuição na fosforilação da via de sinalização NMDAR1-CaMKII-ERK/CREB (IYASWAMY, A. et al., 2018).

Alonso, M. V. e colaboradores, em 2002, demonstraram que o aumento dos níveis BDNF no hipocampo, melhorou o desempenho dos ratos no teste de reconhecimento de objetos para memória de curta e longa duração. Uma vez que se sabe que a ligação do BDNF com o receptor TrKB é o passo crucial e imprescindível para estimulação desta via de sinalização (BEKINSCHTEIN, P. et al., 2014). Adicionalmente, alguns estudos demonstram que o aumento dos níveis de TrKB está relacionado à melhora das funções de aprendizagem e memória (DU, Q, et al., 2020; SHANG, Y. et al. SONG, X. et al., 2016). Além das evidências pré-clínicas, alguns estudos com humanos foram realizados a fim de tentar elucidar quais os impactos do consumo de algumas substâncias sobre a memória, entre elas, o ASP. Neste sentido, Harte, C. B., & Kanarek, R. B. (2004), investigaram os efeitos da nicotina e sacarose sobre o desempenho mental e observaram que os participantes que receberam bebidas adoçadas com sacarose e balas de nicotina apresentaram melhor desempenho nos testes de desempenho contínuo do que os participantes que receberam bebida adoçada com ASP. Além disso, os participantes que ingeriram a bebida contendo sacarose apresentaram um desempenho superior no teste de memória espacial do que aqueles que receberam a bebida contendo o adoçante. Outro estudo, duplo-cego controlado, avaliou o possível efeito benéfico da glicose em comparação ao ASP, em um teste de recordação de palavras. Os resultados demonstraram que os participantes que receberam bebidas adoçadas com ASP, lembraram menos palavras que aqueles que receberam bebidas com glicose (MOORADIAN, A. D., 2012).

Lindseth, G.N. e colaboradores (2014), conduziram um estudo clínico com adultos saudáveis que foram submetidos a dietas preparadas com ASP visando avaliar as diferenças nos indivíduos quanto ao humor, dores de cabeça, depressão e cognição (memória de trabalho e orientação espacial). As doses de estudo foram 10 mg/kg/dia e 25 mg/kg/dia, durante 8 dias, com intervalo de duas semanas entre elas. Os autores relataram que embora a dieta com alta quantidade de ASP (25 mg/kg/dia) não tenha alterado a memória de trabalho dos participantes, eles apresentaram pior desempenho em testes de orientação espacial, além de humor mais irritável e de exibir maior tendência à depressão.

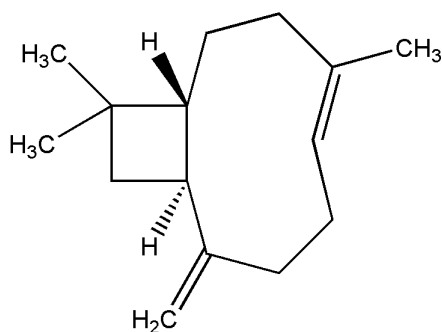
É importante ressaltar que mesmo na maior dose utilizada neste estudo, ela ainda está bem abaixo da IDA recomendada para esse adoçante, que é de 40 mg/kg/dia, e mesmo assim demonstrou alterações comportamentais significativas mesmo após um curto período de consumo (8 dias).

Todos estes estudos pré-clínicos e clínicos reforçam a urgente necessidade de se reavaliar e melhor investigar o impacto do consumo do ASP no organismo, especialmente a nível de SNC e no que tange os processos de cognição, bem como compreender os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos nestes efeitos, uma vez que este adoçante é um dos mais populares do mundo, estimando-se que sejam produzidas, globalmente, aproximadamente 16.0000 toneladas de ASP por ano (ARDALAN, M. R. et al, 2017; BELPOGGI, F. et al, 2006).

3. β -CARIOFILENO

O β -cariofileno (BCP) é um sesquiterpeno bicíclico que estruturalmente possui um anel 1,1dimetilciclobutano fundido em um anel de anina contendo um 1,5 dieno. Essa substância é encontrada em altas concentrações em plantas como orégano, canela, cravo, alecrim, tomilho, pimenta do reino, lúpulo, cannabis, além de ser o principal constituinte do óleo de copaíba (ASGARPANAH et al., 2013; MCNEIL et al., 2011; TKACHEV, 1987). Um estudo realizado nos EUA, estima que o BCP ocorra naturalmente nos alimentos em uma proporção de 279,587 Kg de alimento/ano e que a ingestão diária, por pessoa seja cerca de 760 μ g/dia (ADAMS, 2011; SHARMA et al, 2016).

Figura 5: Estrutura molecular do β -cariofileno (BCP).



Fonte: A autora.

Esse sesquiterpeno é um aditivo alimentar, intensificador de sabor e agente aromatizante (MACHADO, K. da C. et al., 2018) aprovado pela FDA, e de acordo com a OECD, essa substância se enquadraria na categoria 5 (substâncias de risco relativamente baixo), uma vez que foi demonstrado que apenas doses superiores a 2000 mg/Kg poderiam acarretar algum nível de toxicidade (FIDYT et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018).

O BCP é classificado como um fitocanabinóide que exerce atividade por meio da afinidade por receptores canabinoides (CB1 e CB2), tendo maior afinidade pelos receptores CB2. Esse receptor está acoplado a uma proteína $G\gamma\beta$ capaz de estimular diferentes vias de sinalização como da MAPK e PI3K, por exemplo. Como o BCP é metabolizado em diferentes moléculas com distintas afinidades por esses receptores, pode haver alteração de suas características farmacológicas (FIDYT, 2016). Adicionalmente, alguns estudos já demonstraram que ele também atua via receptores μ -Opióides e *Toll-Like* (ADAMS, 2011; SHARMA et al, 2016). Essa substância possui diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, como atividade antioxidante, ansiolítica, anticonvulsivante, antidepressiva, neuroprotetora e antimicrobiana (ADAMS, 2011; BAHY, 2014; De OLIVEIRA et al., 2016; FIDYT, 2016; VARGA, 2018; YOUSSEF 2019).

Um estudo realizado em 2018 demonstrou que o tratamento com o BCP nas doses de 215 e 450 mg/kg através da via intragástrica (i.g.) por 18 dias reduziu a inflamação local e sistêmica em um modelo de artrite em ratos. Ainda, na maior dose, o composto promoveu melhora do estado oxidativo dos tecidos (AMES-SIBIN; 2018). Varga (2018) relatou que o BCP na dose de 10 mg/kg, via i.p. exerce promissora ação na prevenção de lesão hepática associada ao desequilíbrio oxidativo, inflamação e esteatose hepática alcoólica. Yamaguchi e colaboradores (2016), em um estudo *in vitro* observaram a capacidade do BCP de suprimir a proliferação de macrófagos RAW267.4 nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ de meio (células envolvidas na inflamação). Neste sentido, o efeito benéfico do BCP sobre a neuro-inflamação já foi demonstrado, através da inibição de óxido nítrico, prostaglandina E2, ciclooxigenase-2 e citocinas pró-inflamatórias em um modelo *in vitro* de neuroinflamação utilizando oligômero amiloide ($A\beta$) em células da micróglia BV-2, sugerindo o potencial terapêutico desta substância na inflamação causada na doença de Alzheimer (HU, Y. et al., 2017). Estas evidências sugerem que a ação anti-inflamatória do BCP pode contribuir para sua ação biológica já demonstrada em diversos outros estudos (FRANCOMANO, F et. al, 2019).

De Oliveira e colaboradores (2016) demonstraram a ação anticonvulsivante do BCP na dose de 100 mg/kg, via i.p., evidenciado através do adiamento de crises mioclônicas, bem como a melhora do índice de reconhecimento de objetos dos camundongos no teste do reconhecimento. Youssef (2019) demonstrou que o BCP (30 mg/kg, i.g) por 4 semanas poderia ser utilizado no tratamento de diversos distúrbios metabólicos, uma vez que ele promoveu efeito positivo em diversas alterações metabólicas causadas por dieta rica em gordura, como hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e diferentes marcadores ateroscleróticos ao melhorar a inflamação e o estresse oxidativo/nitrosativo. Além disso, Bahi (2014) observou que o tratamento agudo com BCP (50 mg/kg, i.p) poderia ser explorado como um novo agente para o manejo farmacológico da ansiedade e depressão, pois aprimorou todos os parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado, melhorando também o tempo gasto no centro da arena no teste de campo aberto sem alterar a atividade locomotora geral, bem como diminuiu o número de bolinhas enterradas no teste de “*Murble Burying*” sugerindo um efeito anticomulsivo.

Postu e colaboradores (2019), demonstraram que o óleo essencial de *do Pinus halepensis* (PNO), cujo componente majoritário é o BCP (29,45%), nas concentrações de 1 e 3% administrado durante 21 dias pela via inalatória, aprimorou o desempenho cognitivo de ratos no teste do labirinto em Y, em um modelo de indução de Alzheimer através da administração aguda de beta amiloide ($A\beta_{1-42}$). Além disso o PNO restaurou o dano na memória induzido por $A\beta_{1-42}$ através da modulação da atividade da AChE e redução do dano oxidativo no hipocampo desses animais.

Dessa forma, levando em consideração as diversas atividades biológicas benéficas apresentadas pelo BCP, sua aparente capacidade de melhorar funções de aprendizagem e memória, e a comprovada segurança de seu consumo, acreditamos ser de especial importância investigar os efeitos protetores provenientes desta substância, de origem natural, presente em alimentos e especiarias, frente a toxicidade decorrente do consumo de ASP sobre o SNC, principalmente sobre a memória e os mecanismos bioquímicos e moleculares associados a tal efeito.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o possível efeito protetor do BCP frente ao dano cognitivo causado pela exposição repetida ao ASP em ratos.

3.1.2 Objetivos específicos

- A.** Analisar se o tratamento dos animais com BCP e ASP modifica parâmetros de toxicidade através da determinação do peso corporal e peso relativo dos órgãos.
- B.** Determinar se o tratamento com o BCP e/ou ASP altera os parâmetros de locomoção e estado geral dos animais.
- C.** Verificar se o tratamento com BCP restaura a memória de curta e longa duração no teste de reconhecimento de objetos em animais expostos ao ASP.
- D.** Determinar o impacto do protocolo experimental de exposição ao ASP e BCP em marcadores de função hepática e renal, além de perfil lipídico e glicemia nos animais.
- E.** Analisar se o tratamento com BCP modifica a alteração na atividade da AChE em córtex cerebral e hipocampo induzida pela exposição ao ASP.
- F.** Determinar se o tratamento com BCP altera a via de sinalização BDNF/TrkB no córtex cerebral dos animais expostos ao ASP.

4. MANUSCRITO

Após a obtenção da carta de aprovação desse projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais dessa instituição sob o nº 6934060519 (Anexo 1), os experimentos foram realizados e os materiais, métodos, resultados e discussão dos dados obtidos estão apresentados na forma de manuscrito, intitulado “*Beta-caryophyllene mitigated the cognitive impairment caused by repeated exposure to aspartame in rats: putative role of BDNF - TrKB signaling pathway and acetylcholinesterase activity*”, que será submetido a revista “*Food Additives & Contaminants*” (Qualis B2 – Ciências Biológicas II).

**BETA-CARYOPHYLLENE MITIGATED THE COGNITIVE IMPAIRMENT
CAUSED BY REPEATED EXPOSURE TO ASPARTAME IN RATS:
PUTATIVE ROLE OF BDNF - TrKB SIGNALING PATHWAY AND
ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY**

ROSA, Érica Vanessa Furlan ^a; DA SILVEIRA, Alice Rosa ^a; SARI, Marcel Henrique Marcondes ^a; SAMPAIO, Tuane Bazanella ^a; DOS SANTOS, Jamila Trindade^a; MÜLLER, Sabrina Grendene^b; FIGHERA, Michele Rechia ^a; ROYES, Luiz Fernando Freire^a; NOGUEIRA, Cristina Wayne^b; OLIVEIRA, Mauro Schneider^a; FURIAN, Ana Flávia ^{a,c}.

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*Corresponding author: Profa. Dra. Ana Flávia Furian

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos;

Universidade Federal de Santa Maria

Prédio 43, Sala 4217

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

PHONE: +55 55 3220 8254

E-mail: ana.furian@ufsm.com

ORCID: [0000-0002-8536-1352](https://orcid.org/0000-0002-8536-1352)

Abstract

Aspartame (ASP) is a sweetener used as a sucrose substitute in many food matrices and widely applied as a table sweetener. However, several studies have already reported that the exposure to ASP can damage different biological tissues, such as the central nervous system. ASP exposure may lead to behavioral changes, such as learning and memory deficits. In this sense, β -caryophyllene (BCP) is a pharmacologically active natural molecule that can be found in various foods such as bread, coffee, alcoholic beverages, and spices. Of particular importance, both ASP and BCP are commonly consumed and may even be present in the same meal. Thus, the aim of this study was to evaluate the protective potential of BCP against cognitive damage induced by repeated exposure to ASP in rats, as well as the involvement of the BDNF/TrkB signaling pathway and acetylcholinesterase (AChE) activity in this effect. In addition, biochemical markers in plasma were also assessed. For this, the animals received ASP (75 mg/kg; i.g.) and/or BCP (100 mg/kg; i.p.) once a day, for 14 days. At the end of the treatment animals performed behavioral tasks in open field and object recognition. Samples of the cerebral cortex, hippocampus and blood were collected for biochemical and molecular analyses. Our results showed that the BCP treatment was effective in protecting against the cognitive damage caused by ASP both on the short and long-term memory in the object recognition test. In addition, ASP exposure caused an increase in AChE activity, which was mitigated by BCP. Molecular insights showed increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) levels in the hippocampus of rats treated with BCP, indicating greater activation of this pathway. Also, BCP was effective in reducing the alterations induced by ASP on ALT activity and HDL levels. In conclusion, this study demonstrated that BCP protected against memory impairment induced by ASP exposure in rats, which could be associated with a modulation of AChE activity and BDNF/TrkB signaling pathway.

Keywords: Sweetener; memory; cholinergic system; brain-derived neurotrophic factor /tropomyosin receptor kinase B; β -caryophyllene

1. Introduction

Aspartame (ASP) is an artificial sweetener with a sweetening power about 200 times greater than sucrose (common sugar) without any residual flavor or metallic taste. Additionally, the low cost of manufacture and widespread consumption contributed to its consolidation as a tabletop sweetener and use in a wide variety of products (food, beverages, and pharmaceuticals) (ABHILASH, M.; et al., 2011; CHOUDHARY, A. K., & PRETORIUS, E., 2017; ZAFAR, T. et al., 2017).

ASP is metabolized by intestinal peptidases and stearyases enzymes in phenylalanine (50%), aspartic acid (40%), and methanol (10%). Among its biotransformation products, methanol is considered the highest toxic and the main responsible for ASP toxicity (CHOUDHARY, A. K., & PRETORIUS, E., 2017; ARDALAN, M. R. et al., 2017). Therefore, considering the importance of a safe consumption and exposure, the Food and Drug Administration (FDA) and the European Food Safety Authority have established that the acceptable daily intake of ASP is 40 mg/kg/day.

Although its main mechanism of toxicity is associated with methanol inducing the imbalance of oxidative tonus, hepatotoxic, nephrotoxic, and neurotoxic manifestations, some studies also shown that the accumulation of phenylalanine and aspartic acid can lead to neurochemical changes and neurodegeneration (ASHOK I. et al., 2017; ASHOK, I. et al., 2015; SIMINTZI, I., et al., 2007; ARDALAN, M. R. et al., 2017; FIDYT, K. et al., 2016). In addition, it has been previously demonstrated that ASP consumption is associated with cognitive impairment (IYASWAMY, A. et al., 2018). The putative mechanisms associated with the memory impairment could be related to the modification of acetylcholinesterase (AChE) activity and, consequently, in the cholinergic tonus (AMMARI, M. et al., 2018; HAN, Y. et al., 2014). Importantly, there are some studies that reported that the detrimental effects on memory are linked to the modulation of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tropomyosin receptor kinase B (TrKB) pathway (DU, Q. et al., 2020; SHANG, et al., 2019). In this sense, such evidence suggests that these pathways could be involved in the cellular modifications associated to ASP toxicity.

β -caryophyllene (BCP) is a bicyclic sesquiterpene used in cosmetics (toothpaste, perfumes, soaps) due to the woody aroma, and approved by the FDA as a food additive, presenting a low toxicity risk (ADAMS, 2011; BAHI, Amine et al., 2014). It is a naturally

occurring compound, such as in teas, spices, cloves, black pepper, cinnamon, rosemary, oregano, and is also used in industrial products such as beer (ADAMS, 2011; BAHÍ, A. et al., 2014). Several studies have shown that BCP has multiple pharmacological activities, acting as anti-inflammatory, anxiolytic, anticonvulsant, antidepressant, antimicrobial, antioxidant, and neuroprotective agent (ADAMS, 2011; BAHÍ, A. et al., 2014; DE OLIVEIRA, C. C. et al., 2016; VARGA, Z. V. et al., 2018; YOUSSEF, D. A et al., 2019).

Therefore, considering that BCP is safe, displays several beneficial effects, and can be consumed together with ASP in the same meals, this study has the hypothesis that the BCP attenuates the memory impairment induced by repeated exposure to ASP in rats.

2. Materials and methods

2.1 Animals and reagents

Young male Wistar rats (45-60 g – 21 days of age) were used in this study. The animals were kept under controlled conditions with free access to water and food (NUVILAB; Santa Maria, RS, Brazil), constant temperature (22 ± 1 °C) and in a 12 h light/dark cycle with lights turned on at 07:00 A.M. The rats were housed in plastic cages, containing one animal from each group in each cage (4 rats/cage). The experiments were performed in accordance with national legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA), the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil (registered under the number 6934060519/2019). Aspartame (ASP - Cas No. 22839-47-0; $\geq 95\%$ purity) and β -caryophyllene (BCP - Cas No. 87-44-5) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All other chemicals were reagent grade and purchased from local suppliers. Daily, BCP was diluted with NaCl 0,9% and Tween 0.05% and ASP was prepared in NaCl 0.9%.

2.2 Experimental design and general procedures

Figure 1 illustrates the methodology applied in this study (**Fig. 1**). A total of forty rats were randomly divided into four groups, with 10 rats in each group. Importantly, the experimental protocol was repeated five times ($n=2$ per group) to ensure the

reproducibility of the results. Over a period of 14 days, each animal daily received a dose of treatment by intragastric gavage, and intraperitoneal injection accordingly with the respective groups:

G1 Control NaCl (0.9%, i.g.) + (Tween 80 (0.05%, i.p.);

G2 BCP: NaCl (0.9%, i.g.) + BCP (100 mg/kg, i.p.);

G3 ASP: ASP (75 mg/kg, i.g.) + Tween 80 (0.05%, i.p.);

G4 Interaction: ASP (75 mg/kg, i.g.) + BCP (100 mg/kg, i.p.).

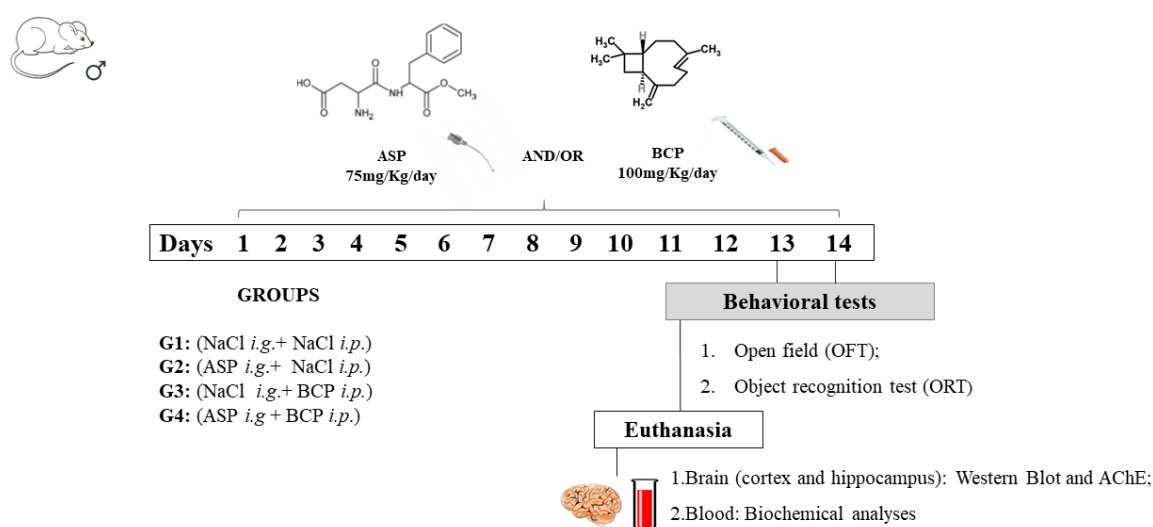


Figure 1. Schematic representation of the experimental design of this study. The animals received ASP, BCP or the association of both compounds once a day through the intragastric route and intraperitoneal injection respectively, for 14 days. At the end of the treatment protocol, the animals performed the behavioral tasks and then were euthanized. Samples of the cerebral cortex, hippocampus, and blood were collected for biochemical and molecular analyses. **Abbreviations:** ASP Aspartame; BCP β-cariophyllene; AChE acetylcholinesterase activity; OFT Open field test; ORT Object recognition test;

Dose, administration route and treatment schedule for ASP (75 mg / kg) were based on previous scientific studies (ASHOK et al., 2014; SOUTO et al., 2019) and translate into an estimated human dose of 12.15 mg / kg (REAGAN -SHAW et al., 2007) and treatment regimen for BCP (100 mg / kg) was chosen according to a previous study by our group (DE OLIVEIRA et al 2016; DA SILVEIRA et al.,2021) where this substance presented an important antioxidant and neuroprotective activity. During the treatment, water and food intake as well as weight gain were daily monitored. Forty minutes after the last administration, the animals performed the open field test (OFT; Section 2.3.1) in 12th day. ORT was performed in 13th day (ORT; Section 2.3.2), to assess

short-term memory, and in 14th day for long-term memory, according to Bevins, Rick A et al.(2006) with some modifications. Following, the animals were euthanized by decapitation; the blood was collected directly from the animals' body trunk in tubes containing 200 μ L of heparin. These samples were used to determine biochemical markers in plasma (Section 2.4.1). Besides, brain tissue was dissected into the cortex and hippocampus to determine the activity of the AChE enzyme (Section 2.4.2) and the immunocontent of some proteins by Western Blot (Section 2.4.3). Adrenal glands, spleen, brain, heart, liver, lungs, kidneys, and testicles were dissected and weighed as a measure of general toxicity. According to wet weight (absolute weight) and total body weight at necropsy, organ weight and organ body weight (relative weight) were calculated.

2.3 Behavioral tests

All behavioral experiments were performed in the light cycle and they were scored by the same rater in an observation sound-attenuated room under low-intensity light, where the rats had been habituated for at least 1 h before the beginning of the tests. Behavior was monitored through a video camera positioned above the apparatuses and the videos were later analyzed. The apparatuses were cleaned with 30% ethanol between animals to avoid odor cues.

2.3.1 Open field test (OFT)

On the 12th day of treatment, forty minutes after the treatments, the animals were placed in the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. Five areas of the apparatus had their limits delimited by the walls of the arena and considered peripheral areas. The five remaining areas that had no contact with the walls of the device were central areas. Some parameters, such as time taken to leave the center (latency to exploration), time spent in central areas, time of self-cleaning behavior (grooming time), number of crossed areas (crossing), number of breeding responses (animal stays on its hind legs) (rearing number), number of feces were recorded for 10 minutes to exclude locomotor impairment and assess general locomotor activity and exploration habits of rodents. Results were expressed as the total number of crossing, rearing, and feces. Time spent in central areas was reported as seconds and used as a measure of anxiety-like behavior (WALSH, RN & CUMMINS, RA, 1976).

2.3.2 Object recognition test (ORT)

The ORT was performed by submitting the animals to three experimental sessions, respectively, training #1 (first session), short-term memory evaluation #2 (second session, 4 hours after training), and long-term memory evaluation (third session, 24 h after training #1) in the same apparatus used to perform OFT. During the training session #1, two identical objects (transparent cylindrical plastic bottles) were equidistantly positioned in the center of the arena, and the time spent in exploration each object was recorded over 5 min. Four hours later (short-term memory evaluation #2), one of the bottles was replaced by a new object (plastic red apple), and the time spent exploring of each object was measured for 5 min. Finally, 24 h after training, the plastic red apple was replaced with another new object (triangular plastic cup), and the time spent in exploration of each object was recorded for 5 min (long-term memory evaluation #3). The object recognition index was calculated with the following formula: recognition index = (time spent in the new object)/ (time spent in the new object + time spent in the familiar object). This test was carried out in the 13th day of treatment 24 hours after the open field test (sessions #1 and #2) and the 14th day, forty minutes after the last administration of the substances (session #3).

2.4 *Ex vivo* assays

2.4.1 Plasma biochemical analyses

The blood samples were centrifuged at a room temperature for 10 minutes to obtain the plasma fraction, which was used for biochemical analyses. The alanine (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were measured to evaluate hepatic function, and creatinine levels to assess renal function, while levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol to analyze lipid profile with Bioclin commercial kits. Blood glucose levels were assessed by Accu-check Active kit, immediately after blood collection. The results of ALT and AST were expressed in U/mL while the results of CT, TG, HDL, LDL, VLDL and glucose were expressed in mg/dL.

2.4.2 AChE activity assessment

Samples of cerebral cortex and hippocampus (n=6 per group) were homogenized with Medium I buffer (0.32 M sucrose, 5.0 mM HEPES, 0.1 mM ethylenediamine tetra acetic acid disodium salt) 1:10 (v/w) and centrifuged at $2,400 \times g$ for 15 min at 4 °C to yield the supernatant fraction (S_1). This methodology uses acetylthiocholine as substrate, according to a previously described methodology (Ellman, George L., et al, 1961). The enzymatic activity was determined by spectrophotometry at 412 nm. The results were expressed as $\mu\text{mol AcSCh /min/mg}$ of protein. Total protein measurement was performed according to Bradford (1976) in the S_1 .

2.4.3 Western Blot

Samples of cerebral cortex and hippocampus (n=5 per group) were homogenized with Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) Thermo Fisher Scientific. Proteases and phosphatases inhibitors cocktail were added in the buffer previously the tissue homogenization (Thermo Fisher Scientific). Homogenates were then centrifuged at $10,000 \times g$ at 4 °C for 10 minutes and the supernatant was saved for western blot evaluation. An aliquot (20 μg protein) of the supernatant was diluted in Laemmli buffer and distilled water, and subjected to a temperature of 90 °C for 5 min. After, samples were subjected to a 14% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking with 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h at room temperature, the membranes were incubated overnight at 4 °C with one of the following primary antibodies: anti-BDNF (1:1000, AB-108319), anti-TrKB (1:1000, MP- 07-255). The antibodies were prepared in TBS containing 0.01 % Tween 20 (TBS-T) and 3% BSA.

Finally, membranes were washed with TBS-T (3 time/5min) and were incubate with secondary antibodies anti-rabbit (1:5000, Sigma-A0545) and secondary antibodies anti-mouse (1:500, Biorad, #170-6516) for 1 h at room temperature and then washed again in TBS-T. Protein immunoreactivity (optical density) of each sample was detected with ECL (Bio-ad) and quantified using the ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) software for Windows. The protein concentration was measured using the Bicinchoninic acid Kit (BCA assay). Each value was derived from the ratio between arbitrary units obtained by

the protein band and the Ponceau quantification (Romero Calvo et al., 2010). The data were expressed as a percentage of control.

2.5 Data presentation and statistical analysis

All the results were expressed as the mean (s) \pm standard error of the n observation means (S.E.M.). Data normality was assessed by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. The data were evaluated using two-way ANOVA of ordinary measures followed by the Duncan multiple range test when necessary. The GraphPad Prism software version 7 (San Diego, CA, USA) was applied for statistical evaluation and graphics preparation. Probably values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Body weight and organ-relative weight

Data from on the organ absolute weight of animals (Table 1) and relative weight of organs (Table 2) (adrenal glands, brain, heart, liver, lungs or kidneys) after BCP and/or ASP exposure, separately or in combination for 14 days, showed no statistical difference among the groups. Over the experimental period, there was no animal mortality in any treatment group.

Table 1. Effect of BPC (100 mg/kg, i.p.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the organ absolute weight of animals.

	Treatments			
	NaCl	BCP	ASP	BCP+ASP
Adrenal	0.04±0.003	0.054±0.004	0.050±0.004	0.050±0.005
Glands				
Spleen	0.62±0.052	0.63±0.091	0.77±0.530	0.66±0.070
Brain	1.23±0.018	1.21±0.018	1.19±0.021	1.25±0.017
Heart	0.68±0.048	0.70±0.031	0.062±0.049	0.62±0.040
Liver	6.67±0.467	6.83±0.461	6.65±0.485	6.86±0.474
Lungs	0.95±0.048	1.05±0.040	0.93±0.063	1.02±0.058
Kidneys	1.51±0.061	1.54±0.067	1.40±0.063	1.57±0.079
Testicles	1.59±0.098	1.61±0.111	1.43±0.079	1.54±0.132

Data are mean ± S.E.M. for n = 10 animals in each group. The results were evaluated by two-way ANOVA ($P > 0.05$). **Abbreviations:** ASP Aspartame; BCP β -cariophyllene;

Table 2. Effect of BPC (100 mg/kg, i.p.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on organ-to-body weight ratio and organ-to-brain weight ratio.

Organs	Organ-to-body weight ratio				Organ-to-brain weight ratio			
	NaCl	BCP	ASP	BCP+ASP	NaCl	BCP	ASP	BCP+ASP
Adrenal Glands	0.033±0.002	0.039±0.002	0.039±0.002	0.037±0.004	3.75±0.251	4.25±0.333	4.51±0.346	3.99±0.392
Brain	0.88±0.055	0.98±0.066	0.89±0.051	0.96±0.79	-	-	-	-
Spleen	0.45±0.025	0.53±0.047	0.45±0.023	0.47±0.029	50.0±4.198	63.26±7.59	52.1±3.996	52.45±5.419
Heart	0.49±0.017	0.49±0.013	0.50±0.019	0.46±0.017	54.63±3.459	51.75±2.543	58.34±3.936	49.81±2.714
Liver	4.82±0.207	5.22±0.165	4.87±0.177	5.01±0.181	537.7±36.10	554.2±36.38	563.4±38.38	545.3±34.98
Lungs	0.68±0.019	0.74±0.027	0.77±0.048	0.76±0.047	76.59±3.199	77.82±2.88	87.03±50.09	81.50±4.032
Kidneys	1.10±0.035	1.11±0.024	1.12±0.027	1.17±0.066	122.3±4.18	117.1±4.77	128.0±5.03	125.2±5.18
Testicles	1.14±0.025	1.13±0.053	1.17±0.035	1.11 ±0.058	128.0±7.05	119.1±8.11	133.7±6.55	122.9±9.7

Data are mean ± S.E.M. for n = 10 animals in each group. The results were evaluated by two-way ANOVA ($P > 0.05$). **Abbreviations:** ASP Aspartame; BCP β -cariophyllene;

3.2 OFT

The OFT was used to assess the general locomotion, exploratory activity, and anxiety-like behavior of animals treated with ASP and/or BCP. The statistical analysis showed that no modification in locomotion, exploratory activity as well as in the anxiety-like behavior of the animals for any of the parameters evaluated for all treatment groups (Fig. 2).

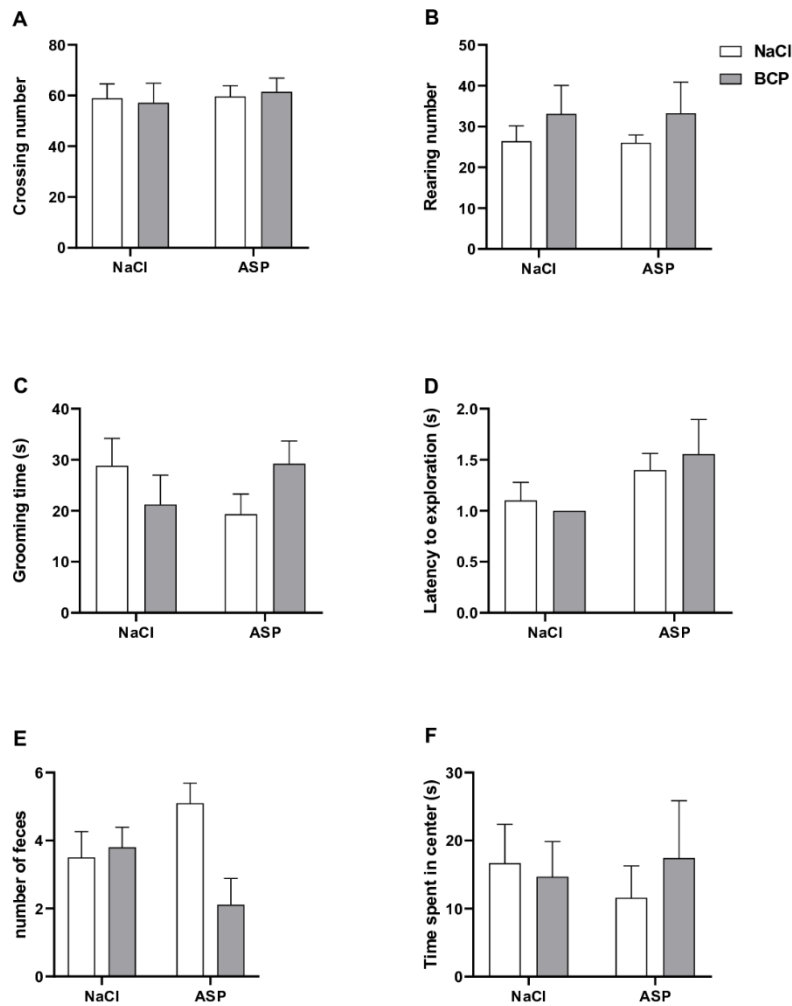


Figure 2. Effect of ASP (75 mg/kg, i.g.) and/or BCP (100 mg/kg, i.p.) on open field parameters: crossing (A), rearing (B), grooming behavior (C), latency to exploration (D), feces number (E), time spent in center (F). Data are mean + S.E.M. for n=10 animals in each group. Two-way ANOVA showed no significant differences among the groups ($P>0.05$). **Abbreviations:** ASP Aspartame; BCP β -cariophyllene;

3.2 ORT

During the ORT training session, rats of all groups spent similar time exploring the identical objects (*data not shown*, $P > 0.05$). Two-way ANOVA revealed that the treatment with ASP reduced the recognition index in the ORT by 31.7% and 24.8% for short- and long-term memory respectively when compared to the control group. The group of animals that concomitantly received ASP and BCP presented similar recognition index to the control group, demonstrating that the BCP administration protected from the ASP-induced memory impairment (**Fig. 3**).

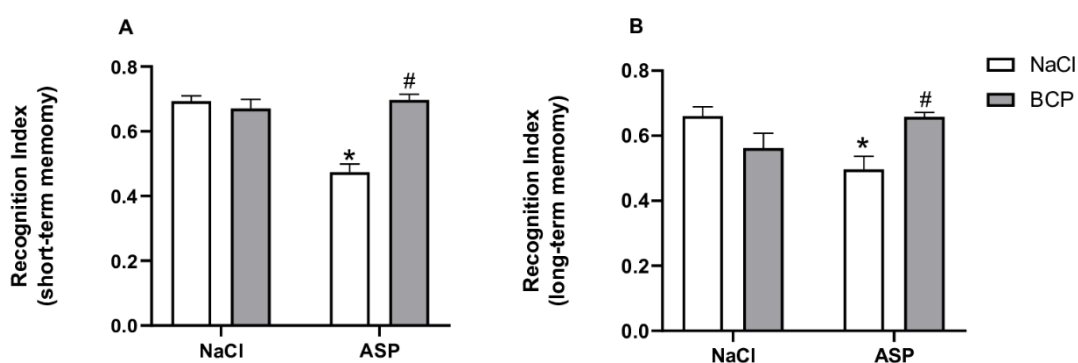


Figure 3. Effects of ASP (75 mg/kg, i.g.) and/or BCP (100mg/kg, i.p.) on the object recognition test. (A) Object recognition index for short-term memory; (B) Object recognition index for long-term memory. Data are mean + S.E.M. for $n = 10$ animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl).

3.3 Plasma biochemical analyses

Table 3 shows the results of plasma biochemical parameters. The animals treated with ASP showed an increase in ALT levels when compared to control and BCP groups. The group of animals that concomitantly received ASP and BCP showed ALT activity values similar to the control group. No statistically significant effects were observed for AST activity. ASP group also decreased levels of glucose and increase CT, TG, and VLDL levels in comparison to the control group. Association of ASP + BCP reduced HDL levels to control levels, but it was not effective in reducing the TG levels.

Table 3. Effect of BPC (100 mg/kg, i.p.) and/or ASP (75 mg/kg, i.g.) on plasm ALT, AST, Glucose, TC, TG, LDL, HDL, LDL, VLDL, and creatinine levels of Wistar male rats.

Parameter	Treatment			
	NaCl	BCP	ASP	BCP+ASP
ALT	46.36 ± 3.55	42.17 ± 3.70	59.74 ± 4.94 ^{*+}	35.01 ± 4.39 [#]
AST	98.26 ± 11.74	101.4 ± 11.94	115.8 ± 10.1	109.7 ± 11.02
GLUCOSE	114.70 ± 2.49	101.30 ± 1.25 [*]	105.80 ± 1.58 [*]	97.50 ± 4.65 [*]
TC	75.64 ± 3.28	83.48 ± 5.29	89.1 ± 6.55 [*]	84.86 ± 5.26
TG	88.03 ± 3.88	97.13 ± 3.11 [*]	104.4 ± 3.94 [*]	105.6 ± 9.27 [*]
HDL	38.83 ± 1.53	34.79 ± 0.94	37.25 ± 2.43	31.66 ± 1.93 ^{*#}
VLDL	17.05 ± 1.02	19.18 ± 0.72 [*]	20.95 ± 0.79 [*]	20.51 ± 1.80
LDL	19.29 ± 2.99	32.49 ± 3.98 [*]	30.47 ± 5.59	33.14 ± 5.21
CREATININE	0.85 ± 0.18	0.67 ± 0.06	0.60 ± 0.08	0.53 ± 0.08

Data are mean ± S.E.M. for n = 6 animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). + Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the BCP group (BCP + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl); **Abbreviations ALT:** Alanine aminotransferase; **AST:** Aspartate aminotransferase; **TC:** total cholesterol; **TG:** triglycerides; **HDL:** High-density lipoprotein cholesterol; **VLDL:** very low-density lipoprotein cholesterol; **LDL:** Low-density lipoprotein cholesterol. ASP Aspartame; BCP β -cariophyllene;

3.4 AChE activity

Two-way ANOVA of AChE activity revealed a significant increase in the hippocampal enzyme activity in ASP group when compared to control and BCP groups. Association with BCP and ASP significantly decrease the AChE activity when compared to ASP group (Fig. 4). The same was not observed in the cerebral cortex, where there were no significant differences in the AChE activity.

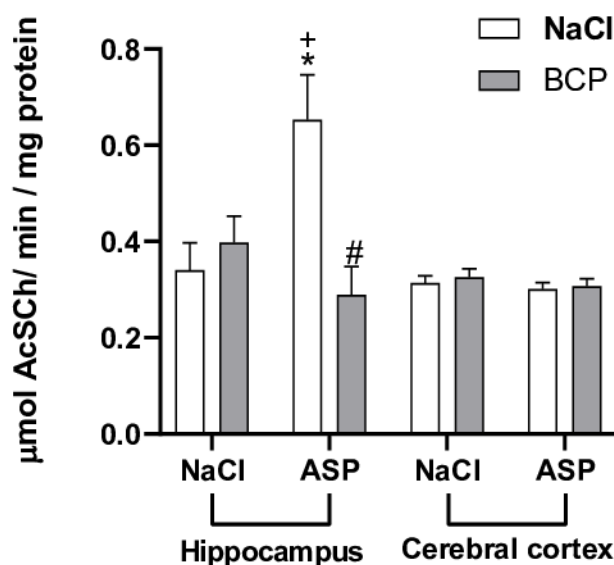


Figure 4. Effects of BCP (100 mg/kg, i.p.) and / or ASP (75mg / kg, i.g.) on the activity of AChE in the hippocampus and cerebral cortex. Data are mean + S.E.M. for n = 6 animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). + Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the BCP group (BCP + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl).

3.5 Western Blot

Effects of BCP and ASP on immunocontent of TrKB, BDNFp and BDNF are shown in Figure 5. ASP decreased the hippocampal TrKB immunocontent compared to BCP and control groups. Association of ASP + BCP protected from this decrease (Fig. 5A). Independent of the treatment, the levels of TrKB in cerebral cortex showed similar values among the groups (Fig 5B). Additionally, BCP increased levels of BDNFp

compared to control and ASP groups (**Fig 5C**) and no changes were observed in the level of pBDNF in the cerebral cortex. The quantification of BDNF levels in the hippocampus and cerebral cortex revealed an increase in the ASP + BCP group when compared to the group of animals that received ASP (**Fig. 5E** and **5F**).

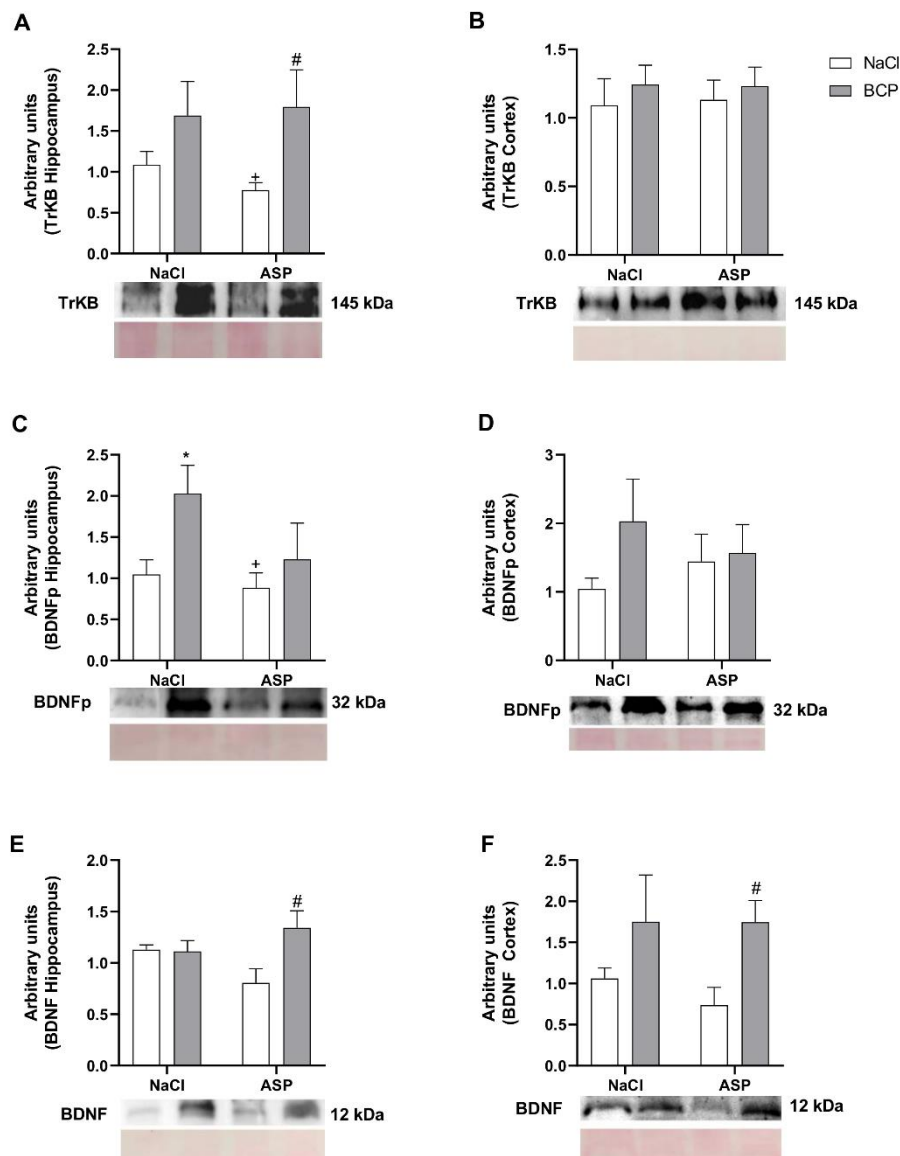


Figure 5. Effects of BCP (100 mg/kg, i.p.) and / or ASP (75 mg/kg, i.g.) on the immunocontent of: (A) TrkB in hippocampus; (B) TrkB in cerebral cortex; (C) BDNFp in hippocampus; (D) BDNFp in cerebral cortex; (E) BDNF in hippocampus; (F) BDNF in cerebral cortex. Data are mean + S.E.M. for n = 5 animals in each group. Data were analyzed through two-way (ANOVA) followed by the Duncan's test. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to Control group (NaCl + NaCl). # Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the ASP group (ASP + NaCl). + Indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to the BCP group (BCP + NaCl).

4. Discussion

In the present study, we investigated the memory impairment caused by repeated exposure to ASP and the possible restorative effects of BCP. For this aim, short and long-term memories in ORT were assessed as well as the putative involvement of AChE activity and the BDNF/TrkB signaling pathway. Additionally, plasma markers of hepatic and renal function and lipid profile were also assessed after the treatment protocol. We observed that exposure to ASP for 14 days caused short and long-term memory impairment, which was mitigated by the concomitant treatment with BCP. It was also possible to notice that the animals exposed to ASP presented an increase in the activity of AChE in the hippocampus, which was protected by BCP treatment. In addition, we observed that animals treated with ASP presented an increase in ALT activity while the interaction group (ASP + BCP) had similar values to the control. Although there was a decrease in glucose levels in the ASP group, TC, TG and VLDL levels were increased, which were protected by BCP treatment.

Over the experimental period, it was not observed significant changes in body weight gain and relative weight of the organs for any of the treatments. These data are commonly used as preliminary parameters of toxicity resulting from the exposure to xenobiotics and/or toxic substances. Changes in the body weight of the animals serve as an indicator of the general health of the animals after consumption of a toxic agent, the weight of the organs is considered a sensitive indicator to assess the effect of substances since this change can occur prior to morphological changes (NIROGI, R. et al., 2014). The link between organ weight and body weight is used to correlate differences in body weight among animals, and the association between organ weight and brain (relative organ weight) is important, as it is possible to verify that the brain weight did not change even with body weight variation (BAILEY, S. A et. al, 2004; MICHAEL, B. et al., 2007). In this way, our results are in accordance with the literature since there was no change in body weight of animals treated with ASP (SOUTO, N. S. et al.; 2019; FINAMOR, I. A. et al., 2014; PROKIĆ, M. et al., 2015).

Regarding the hepatic, renal, and lipid profile of plasma parameters, it was observed that ASP group increased the ALT activity compared to control group, while the simultaneous administration of BCP (interaction group), was effective in maintaining these values similar to control. Our data are in accordance with the available scientific

literature, which has already been demonstrated that ASP in different doses and treatment times caused an increase in plasma ALT activity (ABHILASH, M. et al. 2011; ALWALEEDI, S. et al., 2016; LEBDA, M. A. et al., 2017). This increase is probably related to methanol, the main metabolite of ASP, which can promote changes in the oxidative state of liver and triggering damages to the tissue (ABHILASH et al., 2011). Of particular importance, Kelany and collaborators (2016) demonstrated that the BCP administration (200 mg/kg for 6 weeks, i.g.) restored the alteration in ALT, AST, and albumin values caused by ketoprofen administration, reinforcing the hepatoprotective potential of BCP. Furthermore, the current results showed that ASP administration triggered a decrease in the level of glucose and increase in the levels of TC, TG and VLDL, when compared to the control group. These data are in accordance with previous studies that reported the potential toxicity of ASP in different animal models and treatment schedules (EL-EZABY, M. M. et al., 2018; LEBDA, M. A. et al., 2017;). Importantly, the ASP + BCP association reduced HDL levels, but it was not effective in reducing TG levels although BCP has been shown to be effective in improving the lipid profile and useful in the treatment preclinical models of hypercholesterolemia (HARB, A. A .et al., 2018).

Different molecular and biochemical mechanisms are related to the process of memory formation and consolidation, such as the involvement of the cholinergic system, some cellular signaling and biochemical cascades, including the oxidative state of neuronal tissue (ABIDIN, Ismail et al., 2004; ABU-TAWEEL, G. M. et al., 2014; IYASWAMY, A. et al., 2018; IZQUIERDO, Ivan & MEDINA, Jorge H; 1997.). In addition, some brain structures are particularly involved in these processes, such as the hippocampus and cerebral cortex. While the cerebral cortex is involved in the initial process of memory formation, the hippocampus is a fundamental structure for maintaining long-term memory, highlighting its importance in the memory function (IZQUIERDO, I & MEDINA, J. H; 1997; BIRD, C. M. & BURGESS, N.; 2008).

In the present study, it was observed that ASP caused a mnemonic impairment demonstrated by the object recognition index for short- (31.7%) and long-term memory (24.8%) in comparison to the control group, which were restored by the association with BCP, elucidating its efficacy in protecting against the cognitive damage induced by ASP. The cognitive deficit observed herein corroborates with other studies that observed an impairment in the memory of rodents after the consumption of ASP in tests such as Y maze and Morris water maze (working and spatial memory) (ABU-TAWEEL et al., 2014;

IYASWAMY, A. et al., 2018). In addition, LINDSETH and collaborators (2014), carried out a clinical study in which was revealed that the ASP consumption by the volunteers (25 or 10 mg/kg for 8 days) induced mood changes, such as depression feelings and irritability. Besides, those who consumed ASP presented an inferior performance in some tests of spatial orientation, reinforcing that this artificial sweetener negatively modifies the neuronal process. Additionally, the OFT demonstrated no behavioral changes after the administration of the treatments, discarding any locomotor and coordinator impairment that could influence the memory parameters assessed in the ORT.

For the best of our knowledge, it is the first time that the impairment in memory functions was demonstrated after a short period of ASP exposure in rodents. The other studies applied longer periods of ASP administration and higher doses in comparison to our experimental protocol, and other routes of administration such as the subcutaneous route, suggesting that the ASP is more toxic than it was previous estimated (ABDEL-SALAM, O. M. et al., 2012; ABU-TAWEEL, G. M. et al., 2014; ONAOLAPO, A. Y. et al., 2017; IYASWAMY, A. et al., 2018).

It was already reported that the levels of the acetylcholine neurotransmitter (ACh) in the hippocampus play an important modulatory role in learning and memory functions (PARENT, M. B. et al, 2004;). In fact, inhibition of AChE activity is a pharmacological strategy used in chronic diseases such as Alzheimer's disease, in which memory functions were impaired (MAURER, S. V. et al; 2017), since the main function of this enzyme is to degrade ACh and modulate the cholinergic tonus. Thus, it is possible to hypothesized that the increase in the AChE activity in the hippocampus of the ASP-treated group is involved in the short and long-term memory injury, observed by the reduction in ORT recognition index. Furthermore, the concomitant administration with BCP was effective in restoring AChE activity, corroborating with the behavioral findings. In this sense, several studies demonstrated the link between increased AChE activity in the hippocampus and learning and memory impairment (MÜLLER, S. G. et al., 2020; HAN, Y. et al., 2019; MAHDAVINIA, M. et al., 2019; AMMARI, M. et al., 2018;), which reinforces our data. In addition, POSTU and collaborators (2019) showed that the essential oil of *Pinus halepensis*, whose main component is BCP (29.45%), reestablished memory function evaluated through the Y-maze test as well as the altered hippocampal AChE levels and oxidative damage in brain tissue in a model of dementia induced by amyloid beta peptide (1-42). Therefore, it is possible to suggest that ASP impaired short and long-term memory by increasing AChE activity, disturbing the cholinergic tonus of

central nervous system, while BCP administration positively modulated these alterations, mitigating memory dysfunction due to AChE activity balance.

Considering the cognitive damage, we sought to investigate the putative involvement of the BDNF/TrkB pathway in the effects. We observed increased levels of BDNF in the hippocampus of animals treated with the association BCP + ASP in comparison to the group treated only with ASP. These findings may have contributed to improve the performance in the ORT, because BDNF seems to play an important role both for short-term memory and to improve the synaptic plasticity of long-term memory (ALONSO, MV et al, 2002).

Concerning the BDNF synthesis, pro-BDNF, its precursor, is cleaved by endogenous enzymes to form the active BDNF that can bind to the TrkB receptor and stimulate the signaling cascade by recruiting many different proteins (BEKINSCHTEIN, P. et. Al., 2014). In the present study, it was depicted a decrease in pro-BDNF levels in the ASP group when compared to the BCP group. In addition, the increase in TrkB levels in the hippocampus of the interaction group (BCP + ASP) corroborates with other studies that demonstrated that the greater activation of this signaling pathway is related to the improvement of learning and memory functions (DU, Q, et al., 2020; SHANG, Y. et al. SONG, X. et al., 2016).

Finally, for proper data interpretation, it is important to recognize that some points were not fully comprehended. First, there is too much variation among the experimental protocols applied to assess ASP toxicity. There are major differences concerning the age of the animals, routes of administration, time of treatment, dose, and use of drugs, such as methotrexate, in an attempt of mimicking human pharmacokinetics (FERNSTROM, J. D, 1989). In addition, previous studies have already demonstrated the involvement of oxidative stress and inflammatory pathways in ASP-induced cognitive impairments to (ABU-TAWEEI et al., 2014; ONAOLAPO et al, 2017), suggesting that both mechanisms also are involved in ASP neuronal toxicity. Moreover, considering that several pharmacological actions were already assigned to BCP, including antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective (ADAMS et al., 2011), assessing the oxidative and inflammatory contribution in our study would be a future objective.

In conclusion, the present study demonstrates that BCP was effective in protecting the cognitive damage on the short- and long-term memory induced by repeated exposure to ASP as well as in preventing some plasma alterations. Importantly, the stimulation of BDNF/TrkB signaling pathway as well as the modulation of AChE activity contribute –

at least in part – to the beneficial effect of BCP treatment on the memory. Further studies aiming at mechanistic approaches will contribute to better comprehend the potential application of BCP in toxicity induced by ASP.

5. Acknowledgements and fundings

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS grant#16/2551-0000365-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant#471653/2013-6). J.T.S, L.F.F.R, M.R.F., C.W.N., M.S.O., and A.F.F. (grant #304824/2016-0 and 304825/2020-4) are the recipients of CNPq fellowships; E.V.F.R., A.R.S., S.G.M., M.H.M.S and T.B.S are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

6. Declaration of interest

The authors declare that they have no known competing for financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

ABHILASH, M.; PAUL, M. V.; VARGHESE, M. V.; NAIR, R. H. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**. v. 49, n. 6, p. 1203-7, June 2011, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.019>.

ABIDIN, Ismail et al. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. **International journal of neuroscience**, v. 114, n. 5, p. 683-699, 2004, <https://doi.org/10.1080/00207450490430543>.

ABDEL-SALAM, O. M. et al. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 16, n. 15, p. 2092-101, 2012.

ABU-TAWEEL, Gasem M. et al. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. **Neurotoxicology and teratology**, v. 42, p. 60-67, 2014, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.02.001>.

ADAMS, T. B. et al. The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2471-2494, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.011>.

ALONSO, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., & Medina, J. H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short-and long-term memory formation. *Hippocampus*, 12(4), 551-560, <https://doi.org/10.1002/hipo.10035>.

ALWALEEDI, S. Alterations in antioxidant defense system in hepatic and renal tissues of rats following aspartame intake. **J. Appl. Biol. Biotechnol**, v. 4, p. 046-052, 2016, DOI: 10.7324/JABB.2016.40207.

AMMARI, Mohamed et al. Pistacia lentiscus oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. **Brain research bulletin**, v. 140, p. 140-147, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.04.014>.

ARDALAN, Mohammad Reza et al. Nephrotoxic effect of aspartame as an artificial sweetener: A brief review. **Iranian journal of kidney diseases**, v. 11, n. 5, p. 339, 2017.

ASHOK I. et al. Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame. **International Journal of Impotence Research**. v. 0, n. 0, p. 1–7. April 2017. DOI:10.1038/ijir.2017.17.

ASHOK, Iyaswamy; SHEELADEVI, Rathinasamy; WANKHAR, Dapkupar. Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. **Journal of biomedical research**, v. 29, n. 5, p. 390, 2015. DOI: 10.7555/JBR.28.20120118.

BAHI, Amine et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & behavior**, v. 135, p. 119-124, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>.

BAILEY, Steven A.; ZIDELL, Robert H.; PERRY, Richard W. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. **Toxicologic pathology**, v. 32, n. 4, p. 448-466, 2004, <https://doi.org/10.1080/01926230490465874>.

BEKINSCHTEIN, Pedro; CAMMAROTA, Martin; MEDINA, Jorge H. BDNF and memory processing. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 677-683, 2014, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>.

BEVINS, Rick A.; BESHEER, Joyce. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>.

BIRD, Chris M.; BURGESS, Neil. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 182-194, 2008, <https://doi.org/10.1038/nrn2335>.

BRADFORD, Marion 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, n. 1-2, p. 248-254, 1976, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CHOUDHARY, Arbind Kumar; PRETORIUS, Ethersia. Revisiting the safety of aspartame. **Nutrition reviews**, v. 75, n. 9, p. 718-730, 2017, <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux035>.

DE OLIVEIRA, Cleide Correia et al. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, p. 26-31, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>.

DU, Qian; ZHU, Xiaoyu; SI, Jieru. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 1, p. 1-10, 2020, <https://doi.org/10.1177/1535370219894558>.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

EL-EZABY, Magda M. et al. Effect of some food additives on lipid profile, kidney function and liver function of adult male albino rats. **J Bas Environ Sci**, v. 5, p. 52-59, 2018.

FERNSTROM, J. D. Oral aspartame and plasma phenylalanine: pharmacokinetic difference between rodents and man, and relevance to CNS effects of phenylalanine. **Journal of neural transmission**, v. 75, n. 2, p. 159-164, 1989, <https://doi.org/10.1007/BF01677429>.

FIDYT, Klaudyna et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016, <https://doi.org/10.1002/cam4.816>.

FINAMOR, Isabela A. et al. The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. **Neurochemical research**, v. 39, n. 9, p. 1681-1690, 2014, <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1360-9>.

HAN, Yunfeng et al. Schisanhenol improves learning and memory in scopolamine-treated mice by reducing acetylcholinesterase activity and attenuating oxidative damage through SIRT1-PGC-1 α -Tau signaling pathway. **International**

Journal of Neuroscience, v. 129, n. 2, p. 110-118, 2019, <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1503183>.

HARB, Amani A.; BUSTANJI, Yasser K.; ABDALLA, Shtaywy S. Hypocholesterolemic effect of β -caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 62, n. 3, p. 230-237, 2018, <https://doi.org/10.3164/jcfn.17-3>.

HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDE, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **European journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 4, p. 451-462, 2008, <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602866>.

IYASWAMY, Ashok et al. Oxidative stress evoked damages leading to attenuated memory and inhibition of NMDAR–CaMKII–ERK/CREB signalling on consumption of aspartame in rat model. **journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 2, p. 903-916, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.11.001>.

IZQUIERDO, Ivan; MEDINA, Jorge H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997, <https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>.

KELANY, Mohamed Elsayed; ABDALLAH, Mohamed Abdelmohsen. Protective effects of combined β -caryophyllene and silymarin against ketoprofen-induced hepatotoxicity in rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 94, n. 7, p. 739-744, 2016, <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0607>.

LEBDA, Mohamed A.; TOHAMY, Hossam G.; EL-SAYED, Yasser S. Long-term soft drink and aspartame intake induces hepatic damage via dysregulation of adipocytokines and alteration of the lipid profile and antioxidant status. **Nutrition research**, v. 41, p. 47-55, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.002>.

LINDSETH, Glenda N. et al. Neurobehavioral effects of aspartame consumption. **Research in nursing & health**, v. 37, n. 3, p. 185-193, 2014, <https://doi.org/10.1002/nur.21595>.

MAHDAVINIA, Masoud et al. Protective Effect of Naringin on Bisphenol A-Induced Cognitive Dysfunction and Oxidative Damage in Rats. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 8, n. 2, p. 141, 2019, DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.8.2.141.

MAURER, Sara V.; WILLIAMS, Christina L. The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1489, 2017, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>.

MICHAEL, Bindhu et al. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 5, p. 742-750, 2007, <https://doi.org/10.1080/01926230701595292>.

MÜLLER, Sabrina G. et al. Contribution of cholinergic system and Nrf2/HO-1 signaling to the anti-amnesic action of 7-fluoro-1, 3-diphenylisoquinoline-1-amine in mice. **Chemico-biological interactions**, v. 317, p. 108959, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108959>.

NIROGI, Ramakrishna et al. What suits best for organ weight analysis: review of relationship between organ weight and body/brain weight for rodent toxicity studies. **Int J Pharm Sci Res**, v. 5, n. 4, p. 1525-1532, 2014, DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1525-32.

ONAOLAPO, Adejoke Y.; ONAOLAPO, Olakunle J.; NWOHA, Polycarp U. Aspartame and the hippocampus: revealing a bi-directional, dose/time-dependent behavioural and morphological shift in mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 139, p. 76-88, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.021>.

PARENT, Marise B.; BAXTER, Mark G. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory?. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p. 9-20, 2004, DOI:10.1101/lm.69104.

POSTU, Paula Alexandra et al. Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108673, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108673>.

PROKIĆ, Marko et al. Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. **Archives of Biological Sciences**, v. 67, n. 2, p. 535-545, 2015, DOI: 10.2298/ABS141009016P.

SHANG, Yingchun et al. rTMS Ameliorates Prenatal Stress-Induced Cognitive Deficits in Male-Offspring Rats Associated With BDNF/TrkB Signaling Pathway. **Neurorehabilitation and neural repair**, v. 33, n. 4, p. 271-283, 2019, <https://doi.org/10.1177/1545968319834898>.

SIMINTZI, Irene et al. The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An in vitro study. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2397-2401, 2007, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.016>.

SONG, Xiaoyu et al. Protective effect of silibinin on learning and memory impairment in LPS-treated rats via ROS-BDNF-TrkB pathway. **Neurochemical research**, v. 41, n. 7, p. 1662-1672, 2016, <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1881-5>.

SOUTO, N. S. et al. Behavioural and biochemical effects of one-week exposure to aflatoxin B1 and aspartame in male Wistar rats. **World Mycotoxin Journal**, v. 12, n. 3, p. 293-305, 2019, <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2424>.

THIESSEN, Kathleen M. Prioritization of Chemicals for Carcinogen Identification Committee Review Proposed Chemicals for Committee Consideration and Consultation March 2009. 2009.

VARGA, Zoltan V. et al. β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 320-334, 2018, <https://doi.org/10.1111/bph.13722>.

YOUSSEF, Dareen A.; EL-FAYOUMI, Hassan M.; MAHMOUD, Mona F. Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- γ receptors. **Chemico-biologicalinteractions**, v. 297, p. 16-24, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.010>.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976, <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.

ZAFAR, Tabassum; NAIK, Q. A. B.; SHRIVASTAVA, V. K. Aspartame: effects and awareness. **MOJ Toxicol**, v. 3, n. 2, p. 23-26, 2017, DOI: 10.15406/mojt.2017.03.00046.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A.** O tratamento com BCP e/ou ASP causou nenhuma alteração o peso corporal nem o peso relativo dos órgãos;
- B.** O tratamento com BCP e /ou ASP não alterou o estado geral dos animais, bem como a capacidade de locomoção dos mesmos;
- C.** O tratamento com BCP foi efetivo em proteger o dano na memória de curta e longa duração induzido nos animais tratados com ASP;
- D.** A administração de BCP protegeu do aumento dos níveis de ALT induzidos pela exposição ao ASP
- E.** O tratamento com BCP evitou o aumento da atividade da AChE causado pela exposição repetida ao ASP no hipocampo dos animais.
- F.** O BPC modulou positivamente a quantidade das proteínas TrKB e BDNFp no hipocampo dos animais, cuja exposição ao ASP reduziu. Finalmente, a associação BCP+ASP aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e córtex cerebral quando comparado ao grupo de animais tratado com ASP.

Diante dos resultados expostos, podemos concluir que o tratamento com BCP foi eficaz em proteger do dano cognitivo na memória de curta e longa duração causado pela administração de doses repetidas de ASP. Este efeito benéfico do BCP parece estar relacionado com a estimulação da via BDNF / TrKB, além da modulação da atividade da AChE. É importante mencionar que nossos resultados são de especial relevância, uma vez que trazem a potencial aplicação de uma substância de ocorrência natural nos alimentos (BCP) e que assim como o ASP, pode ser consumido diariamente, inclusive nas mesmas refeições. Ainda, vale ressaltar que são necessários mais estudos a fim de elucidar os mecanismos protetores contra os prejuízos cognitivos que o BCP parece apresentar frente a toxicidade induzida pelo ASP.

PERSPECTIVAS

Tendo em vista a inexistência de um modelo de toxicidade padronizado para o ASP, uma vez que a literatura científica apresenta uma variedade de estudos que utilizam dessa substância em variadas doses, vias de administração, e tempos de exposição, são necessários mais estudos a fim de elucidar os efeitos do ASP sobre o organismo, principalmente a nível de SNC, a fim de melhor entender as vias moleculares envolvidas no déficit cognitivo causado pela exposição repetida a este adoçante. Adicionalmente, mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos associados ao efeito farmacológico do BCP, buscando explorar sua aplicação como possível ferramenta terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHILASH, M. et al. **Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver.** *Food and chemical toxicology*. v. 49, n. 6, p. 1203-7, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.019>>. Acesso em 12 maio, 2020.
- ABIDIN, I. et al. **The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress.** *International journal of neuroscience*, v. 114, n. 5, p. 683-699, 2004. Disponível em <<https://doi.org/10.1080/00207450490430543>>. Acesso em maio, 2020.
- ABDEL-SALAM, O. M. et al. **Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 16, n. 15, p. 2092-101, 2012. Acesso em jun. 2020.
- ABU-TAWEEL, G. M. et al. **Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice.** *Neurotoxicology and teratology*, v. 42, p. 60-67, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.02.001>>. Acesso em maio 2021.
- ADAMS, T. B. et al. **The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients.** *Food and chemical toxicology*, v. 49, n. 10, p. 2471-2494, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.011>>. Acesso em set. 2020.
- ADARAMOYE O.A.; AKANNI O.O. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. v. 27, n. 1, p.29-37. 2016. Disponível: <Doi 10.1515/jbcpp-2014-0130>. Acesso em jun.2021.
- ALI, W. A. et al. **Aspartame: basic information for toxicologists.** *Sohag Medical Journal*, v. 23, n. 2, p. 47-51, 2019. Disponível em: <10.21608/SMJ.2019.46212>. Acesso em jun.2021.
- ALONSO, M. et al. **BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short-and long-term memory formation.** *Hippocampus*, v. 12(4), p. 551-560. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/hipo.10035>>. Acesso em jun. 2021.
- ALWALEEDI, S. **Alterations in antioxidant defense system in hepatic and renal tissues of rats following aspartame intake.** *J. Appl. Biol. Biotechnol*, v. 4, p. 046-052, 2016. Disponível em: <DOI: 10.7324/JABB.2016.40207>. Acesso em jun.2021.
- AMES-SIBIN, A. P. et al. **β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats.** *Journal of cellular biochemistry*, v. 119, n. 12, p. 10262-10277, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcb.27369>>. Acesso em abril, 2021.
- AMMARI, M. et al. **Pistacia lentiscus oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in**

rats. *Brain research bulletin*, v. 140, p. 140-147, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.04.014>>. Acesso em abril 2021.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Define os níveis de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de adoçantes é a JECFA, que faz parte da OMS – Organização Mundial de Saúde.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em fev.2020.

ARDALAN, M. R. et al. **Nephrotoxic effect of aspartame as an artificial sweetener: A brief review.** *Iranian journal of kidney diseases*, v. 11, n. 5, p. 339, 2017. Acesso em jul.2021.

ASGARPANA, J.; KAZEMIVASH, N. **Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L.** *Chinese journal of integrative medicine*, v. 19, n. 2, p. 153-159, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11655-013-1354-5>>. Acesso em maio 2021.

ASHOK I. et al. **Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame.** *International Journal of Impotence Research*. v. 0, n. 0, p. 1–7. 2017. Disponível em: <DOI:10.1038/ijir.2017.17>. Acesso em maio 2021.

ASHOK, I.; SHEELADEVI, R.; WANKHAR, D. **Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain.** *Journal of biomedical research*, v. 29, n. 5, p. 390, 2015. Disponível em: <DOI: 10.7555/JBR.28.20120118>. Acesso em maio 2021.

BAHI, Amine et al. **β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice.** *Physiology & behavior*, v. 135, p. 119-124, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>>. Acesso em maio 2021.

BAILEY, S. A.; ZIDELL, R. H.; PERRY, R. W. **Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?.** *Toxicologic pathology*, v. 32, n. 4, p. 448-466, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01926230490465874>>. Acesso em maio 2021.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. **BDNF and memory processing.** *Neuropharmacology*, v. 76, p. 677-683, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>>. Acesso em jun. 2021.

BELPOGGI, F. et al. **Results of long-term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1076, n. 1, p. 559-577, 2006. Disponível em: < DOI: 10.1196/annals.1371.080>. Acesso em jun. 2021.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. **Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study' recognition memory.** *Nature protocols*, v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>>. Acesso em jun. 2021.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. **The hippocampus and memory: insights from spatial processing.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, n. 3, p. 182-194, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn2335>>. Acesso em jun. 2021.

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, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>. Acesso em jul. 2021.

BYARD, J. L.; GOLBERG, L. **The metabolism of saccharin in laboratory animals.** *Food and cosmetics toxicology*, v. 11, n. 3, p. 391-402, 1973. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0015-6264\(73\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0015-6264(73)90005-9)>. Acesso em setembro de 2021.

BUTCHKO, H.; STARGEL, W. **Aspartame: scientific evaluation in the postmarketing period.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 34, n. 3, p. 221-233, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/rtph.2001.1500>>. Acesso em jun. 2021.

CAPITAN-VALLVEY L. F. et al., **Resolution of an intense sweetener mixture by use of a flow injection sensor with on-line solid-phase extraction.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 385, n. 2, p.385-391. 2006. Disponível em: <PMID: 16804990>. Acesso em maio 2020.

CARDOSO J. M. P.; BATTOCHIO J. R.; CARDELLO H. M. A. B., **Equi-sweetness and sweetening power of different sweetening agents in different temperatures of consumption of tea drink in soluble power.** *Food Science and Technology*. v. 24, n. 3, p. 448-452. 2004.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000300025>>. Acesso em maio 2021.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, ISABEL C. F. R. **Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 107, p. 302-317, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>>. Acesso em jul. 2021.

CEDERBAUM, A. I.; QURESHI, A. **Role of catalase and hydroxyl radicals in the oxidation of methanol by rat liver microsomes.** *Biochemical pharmacology*, v. 31, n. 3, p. 329-335, 1982. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90179-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90179-4)>. Acesso em jun. 2021.

CHATTOPADHYAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. **Artificial sweeteners—a review.** *Journal of food science and technology*, v. 51, n. 4, p. 611-621, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0571-1>>. Acesso em jul.2021.

CHOUDHARY, A. K.; PRETORIUS, E. **Revisiting the safety of aspartame.** *Nutrition reviews*, v. 75, n. 9, p. 718-730, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nux035>>. Acesso em jul, 2021.

CHRISTIAN, B. et al. **Chronic aspartame affects T-maze performance, brain cholinergic receptors and Na⁺, K⁺-ATPase in rats.** *Pharmacology biochemistry and behavior*, v. 78, n. 1, p. 121-127, 2004.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.02.017>>. Acesso em jun. 2021.

CLEMENTE, Jose C. et al. **The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view.** *Cell*, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>>. Acesso em setembro de 2021.

DA SILVEIRA, Alice Rosa et al. **Therapeutic potential of beta-caryophyllene against aflatoxin B1-Induced liver toxicity: Biochemical and molecular insights in rats.** *Chemico-Biological Interactions*, p. 109635, 2021. Disponível

em:<<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109635>>. Acesso em setembro de 2021.

DAVOLI, E. et al. **Serum methanol concentrations in rats and in men after a single dose of aspartame.** *Food and chemical toxicology*, v. 24, n. 3, p. 187-189, 1986.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90227-9](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90227-9)>. Acesso em jul 2021.

DE OLIVEIRA, C. C. et al. **Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures.** *Epilepsy & Behavior*, v. 56, p. 26-31, 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>>. Acesso em set. 2020.

DE OLIVEIRA, C. V. et al. **Subtle improvement of seizure susceptibility by atorvastatin treatment during epileptogenesis.** *Pharmacological Reports*, v. 70, n. 2, p. 364-371, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.08.016>>.

Acesso em set. 2021.

DOROKHOV, Y. L. et al. **Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles.** *Physiological Reviews*. v. 95, n. 2, p. 603-44, 2015. Disponível em:

<DOI: 10.1152/physrev.00034.2014>. Acesso em dez. 2020.

DU, Q.; ZHU, X.; SI. **Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway.** *Experimental Biology and Medicine*, v. 245, n. 1, p. 1-10, 2020.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1535370219894558>>. Acesso em abril 2021.

EFSA, A. **Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive.** *EFSA Journal*. n. 11, v.12,p.:3496, 2013. Acesso em março 2020.

ELLMAN, G. L. et al. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)>. Acesso em abril 2021.

EL-EZABY, M. M. et al. **Effect of some food additives on lipid profile, kidney function and liver function of adult male albino rats.** *J Bas Environ Sci*, v. 5, p. 52-59, 2018. Acesso: jul. 2021.

FEIJÓ, F. de M. et al. **Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels.** *Appetite*, v. 60, p. 203-207, 2013.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.10.009>>. Acesso em jul. 2021.

FERNSTROM, J. D. **Oral aspartame and plasma phenylalanine: pharmacokinetic difference between rodents and man, and relevance to CNS effects of phenylalanine.** *Journal of neural transmission*, v. 75, n. 2, p. 159-164, 1989.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01677429>>. Acesso em jul 2021.

FIDYT, K. et al. **β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties.** *Cancer medicine*, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cam4.816>>. Acesso em jun. 2021.

FINAMOR I.A. et al, **The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Oxidative Stress in the Brain Caused by the Long-Term Intake of Aspartame by Rats.**

Neurochemical Research. v. 39, p. 1681–1690. 2014.

Disponível em: <DOI 10.1007/s11064-014-1360-9>. Acesso em jul. 2021.

FINAMOR, I. et al. **Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice.** *Redox biology*, v. 11, p. 701-707, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.019>>. Acesso em jul. 2021.

FRANCOMANO, Fabrizio et al. **β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties.** *Applied Sciences*, v. 9, n. 24, p. 5420, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.3390/app9245420>>. Acesso em setembro de 2021.

FREITAS, A. S.; ARAUJO, A. B. **Edulcorante artificial: aspartame-uma revisão de literatura.** *Revista Eletrônica Científica do IFBA, Bahia*, n. 1, 2010.

Disponível em:<<https://publicacoes.ifba.edu.br/index.php/Pindorama/article/view/360>>. Acesso em jul. 2021.

GARCÍA-ALMEIDA J. M.; CASADO F. G. M.;GARCÍA-ALEMÁN J. **A current and global review of sweeteners. Regulatory aspects.** *Nutricion Hospitalaria*. v. 28, n.

(Supl. 4), p.17-31. 2013; Disponível em: <DOI 10.3305/nh.2013.28.sup4.6793>.

Acesso em set. 2020.

HAN, Y. et al. **Schisanhenol improves learning and memory in scopolamine-treated mice by reducing acetylcholinesterase activity and attenuating oxidative damage through SIRT1-PGC-1 α -Tau signaling pathway.** *International Journal of Neuroscience*, v. 129, n. 2, p. 110-118, 2019.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1503183>>. Acesso em maio

2021.

HARRIS, C. et al. **Methanol metabolism and embryotoxicity in rat and mouse conceptuses: comparisons of alcohol dehydrogenase (ADH1), formaldehyde dehydrogenase (ADH3), and catalase.** *Reproductive Toxicology*, v. 17, n. 3, p. 349-

357, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(03\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(03)00013-3)>. Acesso em jul. 2021.

HARTE, C. B.; KANAREK, R. B. **The effects of nicotine and sucrose on spatial memory and attention.** *Nutritional Neuroscience*, 7, 121– 125. 2004. Disponível em: <DOI: 10.1080/1028415041000170.4543>. Acesso em dez. 2020.

HARB, A. A.; BUSTANJI, Y. K.; ABDALLA, S. S. **Hypocholesterolemic effect of β -caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet.** *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, v. 62, n. 3, p. 230-237, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3164/jcbtn.17-3>>. Acesso em maio 2021.

HAMOUDA, Asmaa F. **A Biochemical Study of Agarwood on Methanol Injection in Rat.** *Journal of Drug and Alcohol Research*, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2019. Disponível em: <DOI:10.4303/jdar/236073>. Acesso em setembro de 2021.

HU, Yawei et al. **Trans-caryophyllene inhibits amyloid β (A β) oligomer-induced neuroinflammation in BV-2 microglial cells.** *International immunopharmacology*, v. 51, p. 91-98, 2017. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.009>>. Acesso em setembro de 2021.

HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDE, H. **Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain.** *European journal of clinical nutrition*, v. 62, n. 4, p. 451-462, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602866>>. Acesso em maio 2021.

IYASWAMY, A. et al. **Oxidative stress evoked damages leading to attenuated memory and inhibition of NMDAR–CaMKII–ERK/CREB signalling on consumption of aspartame in rat model.** *Journal of food and drug analysis*, v. 26, n. 2, p. 903-916, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.11.001>>. Acesso em jun. 2021.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. **Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures.** *Neurobiology of learning and memory*, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>>. Acesso em jun. 2021.

KELANY, M. E.; ABDALLAH, M. A. **Protective effects of combined β -caryophyllene and silymarin against ketoprofen-induced hepatotoxicity in rats.** *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 94, n. 7, p. 739-744, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0607>>. Acesso em jun. 2021.

KIM, J-Y; PRESCOTT, J.; KIM, K.-O. **Emotional responses to sweet foods according to sweet liker status.** *Food Quality and Preference*, v. 59, p. 1-7, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.013>>. Acesso em jun. 2021.

KROGER, M.; MEISTER, K.; KAVA, R. **Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. v. 5, n. 2, p. 35-47, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x>>. Acesso em jul. 2021.

KRUSE, JAMES A. **Methanol and ethylene glycol intoxication.** *Critical care clinics*, v. 28, n. 4, p. 661-711, 2012.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.002>>. Acesso em jul. 2021.

LANDRIGAN, P. J.; STRAIF, K. **Aspartame and cancer—new evidence for causation.** *Environmental Health*, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12940-021-00725-y>>. Acesso em jul. 2021.

LEBDA, M. A.; TOHAMY, H. G.; EL-SAYED, Y. S. **Long-term soft drink and aspartame intake induces hepatic damage via dysregulation of adipocytokines and alteration of the lipid profile and antioxidant status.** *Nutrition research*, v. 41, p. 47-55, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.002>>. Acesso em maio 2021.

LERER, B. **Studies on the role of brain cholinergic systems in the therapeutic mechanisms and adverse effects of ECT and lithium.** *Biological psychiatry*, v. 20, n. 1, p. 20-40, 1985. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0006-3223\(85\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0006-3223(85)90132-5)>. Acesso em jul. 2021.

LINDSETH, G. N. et al. **Neurobehavioral effects of aspartame consumption.** *Research in nursing & health*, v. 37, n. 3, p. 185-193, 2014.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/nur.21595>>. Acesso em maio 2021.

MCNEIL, M.; FACEY, P.; PORTER, R. **Essential oils from the Hyptis genus-A review (1909-2009).** *Natural product communications*, v. 6, n. 11, p. 1934578X1100601149, 2011.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1934578X1100601149>>. Acesso em maio 2021.

MAGNUSON, B. A. et al., **Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies.** *Critical Reviews in Toxicology*. v. 37, n. 8, p. 629-727, 2007.

Disponível em: <DOI: 10.1080/10408440701516184>. Acesso em março 2020.

MAGNUSON, B.; WILLIAMS, G. M. **Carcinogenicity of aspartame in rats not proven.** *Environmental health perspectives*, v. 116, n. 6, p. A239-A240, 2008.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1289/ehp.10881>>. Acesso em maio 2021.

MAGNUSON, B. A. et al. **Biological fate of low-calorie sweeteners.** *Nutrition Reviews*, 74(11), 670–689. 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw032>>. Acesso em jun. 2021.

MAHDAVINIA, M. et al. **Protective Effect of Naringin on Bisphenol A-Induced Cognitive Dysfunction and Oxidative Damage in Rats.** *International journal of molecular and cellular medicine*, v. 8, n. 2, p. 141, 2019.

Disponível em <DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.8.2.141>. Acesso em maio 2021.

MAURER, S. V.; WILLIAMS, C. L. **The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells.** *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 1489, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>>. Acesso em jun. 2021.

MICHAEL, B. et al. **Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices.** *Toxicologic pathology*, v. 35, n. 5, p. 742-750, 2007.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01926230701595292>>. Acesso em jul. 2021.

MOORADIAN, A. D.; SMITH, M.; TOKUDA, M. **The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review.** *Clinical nutrition eSPen*, v. 18, p. 1-8, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.004>>. Acesso em maio 2021.

MOURAD N.; NOOR A. **Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. v. 2, n. 1, p. 4-10. 2011. Acesso em jul. 2021.

MÜLLER, S. G. et al. **Contribution of cholinergic system and Nrf2/HO-1 signaling to the anti-amnesic action of 7-fluoro-1, 3-diphenylisoquinoline-1-amine in mice.** *Chemico-biological interactions*, v. 317, p. 108959, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108959>>. Acesso em jul. 2021.

NIROGI, R. et al. **What suits best for organ weight analysis: review of relationship between organ weight and body/brain weight for rodent toxicity studies.** *Int J Pharm Sci Res*, v. 5, n. 4, p. 1525-1532, 2014.

Disponível em: <DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(4).1525-32>. Acesso em maio 2021.

ONAOLAPO, A Y.; ONAOLAPO, O. J.; NWOHA, P. U. **Aspartame and the hippocampus: revealing a bi-directional, dose/time-dependent behavioural and morphological shift in mice.** *Neurobiology of learning and memory*, v. 139, p. 76-88, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.021>>. Acesso em jun. 2021.

PARENT, M. B.; BAXTER, M. G. **Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory?.** *Learning & Memory*, v. 11, n. 1, p. 9-20, 2004. Disponível em: <DOI:10.1101/lm.69104>. Acesso em jun. 2021.

PFEFFER, M.; ZIESENITZ, S. C.; SIEBERT, G. **Acesulfame K, cyclamate and saccharin inhibit the anaerobic fermentation of glucose by intestinal bacteria.** *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, v. 24, n. 4, p. 231-235, 1985. Acesso em setembro de 2021.

POSTU, P. A. et al. **Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 112, p. 108673, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108673>>. Acesso em jul 2021.

PROKIĆ, M. et al. **Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood.** *Archives of Biological Sciences*, v. 67, n. 2, p. 535-545, 2015. Disponível em: <DOI: 10.2298/ABS141009016P>. Acesso em jul. 2021.

RABEN A.; VASILARAS T. H.; MOLLER A. C.; ASTRUP A. **Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects.** *The American Journal of Clinical Nutrition.* v. 76, n. 4, p. 721-729, 2002. Disponível em: <PMID: 12324283>. Acesso em dez. 2020.

REAGAN-SHAW, Shannon; NIHAL, Minakshi; AHMAD, Nihal. **Dose translation from animal to human studies revisited.** *The FASEB journal,* v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>>. Acesso em março de 2019.

ROBERTS, A. et al. **Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man.** *Food and chemical toxicology,* v. 38, p. 31-41, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00026-0)>. Acesso em setembro de 2021.

ROGERS P. J.; PLEMING H. C.; BLUNDELL J. E. **Aspartame ingested without tasting inhibits hunger and food intake.** *Physiology & Behavior.,* v. 47, n. 6, p. 1239-1243, 1990. Acesso em dez. 2020.

SHANG, Y. et al. **rTMS Ameliorates Prenatal Stress-Induced Cognitive Deficits in Male-Offspring Rats Associated With BDNF/TrkB Signaling Pathway.** *Neurorehabilitation and neural repair,* v. 33, n. 4, p. 271-283, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1545968319834898>>. Acesso em maio 2021.

SHARMA, C. et al. **Polypharmacological properties and therapeutic potential of β -caryophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise.** *Current pharmaceutical design,* v. 22, n. 21, p. 3237-3264, 2016. Acesso em maio 2021.

SILVA, A. E. et al. **Avaliação dos efeitos do aspartame sobre a ingestão alimentar, os parâmetros físicos, bioquímicos e histopatológicos em ratos Wistar.** *Arq. bras. med. vet. zootec,* v. 68, n. 6, p. 1516-1522, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-8517>>. Acesso em jun. 2021.

SIMINTZI, I. et al. **The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An in vitro study.** *Food and chemical toxicology,* v. 45, n. 12, p. 2397-2401, 2007. Disponível em : <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.016>>. Acesso em jul. 2021.

SONG, X. et al. **Protective effect of silibinin on learning and memory impairment in LPS-treated rats via ROS-BDNF-TrkB pathway.** *Neurochemical research,* v. 41, n. 7, p. 1662-1672, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11064-016-1881-5>>.

SOUTO, N. S. et al. **Behavioural and biochemical effects of one-week exposure to aflatoxin B1 and aspartame in male Wistar rats.** *World Mycotoxin Journal,* v. 12, n. 3, p. 293-305, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2424>>. Acesso em jun. 2021.

SUEZ, Jotham et al. **Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota.** *Nature*, v. 514, n. 7521, p. 181-186, 2014. Disponível em: <DOI: 10.1038/nature13793. Epub 2014 Sep 17.>. Acesso em setembro de 2021.

SWITHERS S. E.; DAVIDSON T. L. **A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats.** *Behavioral Neuroscience*. v. 122, n. 1, p. 161-173, 2008. Disponível em: <DOI: 10.1037/0735-7044.122.1.161>. Acesso em dez. 2020.

SWITHERS S. E.; BAKER C. R.; DAVIDSON T. L. **General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats** *Behavioral Neuroscience*. v. 123, n. 4, p. 772-780, 2009. Disponível em: <DOI: 10.1037/a0016139>. Acesso em jun. 2021.

TKACHEV, A. V. **The chemistry of caryophyllene and related compounds.** *Chemistry of Natural Compounds*, v. 23, n. 4, p. 393-412, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00597793>>. Acesso em jul. 2021.

TEPHLY, T. R. **The toxicity of methanol.** *Life sciences*, v. 48, n. 11, p. 1031-1041, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90504-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90504-5)>.

THIESSEN, K. M. **Prioritization of Chemicals for Carcinogen Identification** *Committee Review Proposed Chemicals for Committee Consideration and Consultation*, 2009. 2009. Acesso em mar. 2019.

TOVAR, A. P. et al. **The effect of moderate consumption of non-nutritive sweeteners on glucose tolerance and body composition in rats.** *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, n. 999, p. 1-3, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0120>>. Acesso em jul. 2021.

VARGA, Z. V. et al. **β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice.** *British journal of pharmacology*, v. 175, n. 2, p. 320-334, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/bph.13722>>. Acesso em jul. 2021.

VAN WYMELBEKE V.; BERIDOT-THEROND M. E.; LA GUERONNIERE V. **Influence of repeated consumption of beverages containing sucrose or intense sweeteners on food intake.** *European Journal of Clinical Nutrition - Nature*. v. 58, p. 154-161, 2004. Disponível em: <DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601762>. Acesso em jul. 2021.

YAMADA, K; NABESHIMA, T. **Brain-driven neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes.** *Journal of pharmacological sciences*, v. 91, n. 4, p. 267-270, 2003. Disponível em <[https://doi.org/10.1254/S1347-8613\(19\)32708-2](https://doi.org/10.1254/S1347-8613(19)32708-2)>. Acesso em jun. 2021.

YAMAGUCHI, Masayoshi; LEVY, Robert M. **The combination of β -caryophyllene, baicalin and catechin synergistically suppresses the proliferation and promotes the death of RAW267. 4 macrophages in vitro.** *International journal of molecular medicine*, v. 38, n. 6, p. 1940-1946, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2801>>. Acesso em setembro de 2021

YOUSSEF, D. A.; EL-FAYOUMI, H. M.; MAHMOUD, M. F. **Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- γ receptors.** *Chemico-biologicalinteractions*, v. 297, p. 16-24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.010>>. Acesso em maio 2021.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. **The open-field test: a critical review.** *Psychological bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482, 1976. Disponível em: <<https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>>. Acesso em jul. 2021.

WIKOFF, D. S. et al. **Lack of potential carcinogenicity for aspartame—Systematic evaluation and integration of mechanistic data into the totality of the evidence.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 135, p. 110866, 2020. Acesso em maio 2021.

WURTMAN RJ, M. T. J. **Effects of oral aspartame on plasma fenilalanine in humanos and experimental roents.** *J Neural Transm* 70: 169-173, 1978. Acesso em jul. 2021.

ZAFAR, T.; NAIK, Q. A. B.; SHRIVASTAVA, V. K. **Aspartame: effects and awareness.** *MOJ Toxicol*, v. 3, n. 2, p. 23-26, 2017. Disponível em: <DOI: 10.15406/mojt.2017.03.00046>. Acesso em maio 2021.

ANEXO I



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO BETA-CARIOFILENO FRENTE À EXPOSIÇÃO AO ASPARTAME EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 6934060519, sob a responsabilidade de **Ana Flávia Furian e equipe; Alice Rosa da Silveira; Andressa do Amaral Vaz; Erica Vanessa Furlan Rosa; Mauro Schneider Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 16/07/2019.

We certify that the proposal "BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF BETA-CARIOPHILENE AGAINST EXPOSURE TO ASPARTAME IN RATS", utilizing 80 Heterogenics rats (80 males), protocol number CEUA 6934060519, under the responsibility of **Ana Flávia Furian and team; Alice Rosa da Silveira; Andressa do Amaral Vaz; Erica Vanessa Furlan Rosa; Mauro Schneider Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 07/16/2019.

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

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **03/2022**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 30 dias**

N: **80**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **40 a 60 g**

Resumo: O aspartame (ASP) é um edulcorante, utilizado em substituição a sacarose em muitas matrizes alimentares, além de ser amplamente utilizado como adoçante de mesa. Entretanto, desde que foi lançado no mercado, em 1981, muitos estudos demonstraram que essa substância pode acarretar em prejuízos para a saúde, através da indução do estresse oxidativo, atuando em diversos tecidos, sendo que de todos os metabólitos do ASP, o metanol é capaz de provocar toxicidade sistêmica no fígado. O β -cariofileno (BCF), presente em muitos alimentos como pão, café, bebidas alcoólicas e também especiarias (pimenta preta, canela, manjeriço) apresenta atividade antioxidante bem descrita na literatura. Como essas duas substâncias são comumente consumidas e podem estar presentes na mesma refeição, o objetivo do nosso trabalho será avaliar o efeito do BCF (100 mg/Kg i.p) frente a exposição ao aspartame (75mg/kg, v.o.), por 14 dias. Após os tratamentos serão realizados testes comportamentais a fim de avaliar parâmetros de locomoção, ansiedade, aprendizado, memória e depressão, além de parâmetros enzimáticos e não enzimáticos de estresse oxidativo sobre o fígado, rins, hipocampo e córtex cerebral. Também vamos quantificar a carbonilação proteica e níveis de 3-nitrotirosina, a atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, bem como alterações na morfologia e imunorreatividade da proteína quinase A (PKA-Ser96) e proteína quinase C (PKC-Ser957). Os resultados obtidos permitirão uma visão mais ampla dos possíveis efeitos positivos do BCF frente à exposição ao ASP.

Local do experimento: Laboratório 5219, prédio 21

Santa Maria, 21 de agosto de 2019

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria