

**"ALÉM DOS BENZODIAZEPÍNICOS: LIMONENO E SEU POTENCIAL
ANSIOLÍTICO REVELADO POR SIMULAÇÕES MOLECULARES"**

**"BEYOND BENZODIAZEPINES: LIMONENE AND ITS ANXIOLYTIC
POTENTIAL REVEALED BY MOLECULAR SIMULATIONS"**

Antonio Eufrásio Vieira-Neto

Pós-doutor em Bioinformática Estrutural
Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza-CE
E-mail: aevneto@gmail.com

Natália Chaves Gondim Vieira

Doutorando em Biotecnologia (RENORBIO),
Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza-CE
E-mail: natyvieira@alu.ufc.br

José Ismael Feitosa de Araújo

Doutorando em Biotecnologia (RENORBIO),
Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza-CE
E-mail: ismaelfeitosa.araujo@gmail.com

Maria Celina Feitosa de Araujo

Graduanda em Medicina Veterinária,
Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC), Tauá-CE
E-mail: celinaaraujo@uece.br

Adam Jackson Oliveira Sousa

Graduando em Ciências Biológica,
Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC), Tauá-CE
E-mail: adam.sousa@aluno.uece.br

Francisco Marcones Moura Silva

Doutorando em Educação,
Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-CE
Email: francisco.marcones@aluno.uece.br

Ana Cristina de Oliveira Monteiro-Moreira

Doutora em Bioquímica
Universidade de Fortaleza
E-mail: acomoreira@unifor.br

Recebido: 15/05/2025 – Aceito: 30/05/2025

Resumo

Os produtos naturais, especialmente os metabólitos secundários de óleos essenciais e extratos vegetais, têm ganhado destaque na pesquisa farmacológica devido aos seus efeitos terapêuticos

associados a um perfil de segurança mais favorável em comparação aos benzodiazepínicos (BZD), amplamente usados no tratamento da ansiedade. Entre esses compostos, destaca-se o limoneno, um monoterpene monocíclico abundante em espécies da família *Rutaceae*, com potencial para modular neurotransmissores centrais como dopamina, serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA) e ácido glutâmico, todos relacionados à regulação da ansiedade. Este estudo avaliou o potencial ansiolítico do limoneno por meio de simulações de docking molecular com o receptor GABA_A, comparando seus resultados com os do diazepam. O software Hex 8.0.0 foi utilizado para realizar o acoplamento molecular entre o limoneno e o receptor GABA_A (PDB ID: 4COF), e a metodologia foi validada com uma simulação adicional do diazepam. As interações moleculares e o posicionamento dos ligantes nos sítios de ligação foram analisados com o auxílio do PyMOL 1.4.7. Os resultados demonstraram que o limoneno apresentou afinidade e seletividade pelo mesmo sítio de ligação do diazepam no receptor GABA_A, sugerindo atividade ansiolítica mediada por esse receptor. Esses achados indicam que o limoneno pode atuar como modulador alostérico positivo, com efeitos semelhantes aos dos BZD, porém possivelmente com menos efeitos adversos. Com base no que foi exposto, conclui-se que o limoneno é um candidato promissor para o desenvolvimento de terapias ansiolíticas à base de compostos naturais. No entanto, estudos *in vivo* e clínicos são essenciais para confirmar sua eficácia e segurança. A combinação de abordagens computacionais e experimentais pode acelerar sua validação e ampliar as perspectivas da farmacognosia moderna.

Palavras-chave: Produtos Naturais; Fitoquímicos; terpenos; Docking Molecular.

Abstract

Natural products, especially secondary metabolites of essential oils and plant extracts, have gained prominence in pharmacological research due to their therapeutic effects associated with a more favorable safety profile compared to benzodiazepines (BZDs), widely used in the treatment of anxiety. Among these compounds, limonene stands out, a monocyclic monoterpene abundant in species of the *Rutaceae* family, with the potential to modulate central neurotransmitters such as dopamine, serotonin, γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid, all related to the regulation of anxiety. This study evaluated the anxiolytic potential of limonene through molecular docking simulations with the GABA_A receptor, comparing its results with those of diazepam. The Hex 8.0.0 software was used to perform the molecular docking between limonene and the GABA_A receptor (PDB ID: 4COF), and the methodology was validated with an additional simulation of diazepam. Molecular interactions and ligand positioning in the binding sites were analyzed using PyMOL 1.4.7. The results demonstrated that limonene showed affinity and selectivity for the same binding site as diazepam in the GABA_A receptor, suggesting anxiolytic activity mediated by this receptor. These findings indicate that limonene can act as a positive allosteric modulator, with effects similar to those of BZDs, but possibly with fewer adverse effects. Based on the above, it is concluded that limonene is a promising candidate for the development of anxiolytic therapies based on natural compounds. However, *in vivo* and clinical studies are essential to confirm its efficacy and safety. The combination of computational and experimental approaches can accelerate its validation and broaden the perspectives of modern pharmacognosy.

Keywords: Natural Products; Phytochemicals; Terpenes; Molecular Docking.

1. Introdução

Nos últimos anos, os produtos naturais têm sido amplamente explorados na busca por novas alternativas terapêuticas, especialmente no tratamento de transtornos mentais como a ansiedade (Stephane et al., 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os transtornos ansiosos afetam mais de 260 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das principais causas de incapacidade funcional (Bimerew et al., 2024). No Brasil, dados epidemiológicos indicam que cerca de 9,3% da população sofre de algum transtorno de ansiedade, posicionando o país como líder mundial em prevalência dessas condições. Essa realidade reforça a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, com maior segurança, eficiência e menos efeitos adversos (De Menezes et al., 2024). Metabólitos secundários presentes em óleos essenciais e extratos de plantas têm sido amplamente caracterizados e estudados para determinar se esses compostos, isoladamente, podem oferecer benefícios terapêuticos com menos efeitos colaterais em comparação aos medicamentos convencionais, como os benzodiazepínicos (BZD) (Camilo et al., 2022).

Nesse contexto, compostos bioativos derivados de plantas têm ganhado destaque, sobretudo os metabólitos secundários presentes em óleos essenciais (Lima et al., 2020) e extratos vegetais (Diniz et al., 2019 et al., 2024; Azevedo et al., 2024; Souza et al., 2023). Esses compostos apresentam uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e ansiolíticas. Especificamente no tratamento da ansiedade, diversos estudos têm sugerido que esses fitoquímicos podem atuar sobre diferentes sistemas de neurotransmissão, promovendo efeitos terapêuticos significativos com baixa toxicidade (Araujo et al., 2025). Dentre esses compostos, destacam-se os terpenos, uma ampla classe de substâncias naturais com potentes efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) (Vieira et al., 2024).

O limoneno, um dos principais metabólitos secundários na fitoquímica vegetal, pertence à família dos terpenos e à classe dos monoterpenos monocíclicos (Masyita et al., 2022). Este composto, presente em óleos essenciais de plantas aromáticas, como as da família Rutaceae, possui a fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ e demonstra um grande potencial na modulação de neurotransmissores como dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido γ -aminobutírico (GABA), e ácido glutâmico (Glu), além de seus metabólitos (Silveira et al., 2022).

Embora os efeitos ansiolíticos do limoneno sejam promissores, é

essencial investigá-los em diferentes níveis para compreender plenamente seu potencial terapêutico. Atualmente, as metodologias de farmacologia *in silico* são fundamentais no processo de descoberta de medicamentos (Toropova, 2017; Sahu et al., 2024). Essas abordagens, incluindo docking molecular, simulação de dinâmica molecular e cálculos de energias livres de ligação, têm demonstrado produzir previsões precisas sobre interações moleculares (Erdogan et al., 2021). Quando comparadas aos métodos tradicionais *in vitro* e *in vivo*, as técnicas *in silico* oferecem a vantagem de economizar tempo e recursos, tornando-se uma ferramenta poderosa na investigação do papel de fitoquímicos na neurotransmissão GABAérgica (Sahu et al., 2024).

O docking molecular é uma das principais técnicas *in silico* utilizadas para essa finalidade. Ele permite prever a orientação preferencial de um ligante ao se ligar a um receptor e estimar a energia de interação entre eles. Quando associado a simulações de dinâmica molecular e análises de energia livre de ligação, o docking molecular fornece subsídios importantes para a seleção de candidatos a fármacos, reduzindo significativamente o custo e o tempo envolvidos na fase de triagem (Daina et al., 2016)

Considerando o potencial farmacológico do limoneno e os avanços das ferramentas computacionais, o presente estudo teve como objetivo investigar, por meio de docking molecular, as interações entre o limoneno e o receptor GABAA, principal alvo dos benzodiazepínicos clássicos. Ao comparar os resultados obtidos com o diazepam, ligante de referência clássico, buscamos avaliar a afinidade do limoneno por esse receptor, bem como sua possível atuação como agente ansiolítico natural.

2. Metodologia

Experimentação *in silico*: Docking molecular

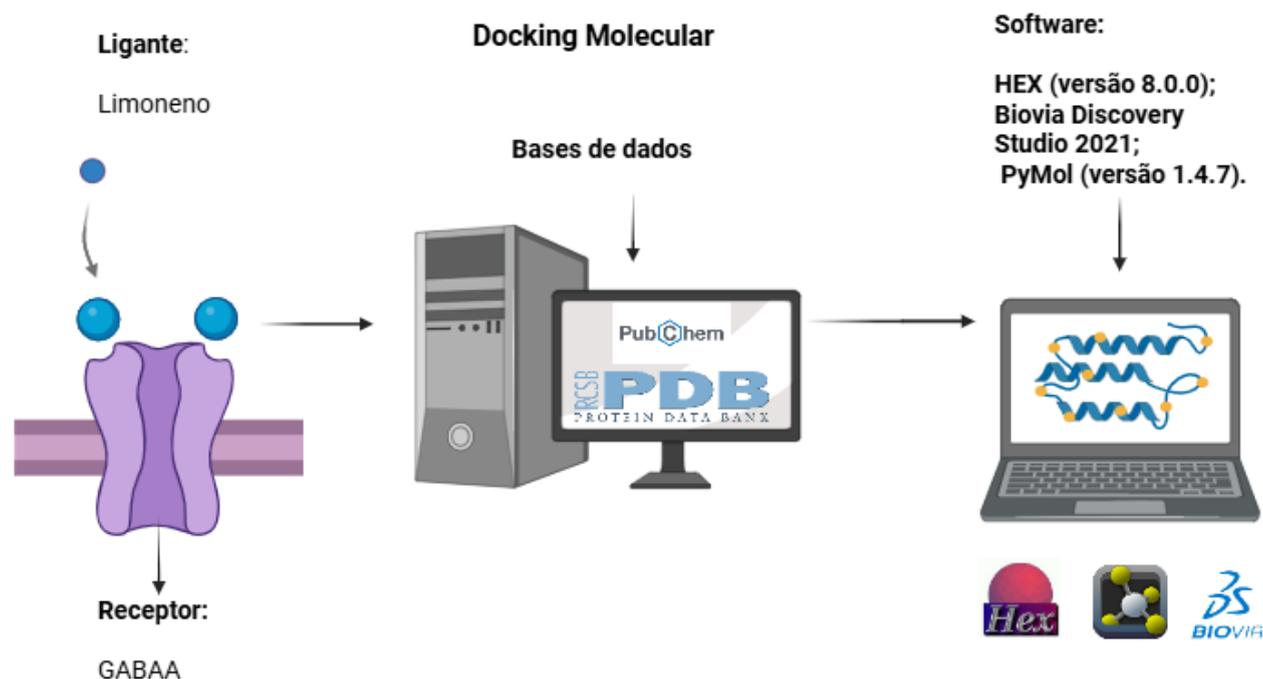
As simulações foram conduzidas utilizando um sistema de algoritmos do software HEX, versão 8.0.0, de 64 bits (Macindoe *et al.*, 2010). Neste software, é feita uma varredura em toda a superfície do receptor, buscando todas as

possibilidades de encaixe do ligante, com base na compatibilidade espacial, química e energética. Outro software utilizado foi o PyMol, versão 1.4.7 (Delano, 2015), que foi selecionado como ferramenta para análise dos complexos formados, gerando imagens tridimensionais bem detalhadas. Ambos os softwares são disponibilizados gratuitamente para uso acadêmico.

A interação entre o fitoquímico (limoneno), obtido do banco de dados PubChem (CID: 22311), o diazepam (CID: 3016), e o receptor GABA_A foi analisada *in silico* utilizando simulação de docking molecular. Receptor GABA_A (PDB ID: 4COF) obtido do banco de dados Protein Data Bank (PDB). Essa estrutura 3D foi elucidada por cristalografia e depositada no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) com uma resolução de 2,97 angstroms (Miller; Aricescu, 2014).

Seguindo o procedimento padrão de docking com o Hex 8.0.0, foi realizada uma varredura em toda a superfície do receptor até a formação de 50.000 complexações independentes. Para isso foram considerados como tipos de correlação: a energia de interação, a compatibilidade espacial e estrutural, as ligações químicas permitidas e as possíveis impedimentos espaciais, resultando em 10 poses finais, ordenadas de forma decrescente de energia. Em seguida, foi realizado um novo docking molecular do ligante clássico do receptor (diazepam) como validação do protocolo de docking, buscando uma análise comparativa em relação à especificidade do ligante ao sítio de ligação. Os clusters obtidos foram analisados utilizando o software PyMol, versão 1.4.7 (Delano, 2015), permitindo uma investigação detalhada dos complexos (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma da estratégia experimental de docking molecular entre Limoneno e o receptor GABA_A.



Fonte: autor.

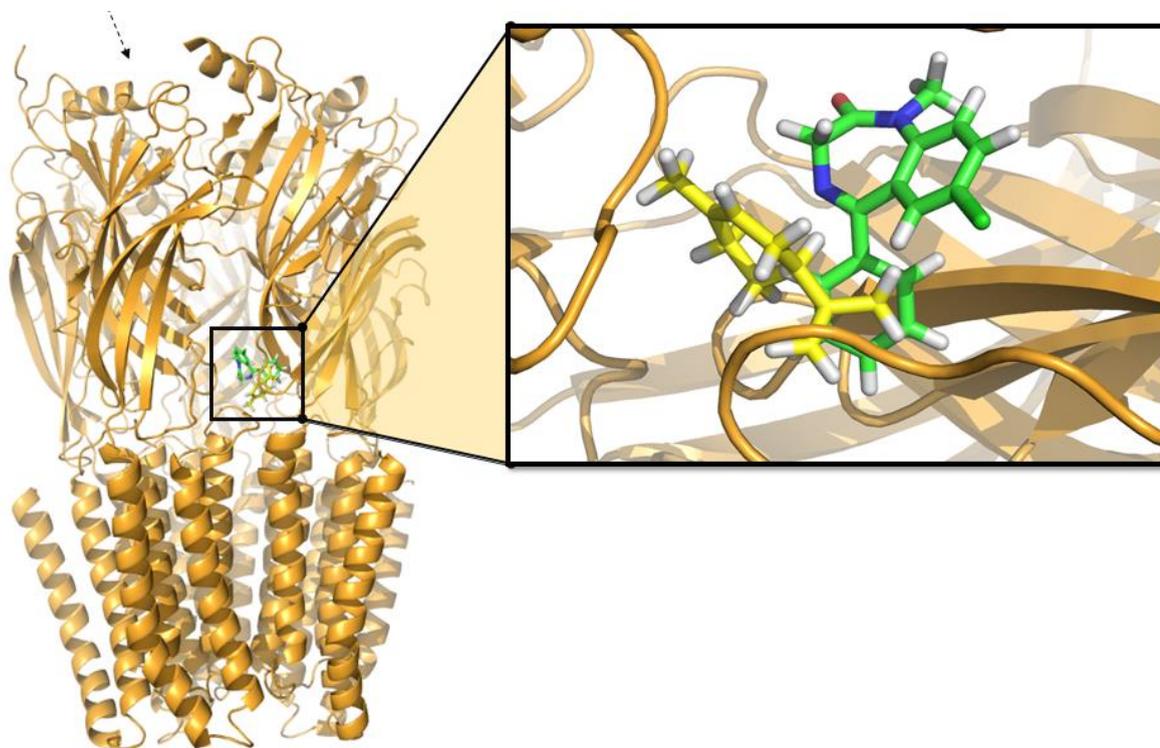
3. Resultados e Discussão

Análise do complexo Limoneno-GABA_A

As simulações de docking realizadas no presente estudo demonstraram que o limoneno apresenta afinidade significativa pelo sítio de ligação do receptor GABA_A, coincidindo com a mesma região de interação ocupada pelo diazepam, um ansiolítico clássico da classe dos benzodiazepínicos. Essa sobreposição espacial reforça a hipótese de que o limoneno pode mimetizar os efeitos ansiolíticos de substâncias sintéticas, sugerindo sua atuação potencial como modulador alostérico positivo do receptor GABA_A (Figura 2).

Figura 2. Complexo formado entre o receptor GABA_A e os ligantes: Diazepam (stick verde) e Limoneno (stick amarelo), destacando a afinidade e especificidade

no mesmo sítio de ligação (cartoon laranja). A estrutura dos ligantes é apresentada ao fundo.



Fonte: autor

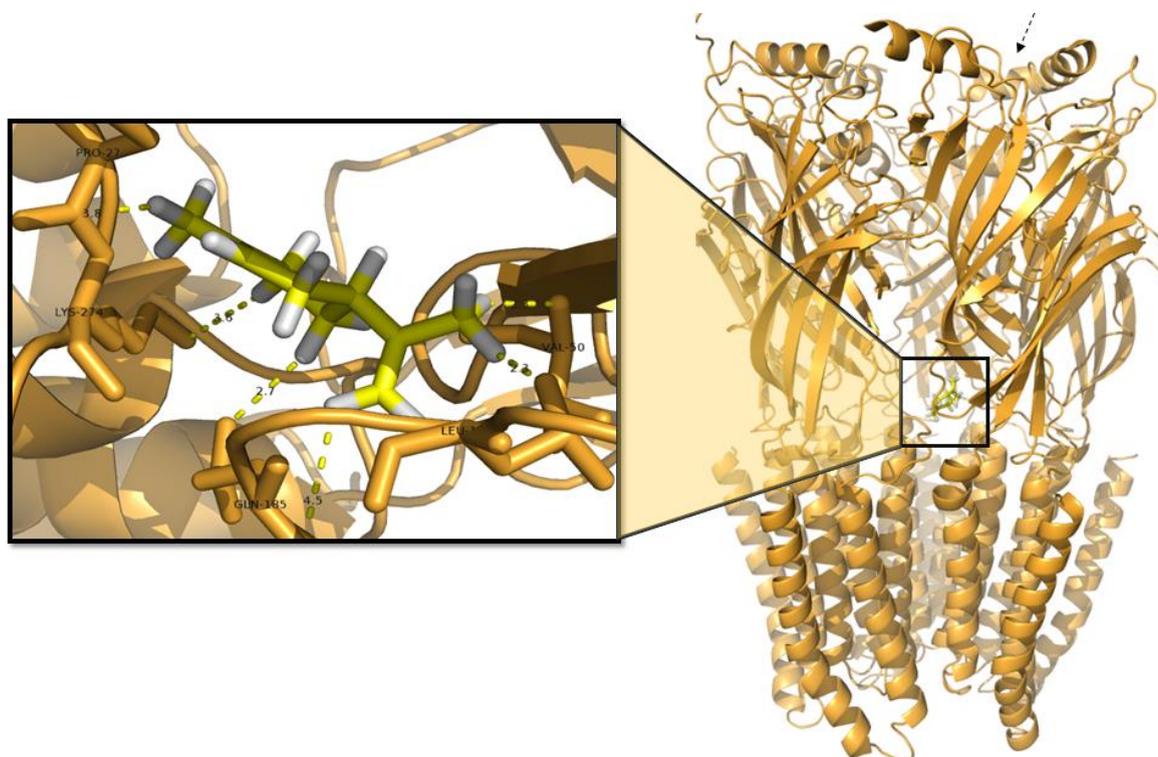
Os valores das energias de afinidade (kcal/mol) obtidos para o limoneno estão representados na Tabela 1 e representam a estabilização do receptor. Esses valores demonstram que quanto mais negativo o valor de afinidade, mais espontânea é a ligação, exigindo menos energia para ocorrer (Meng et al., 2011). Esta é uma evidência de que, antes da complexação do ligante, o receptor possuía uma energia intrínseca de vibração de seus átomos, e após a ligação do ligante, ele teve redução desta flexibilidade, representada em perda energética (kcal/mol). Neste caso, a energia observada no complexo limoneno-GABA_A (-202,17 kcal/mol) indica uma interação termodinamicamente favorável e estável entre o limoneno e o receptor, o que é uma evidência sugestiva de possível atividade biológica em condições fisiológicas.

Tabela 1. Energia de interação obtida no complexo limoneno-GABA_A através do estudo *in silico* (kcal/mol)

Cluster	Afinidade (kcal/mol)
1	-202.17
2	-191.33
3	-190.22
4	-189.87
5	-187.14
6	-185.42
7	-184.47
8	-183.55
9	-182.79
10	-181.40

A análise das interações intermoleculares (Figura 3) revelou que o limoneno forma ligações com resíduos de aminoácidos essenciais à funcionalidade do receptor, como Val50, Lys74, Leu183, Pro273, Gln185 e Phe186. Essas interações envolvem principalmente forças de van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, típicas de interações ligante-receptor em canais iônicos do tipo GABAérgico. No caso do limoneno, o cluster com maior energia de ligação foi selecionado, conforme demonstrado na Figura 3, com ligações que variam de 2.7 a 4.5 angstroms.

Figura 3. Ampliação do sítio de ligação do limoneno (sticks amarelos) com o receptor GABA_A (cartoon laranja), destacando as interações moleculares.



Fonte: autor.

Esses achados estão alinhados com estudos anteriores que identificaram propriedades ansiolíticas em compostos terpenoides, como o linalol, o mirceno e o canabidiol (CBD), que também demonstram afinidade por receptores GABAérgicos e serotoninérgicos (Zlatanova-Tenisheva et al 2025). Por exemplo, linalol mostrou efeito ansiolítico in vivo mediado por GABA_A, com suporte de estudos comportamentais em modelos murinos (Islam et al 2025). O CBD, por sua vez, demonstrou atuação complexa sobre receptores 5-HT_{1A} e GABA_A, apresentando eficácia clínica em alguns transtornos de ansiedade (Zlatanova-Tenisheva et al 2025). Isso reforça a importância de investigar sistematicamente outros terpenos com potencial terapêutico, como o limoneno, que ainda é pouco explorado sob a perspectiva da farmacologia computacional. Mesmo neste cenário, os achados computacionais permitem sugerir que o limoneno pode atuar como modulador alostérico do receptor GABA_A com menor afinidade ou seletividade por subtipos específicos, o que reduziria o risco de

efeitos colaterais típicos de moduladores mais potentes. Além disso, seu metabolismo rápido (STEPHANE, 2020) e predominantemente hepático pode contribuir para menor bioacumulação e toxicidade sistêmica, reforçando a hipótese de um composto promissor com menor incidência de efeitos adversos.

Apesar dos resultados promissores, é importante destacar algumas limitações inerentes à abordagem *in silico*. Embora o docking molecular forneça uma estimativa robusta da interação ligante-receptor, ele não considera a flexibilidade total das estruturas moleculares nem os efeitos dinâmicos do meio biológico. A ausência de simulações de dinâmica molecular, por exemplo, impede a avaliação da estabilidade do complexo ao longo do tempo e a caracterização de eventuais mudanças conformacionais do receptor GABA_A.

Com base no que foi exposto, é viável sugerir que testes comportamentais em modelos animais (como o labirinto em cruz elevada ou teste do campo aberto) poderão fornecer dados funcionais sobre o efeito ansiolítico do composto em sistemas biológicos integrais (Diniz et al., 2019). A predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET) também deve ser considerada em estudos futuros para viabilizar o desenvolvimento racional de formulações terapêuticas à base de limoneno.

Assim, o presente trabalho não apenas reforça a relevância do limoneno como um potencial ansiolítico natural, mas também contribui para a expansão do conhecimento sobre o uso de ferramentas computacionais no rastreamento de novos candidatos bioativos derivados de produtos naturais. Essa abordagem interdisciplinar pode acelerar a descoberta de terapias mais seguras, eficazes e acessíveis para o tratamento de transtornos de ansiedade.

4. Conclusão

O presente estudo *in silico* demonstrou que o limoneno, um monoterpeneo naturalmente presente em óleos essenciais cítricos, apresenta significativa afinidade de ligação com o receptor GABA_A, ocupando o mesmo sítio de interação do diazepam, fármaco clássico da classe dos benzodiazepínicos. As interações moleculares observadas, associadas a valores expressivos de energia de afinidade, sugerem que o limoneno pode atuar como modulador alostérico

positivo desse receptor, exercendo, portanto, um potencial efeito ansiolítico. Esses resultados posicionam o limoneno como um candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias fitoterápicas voltadas ao tratamento da ansiedade, especialmente no contexto de busca por alternativas seguras, eficazes e com menor perfil de efeitos adversos em comparação aos ansiolíticos sintéticos convencionais. Entretanto, é fundamental destacar que as evidências obtidas por meio de simulações computacionais devem ser complementadas por investigações experimentais. Estudos adicionais envolvendo dinâmica molecular, avaliação das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET), bem como ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelos comportamentais, são essenciais para validar a eficácia e segurança do limoneno como agente terapêutico. Dessa forma, este trabalho contribui para a expansão do conhecimento sobre compostos bioativos naturais e destaca a relevância das ferramentas de bioinformática no processo de triagem racional de candidatos a fármacos, fomentando o avanço de estratégias terapêuticas inovadoras na área da neuropsicofarmacologia.

Referências

AZEVEDO, D. V. de et al. Evaluation of antioxidant, toxicological and anxiolytic-like effect of ethanolic extracts of *Ziziphus cotinifolia* Reissek in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Phytomedicine Plus*, v. 4, n. 1, p. 100504, 2024.

BIMEREW, M. et al. Prevalence of major depressive disorder and its associated factors among adult patients with neurolathyrism in Dawunt Dist.Ethiopia; 2022: community-based cross-sectional study. *BMC Psychiatry*, v. 24, n. 1, p. 282, 2024.

CAMILO, C. J. Analysis of toxicity by different methods and anxiolytic effect of the aqueous extract of *Lippia sidoides* Cham. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 20626, 2022.

DAINA, A.; ZOETE, V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, v. 11, n. 11, p. 1117–1121, 2016.

DE ARAÚJO, J. I. F. et al. Neuropharmacological potential of *Mimosa tenuiflora* in adult zebrafish: an integrated approach to GABAergic and serotonergic neuromodulation. *Behavioural Brain Research*, v. 481, p. 115415, 2025.

DE MENEZES, J. F. S. et al. Synthesis and anxiolytic effect of europium metallic complex containing lapachol [Eu (DBM) 3. LAP] in adult zebrafish through serotonergic neurotransmission: in vivo and in silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 42, n. 3, p. 1280–1292, 2024.

DE SOUZA, A. B. et al. Antibacterial activity and anxiolytic-like effect of *Ziziphus joazeiro* Mart. leaves in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology Reports*, v. 5, p. 100108, 2023.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.7.4. Schrödinger, LLC., 2015.

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

ERDOGAN, T. DFT, molecular docking and molecular dynamics simulation studies on some newly introduced natural products for their potential use against SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Structure*, v. 1242, p. 130733, 2021.

LIMA, M. D. C. L. et al. Antinociceptive effect of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* (female) leaves on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, v. 17, n. 2, p. 112–119, 2020.

MACINDOE, L.; RITCHIE, D. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. W445–W449, 2010.

MASYITA, A. et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, v. 13, p. 100217, 2022.

MENG, X. Y. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, v. 7, n. 1, p. 146–157, 2011.

MILLER, P. S.; ARICESCU, A. R. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*, v. 512, n. 7514, p. 270–275, 2014.

SAHU, D. et al. A review on molecular docking as an interpretative tool for molecular targets in disease management. *Assay and Drug Development Technologies*, v. 22, n. 1, p. 40–50, 2024.

SILVEIRA, V. Anxiolytic effect of *Anthemis nobilis* L. (Roman chamomile) and *Citrus reticulata* Blanco (tangerine) essential oils using the light-dark test in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 298, p. 115580, 2022.

STEPHANE, F. F. Y.; JULES, B. K. J. Terpenoids as important bioactive constituents of essential oils. In: *Essential Oils—Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*. p. 1–15, 2020.

TOROPOVA, M. A. Drug metabolism as an object of computational analysis by the Monte Carlo method. *Current Drug Metabolism*, v. 18, n. 12, p. 1123–1131, 2017.

VIEIRA, N. C. G. et al. Mecanismo de ação do efeito ansiolítico de um composto presente no óleo das cascas de laranja-bergamota: estudo *in silico* da interação molecular com o Receptor 5-HT1. *Brazilian Journal of Development*, v. 10, n. 8, p. e71679, 2024.