



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito
anticonvulsivante**

TALITA MENDES DE OLIVEIRA

Teresina – Piauí

2012

TALITA MENDES DE OLIVEIRA

**Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito
anticonvulsivante**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Co-orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima

Teresina – Piauí

2012

TALITA MENDES DE OLIVEIRA**Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeito
anticonvulsivante**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima (Orientador)

Departamento de Química – CCN/UFPI

Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó (Examinador Interno)

Departamento de Química – CCN/UFPI

Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida (Examinador Externo)

Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS/UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Msc. Antônio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Guilherme Ferre Pompeu

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

“Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido.”

Albert Einstein

"Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz."

Clarice Lispector

DEDICATÓRIA

A minha família pela confiança depositada.

Aos meus amigos pelo apoio incondicional.

*Aos meus orientador e co-orientador pela disponibilidade no decorrer
do trabalho.*

*Enfim a todos que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil
de ser percorrido.*

AGRADECIMENTOS

Em todos os momentos de nossa vida devemos agradecer os obstáculos ultrapassados, as vitórias conquistadas e a vida que Deus nos concedeu.

Neste momento aproveito a oportunidade para agradecer a todos que me ajudaram e apoiaram de alguma forma para conclusão do mestrado.

À Deus que está sempre abençoando e iluminando meus passos.

Aos meus pais, ***Maria dos Remédios Silva Mendes e José Balbino de Oliveira***, que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.

Aos meus irmãos ***Maysa e Gille*** por acreditarem em minha capacidade e por me presentear com dois príncipes, meu afilhado ***Rafael e Caio***.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional, em especial a ***Tia Francisca e Tio Neto*** que sempre fizeram presentes em minha vida como verdadeiros pais e aos meus primos-irmãos ***Isaac, Rafael e Maria dos Remédios*** (esta que muitas vezes me auxiliou nos estudos, apresentações e compartilhou minhas angústias e incertezas, obrigada ***Marremédios!!!***).

Ao meu querido orientador ***Dr. Sidney Gonçalves*** pelo exemplo de professor, pela atenção, paciência e dedicação dispensada nesta minha jornada.

Ao meu co-orientador e coordenador do Programa ***Dr. Rivelilson Mendes*** por seu comprometimento, sua seriedade, competência e dedicação com todos os alunos e com o PPGCF.

As professoras ***Dra. Antônia Maria Graça Lopes Citó e Dra. Hercília Maria Lins Rolim Santos*** por suas inestimáveis contribuições na banca de qualificação.

A minha turma de Mestrado, ***Mayara, Lyghia, Luís Alberto, Daniella, Alisson, Patrícia, Jéssica, Dayanne, Débora, Ulisses e Paula***, pelos momentos de sufoco, gargalhadas e estímulos dados nos momentos certos e em especial ao amigo ***Jauro Júnior*** que desde os primeiros períodos de Farmácia sempre esteve ao meu lado, que me presenteia com sua amizade incondicional e novamente *nós vencemos outra etapa juntos!*

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais por estarem sempre disponíveis a ajudar, em especial minha iczinha ***Lara, Danilo e Edmilson*** pela amizade.

Aos alunos do Laboratório em Pesquisa Neuroquímica Experimental (LAPNEX), *Paula Benvindo, Oskar e Rusbene*, pelo esforço e ajuda prestada para realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho (*GEMAF*), que nesta reta final sempre estiveram disponíveis nos momentos que precisei para conciliar trabalho e mestrado, me cobrir nas ausências para vir ao Piauí e pela amizade.

A todos meus queridos amigos e amigas que estiveram me encorajando e todos que contribuíram de alguma forma para realização desta pesquisa.

Ao CNPq, FAPEPI e CAPES pelo incentivo financeiro dispensado durante a pesquisa.

Muito Grata!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Plantas Medicinais.....	20
3.2 Óleos Essenciais.....	21
3.3 <i>p</i> -Cimeno.....	23
3.4 Epilepsia.....	25
3.2 Modelo animal de epilepsia.....	27
Referências.....	29
4. CAPÍTULO I: Efeito anticonvulsivante do <i>p</i>-cimeno no modelo de pilocarpina em camundongos	39
Resumo.....	40
Abstract.....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	46
Conclusão.....	60
Referências.....	60
5. CAPÍTULO II: Um possível mecanismo de ação para o efeito anticonvulsivante do <i>p</i>-cimeno	70
Resumo.....	71
Abstract.....	72
Introdução.....	73
Material e Métodos.....	74

Resultados.....	76
Discussão.....	79
Conclusão.....	80
Referências.....	81
6. CAPÍTULO III: Avaliação antioxidante de um monoterpenos cíclico de origem natural.....	84
Resumo	85
Abstract.....	86
Introdução.....	87
Material e Métodos.....	88
Resultados.....	90
Discussão	94
Conclusão	97
Referências	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
AA	Ácido ascórbico
AchE	Acetilcolinesterase
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATR	Atropina
BZP	Benzodiazepínicos
CAT	Catalase
CIM	<i>p</i> -Cimeno
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CE	Crise Epiléptica
DAE	Drogas antiepilépticas
DOXP	Desoxixilulose fosfato
DZP	Diazepam
EME	Estado de mal epiléptico
E.P.M.	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
FBT	Fenobarbital
FI	Fentolitos
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
i.p.	Via intraperitoneal
IPP	Difosfato de isopentenila
LDEP	Latência para o desenvolvimento de estado de mal epiléptico

LIPC	Latência da instalação da primeira crise epiléptica
MDA	Malonildialdeído
ME	Movimentos estereotipados
MVA	Ácido Mevalônico
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
°C	Graus Centígrados
Pg	Picograma
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico
χ^2	Teste do Qui Quadrado

LISTA DE TABELAS**Capítulo I**

Tabela 1	Efeito do pré-tratamento com <i>p</i> -cimeno sobre as alterações comportamentais em convulsões induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.....	51
Tabela 2	Alteração histopatológica no hipocampo de camundongos pré-tratados com <i>p</i> -cimeno após convulsão induzida por pilocarpina.....	56
Tabela 3	Alteração histopatológica no corpo estriado de camundongos pré-tratados com <i>p</i> -cimeno após convulsão induzida por pilocarpina.....	59

Capítulo II

Tabela 1	Efeito de pré-tratamento com <i>p</i> -cimeno nas alterações comportamentais de camundongos adultos durante crises epiléticas induzidas por pilocarpina	77
Tabela 2	Efeito de pré-tratamento com <i>p</i> -cimeno nas alterações comportamentais de camundongos adultos durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.....	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução		
Ilustração 1	Estrutura química da unidade de isopreno.....	22
Ilustração 2	Estrutura química do <i>p</i> -cimeno	23
Ilustração 3	Estruturas química do γ -terpineno, <i>p</i> -cimeno, timol, carvacrol, álcool cuminil e <i>p</i> -cimen-8-ol.....	24
Capítulo I		
Ilustração 1	Estrutura química do <i>p</i> -cimeno (1-metil-4-isopropil benzeno).....	43
Ilustração 2	Avaliação do efeito do tratamento com <i>p</i> -cimeno no hipocampo de camundongos adultos.....	55
Ilustração 3	Alteração histopatológica em corpo estriado de camundongos tratados com pilocarpina, <i>p</i> -cimeno ou suas combinações	57
Capítulo II		
Ilustração 1	Camundongo <i>Swiss</i> macho	74
Capítulo III		
Ilustração 1	Estrutura química do <i>p</i> -cimeno (1-metil-4-isopropil benzeno).....	88
Ilustração 2	Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos tratados com <i>p</i> -cimeno de forma aguda	91
Ilustração 3	Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos tratados com <i>p</i> -cimeno de forma aguda.....	92
Ilustração 4	Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos tratados com <i>p</i> -cimeno de forma aguda.....	93
Ilustração 5	Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos tratados com <i>p</i> -cimeno de forma aguda.....	94
Ilustração 6	Possível mecanismo de reação antioxidante do <i>p</i> -cimeno na formação de radical lipídico.	95
Ilustração 7	Possível mecanismo de reação antioxidante do <i>p</i> -cimeno na formação de radical nitrito (NO ₂ ⁻).....	96

Ensaio pré-clínico de um produto natural para avaliação de seu possível efeitos anticonvulsivante. TALITA MENDES DE OLIVEIRA. Orientador: Sidney Gonçalo de Lima. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

O *p*-cimeno (1-metil-4-isopropil benzeno) é um monoterpene aromático biosintético de fórmula molecular $C_{10}H_{14}$, precursor do carvacrol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo um dos constituintes majoritário em várias espécies vegetais como em *Thymus vulgaris*, *Origanum saccatum* e *Origanum solymicum*. No **primeiro capítulo** foram investigados os efeitos anticonvulsivantes e alterações histopatológicas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos após tratamento com *p*-cimeno (CIM) nas doses de 50, 100 e 150 mg kg⁻¹. O efeito anticonvulsivante de CIM foi investigado no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. Esse monoterpene foi capaz de diminuir a frequências das crises epiléticas induzidas pela pilocarpina, estado de mal epilético e lesões cerebrais em camundongos. Além disso, o *p*-cimeno diminuiu a gravidade das lesões do hipocampo e corpo estriado e a taxa de mortalidade causada pela pilocarpina. Os resultados indicam a capacidade do *p*-cimeno em modular os efeitos anticonvulsivantes. No **segundo capítulo** foi investigado o possível mecanismo de ação do *p*-cimeno sobre as crises epilepticas induzidas pela pilocarpina. Avaliando o possível bloqueio dos efeitos do *p*-cimeno por meio do pré-tratamento com atropina (25 mgkg⁻¹), antagonista dos receptores muscarínicos, e com o Flumazenil (25 mgkg⁻¹), antagonista dos receptores benzodiazepínicos. Sendo que nenhum efeito do *p*-cimeno foi bloqueado pelo pré-tratamento com atropina, porém pode ser observado que os efeitos foram revertidos quando administrado o flumazenil. É sugerido que o *p*-cimeno apresente atividade anticonvulsivante por modulação do sistema de neurotransmissores GABAérgicos que precisam ser melhores investigados. No **terceiro capítulo**, foi realizada a avaliação do potencial antioxidante do *p*-cimeno em hipocampo de camundongos adultos por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de nitrito e atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). O tratamento com *p*-cimeno reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante *in vivo* uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Além disso, o *p*-cimeno aumentou a atividade das enzimas CAT e SOD, no hipocampo de camundongos, sugerindo que seu papel antioxidante pode ser devido à modulação positiva da atividade dessas enzimas. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que o *p*-cimeno, apresenta potencial antioxidante *in vivo* e pode atuar como um agente neuroprotetor cerebral.

Palavras-chave: Anticonvulsivante, Óleo Essencial, Antioxidante, Monoterpene, *p*-Cimeno.

Preclinical trial of a natural product to evaluation of potential anticonvulsant effect. TALITA MENDES DE OLIVEIRA. Advisor: Sidney Golçalo de Lima. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2012.

ABSTRACT

The *p*-cymene (1-isopropyl-4-methylbenzene) is a biosynthetic aromatic monoterpene with molecular formula $C_{10}H_{14}$, carvacrol precursor and largely present among the essential oils, and one of major constituents in many plant species as in *Thymus vulgaris*, *Origanum saccatum* and *Origanum solymicum*. **In first chapter**, we investigated the convulsivant effects and histopathological alterations in hippocampus and corpus striatum of adult mice after *p*-cymene treatment (MIC) at doses of 50, 100 and 150 $mgkg^{-1}$. Anticonvulsivant effect of MIC was investigate in epilepsy model induced by pilocarpine. This monoterpene was able to reduce the epileptics seizures frequency induced by pilocarpine, status epilepticus and brain damage in mice. Furthermore, *p*-cymene reduced lesions severity of the hippocampus and corpus striatum and mortality rate caused by pilocarpine. Results indicate the ability of *p*-cymene to modulate the anticonvulsivant effects and its neuroprotective activity. **In second chapter**, we investigated the possible action mechanism of *p*-cymene on epileptics seizures induced by pilocarpine, evaluating the possible blockage of *p*-cymene effects by the pre-treatment with atropine (25 $mgkg^{-1}$), muscarinic antagonist, and with flumazenil (25 $mgkg^{-1}$), benzodiazepines antagonist. Since no effect of *p*-cymene was blocked by pretreatment with atropine, but it can be seen that the effects were reversed when administered flumazenil. We suggest *p*-cymene present anticonvulsivant activity by modulation of GABAergic neurotransmitter system that need to be more investigated. **In third chapter**, we performed the evaluation of *p*-cymene antioxidant potential in hippocampus of adult mice by the levels determination of acidic substances reactivities with thiobarbituric acid (TBARS), nitrite content and activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes. Treatment with *p*-cymene significantly reduced the level of lipid peroxidation and nitrite content, suggesting an antioxidant role *in vivo* since it was able to reduce the formation of reactive species derived from oxygen and nitrogen. Furthermore, *p*-cymene increased the activity of CAT and SOD on mice hippocampus, suggesting that its antioxidant role may be due positive modulation of these enzyme activities. Therefore, results of this study show that *p*-cymene has *in vivo* antioxidant potential and may act as a brain neuroprotective agent.

Keywords: Anticonvulsant, Essential Oil, Antioxidant, Monoterpene, *p*-Cymene.

1. INTRODUÇÃO

O uso medicinal das plantas e suas preparações têm sido repassados por séculos e ainda é a forma mais comum do tradicional medicamento em todo o mundo (KELLER et al., 2003;. OMS., 2005). As plantas medicinais são parte integrante dos sistemas tradicionais de medicamentos. Os primeiros registros sugerem que os medicamentos a base de ervas têm sido utilizados e documentada em sistemas medicinais na Índia, Roma, China, Egito e Grécia há cerca de 5000 anos. O uso tradicional de ervas medicinais tem sido praticado desde os tempos antigos em Países da América e da Arábia e Japão (DE et al., 2010; KAMBOJ, 2000; MUKHERJEE, 2008).

No século 21, as ervas medicinais vem ganhando importância na área da saúde com um maior número de pessoas buscando soluções relativamente seguras e abordagens para a saúde (DUBEY; KUMAR; TRIPATHI, 2004). O crescimento do interesse por ervas medicinal proporciona às pessoas um sistema de saúde alternativo que é importante para melhorar custo e tratamentos eficazes para a comunidade mundial. O aumento da procura mundial por medicamentos fitoterápicos foi seguido por um crescimento tardio em estado de alerta mundial sobre a oferta cada vez menor de medicamentos no mundo (SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; DE, B, 2011).

O Brasil tem a maior biodiversidade do mundo, representando mais de 20% do número total de espécies conhecidas. Apresenta a flora mais diversificada, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total global. Tal biodiversidade é seguida por uma ampla aceitação da utilização das plantas medicinais. A maioria da população brasileira, cerca de 80% consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis comercialmente e dependem quase exclusivamente de medicamentos de origem natural. Numerosos estudos sobre a farmacologia de plantas medicinais têm sido realizados, uma vez que constituem uma fonte potencial para a produção de novos medicamentos (SILVA; FERNANDES-JÚNIOR, 2010).

O Ministério da Saúde contempla através da Portaria nº 971/2006 e o Decreto nº 5813/06 uma política nacional de práticas integrativas com ampliação ao acesso a serviços e produtos, incluindo os relacionados com as plantas medicinais e fitoterapia, institucionalizando estas práticas no Sistema Único de Saúde (SUS). O que demonstra a atenção do governo brasileiro em relação às plantas medicinais e suas utilizações adequadas na medicina.

Propondo-se a ampliar este acesso às opções terapêuticas com produtos seguros, eficazes e de qualidade, de forma integrativa e complementar.

Extensas pesquisas tem demonstrado que os óleos essenciais e seus componentes principais possuem um amplo espectro de atividade biológica que pode ser de grande importância em vários campos da química dos alimentos e para farmacologia. Análise de óleos essenciais mostra que, dos compostos diferentes que os formam, terpenóides são os mais abundantes, sendo os encontrados em maior quantidade os sesquiterpenos e especialmente os monoterpenos (CRISTANI, 2007). Entre os monoterpenos mais presente nas plantas, fazem parte da subclasse monocíclica o timol, carvacrol e *p*-cimeno (POLOUSE; CROTEAU, 1987).

O *p*-cimeno (1-metil-4-isopropilbenzeno) é um monoterpeno aromático biosintético de fórmula molecular $C_{10}H_{14}$, precursor do carvacrol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo o constituinte majoritário em várias espécies vegetais como 83.75% em *Origanum saccatum*, 53.07% em *Origanum solymicum* e 44.13% em *Thymus vulgaris* (POULOSE, 1978; ADAMS, 2007). Além disso, o *p*-cimeno vem sendo alvo de estudos em outros trabalhos como atividade antinociceptiva (SANTANA et al., 2011), antibacteriana (BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004), antifúngica, herbicida (KODALI et al., 2008) e antileishmania (MEDEIROS et al., 2011). Em busca de novas fontes de moléculas naturais, os óleos essenciais são promissores e desafiadores (ARAÚJO; FREITAS; CRUZ, 2011).

Desta forma, no presente estudo foi avaliado o potencial anticonvulsivante do *p*-cimeno em modelo animal de epilepsia e a caracterização do mecanismo de ação deste constituinte ativo além de avaliar o potencial antioxidante do *p*-cimeno em hipocampo de camundongos adultos para obtenção de um possível agente terapêutico derivado das plantas medicinais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar as propriedades farmacológicas do *p*-cimeno por meio da determinação da atividade anticonvulsivante e antioxidante para subsidiar o desenvolvimento de um medicamento;

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade anticonvulsivante e realizar análises histopatológicas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos tratados por via intraperitoneal com *p*-cimeno;
- Investigar o possível mecanismo de ação do *p*-cimeno sobre convulsões induzidas por pilocarpina;
- Examinar a atividade antioxidante *in vivo* do *p*-cimeno.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas para tratar doenças é tão antigo quanto à espécie humana. Observações interessantes sobre a utilização e eficácia de plantas medicinais contribuíram significativamente para a divulgação das suas propriedades terapêuticas, de modo que elas são frequentemente prescritas, mesmo se seus constituintes químicos não são completamente conhecidos. Os compostos ativos produzidos durante o metabolismo secundário vegetal são geralmente os responsáveis pelas propriedades biológicas de algumas espécies de plantas utilizados para vários fins. Em todo o mundo, especialmente nos países sul-americanos, o uso de plantas medicinais tem apoiado significativamente os cuidados primários de saúde (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

A fitoterapia vem sendo um ramo da medicina integrativa que mais cresce ao longo dos anos. Sendo que o fator mais relevante para este crescimento se resume na evolução dos estudos científicos, em destaque a descoberta da eficácia de plantas medicinais, principalmente as utilizadas pela população com finalidade terapêutica através de estudos químicos, farmacológicos e toxicológico. Há uma confusão na população entre fitoterapia e o uso de plantas medicinais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária considera fitoterápico aquele obtido exclusivamente de matéria-primas de origem vegetal, com qualidade constante e reprodutível e que tantos os riscos quanto à eficácia seja caracterizada por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos (NICOLETTI et al., 2007).

Plantas com atividade psicoativa exercem importantes efeitos sobre a consciência, as emoções e a cognição e, devido a esses efeitos, têm sido utilizadas há bastante tempo com finalidades terapêuticas, espirituais e recreacionais. A investigação farmacológica de produtos naturais que apresentam atividade sobre o sistema nervoso central (SNC) tem auxiliado a compreensão das bases neuroquímicas de muitas doenças. Extratos vegetais e produtos isolados exercem suas ações através de interações com moléculas endógenas transdutoras de sinal (neurotransmissores) (O'CONOOR; ROTH, 2005; BARBOSA FILHO et al., 2006; CARDOSO et al., 2008; QUINTANS JÚNIOR et al., 2008; SOUSA et al., 2008; SUBHAN, 2008).

A natureza é uma fonte rica em uma diversidade biológica e química, com estruturas únicas e complexas de produtos naturais não podendo ser obtidos facilmente por síntese

química. Muitas plantas foram conhecidas pela sua atividade anticonvulsivante, entre elas as que já foram encontradas atividades anticonvulsivantes em modelo animal e/ou na medicina popular estão a *Abelmoschus angulosus*, *Allium sativum*, *Artemisia* spp, *Cannabis sativa*, *Cinchona offi cinalis*, *Egletes viscosa*, *Ipacina trichantha*, *Magnolia grandiflora*, *Plumbago zeylanica* e outras. Em estudos com plantas do nordeste brasileiro tiveram bons resultados as espécies *Bauhinia outimouta*, *Rauvolfia ligustrina* Willd. ex Roem. & Schult e *Xymenia americana* L. (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002). Entre essas plantas testadas algumas delas (de famílias diferentes) foram encontradas atividade anticonvulsivante embora na maioria dos casos os componentes ativo ainda estão para ser encontrados, para aqueles onde os componentes já são conhecidos, pertencem a diferentes classes químicas. Sendo que em outros estudos observou-se a atividade anticonvulsivante em cumarinas, triterpenoides (QUINTANS-JUNIOR et al., 2008), diterpenos (COSTA et al., 2012) e monoterpenos (LICK, 2009).

Dessa forma, o monoterpeno aromático, *p*-cimeno, apesar de poucos estudos em relação a sua atividade farmacológica, se apresenta como uma possibilidade de base para um medicamento. Assim, o estudo de seu potencial anticonvulsivante, do mecanismo de ação para o esclarecimento de sua atividade no SNC e seu grau de atividade antioxidante é necessário para uma futura utilização clínica.

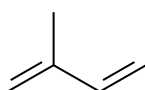
3.2 Óleo Essencial

Os óleos essenciais são voláteis, naturais, compostos complexos caracterizados por um odor forte e são formados a partir das plantas aromáticas por metabólitos secundários. Eles são geralmente obtidos por arraste a vapor ou hidro-destilação primeiramente desenvolvido na Idade Média pelos árabes (BAKKALI et al., 2008). Os óleos essenciais são constituídos de elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000).

Eles podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações bastante diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações elevadas (20-70%) em comparação com outros componentes presentes em quantidades vestigiais. Por exemplo, carvacrol (30%) e timol (27%) são os componentes principais do óleo essencial do *Origanum compactum*, linalol (68%) do óleo essencial de *Coriandrum sativum*, α - e β -

thujone (57%) e cânfora (24%) do óleo essencial de *Artemisia herba-alba*, 1,8-cineol (50%) do óleo essencial de *Cinnamomum camphora*, α -felandreno (36%) e limoneno (31%) do óleo essencial das folhas e carvona (58%) e limoneno (37%) das sementes de *Anethum graveolens*, mentol (59%) e mentona (19%) de *Mentha piperita* (*Mentha X piperita*). Geralmente, estes componentes principais determinarão as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes incluem dois grupos de biosintéticos de origem distinta (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; BETTS, 2001; BOWLES, 2003; PICHRSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). O grupo principal é composto de terpenos e terpenóides e outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

Dentre os metabólitos secundários vegetais, os terpenóides, substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (**Ilustração 1**), constituem o maior grupo. Na medicina popular, assim como na terapêutica, plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos voláteis possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva. Compostos como linalool, limoneno e citronelol possuem ação anticonvulsivante, enquanto mentol e mirceno, atividade analgésica. Muitos derivados monoterpênicos têm demonstrado atividades sobre o SNC, incluindo sedativa, antinociceptiva e antidepressiva (SOUSA et al., 2007a; SOUSA et al., 2007b; PERAZZO et al., 2007, 2008; LEITE et al., 2008).



Unidade de isopreno (C₅)

Ilustração 1 - Estrutura química da unidade de isopreno.

Fonte: Arquivo Pessoal

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importante, especialmente para a indústria farmacêutica, alimentícia, agrônômica e sanitária e uso em cosméticos e perfumes. Muitos têm sido utilizados nos países em desenvolvimento como tratamentos alternativos para vários problemas de saúde (CIMANGA et al., 2002).

Além disso, a história da descoberta de drogas mostrou que as plantas são fonte altamente rica em busca de novos compostos ativos e tornando um desafio para a indústria farmacêutica moderna. Muitas drogas sintéticas devem suas origens às plantas medicinais (HOWES et al, 2003; ORHAN et al, 2004).

O uso de plantas contendo terpenos na medicina popular é bem conhecido; estudos científicos sobre a atividade dos terpenóides sobre o SNC são mais recentes. Estes estudos incluem, além da avaliação em modelos de doenças neuropsiquiátricas, também a busca dos seus alvos moleculares de ação. As atividades avaliadas *in vivo* estão relacionadas aos propósitos de uso popular como sedativo e ansiolítico. Os alvos moleculares estudados são, principalmente, os sistemas neurotransmissores GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e opióide. De forma geral, o conjunto dos dados demonstra o potencial terapêutico e em alguns casos tóxico, dessa classe de metabólitos secundários, sugerindo a necessidade de estudos de relação estrutura-atividade, visando à modulação de suas propriedades biológicas e possibilitando a obtenção de protótipos farmacológicos mais eficazes e seguros (PASSOS et al., 2009).

3.3 *p*-Cimeno

O *p*-cimeno contém um grupo isopropil ligado a um anel benzênico com grupo metil em para (1-metil-4-isopropil), é um hidrocarboneto natural, monoterpreno, monocíclico, com fórmula molecular $C_{10}H_{14}$ (**Ilustração 2**). Este monoterpreno apresenta as seguintes características físico-químicas: Peso molecular $134,22 \text{ g mol}^{-1}$, encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente, com densidade de $0,86 \text{ g cm}^{-3}$ e ponto de ebulição $176 \text{ }^\circ\text{C}$. Com pouca solubilidade aquosa (SANGSTER, 1989).

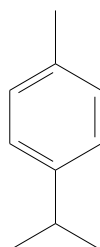


Ilustração 2 –Estrutura química *p*-cimeno (*1 metil- 4- isopropil-benzeno*)

Fonte: Arquivo pessoal.

Seu uso foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e Comissão Européia para adição direta nos alimentos para uso humano como uma substância flavorizante sendo considerado um alimento seguro (GRAS) ou tal como aditivo aprovado (BURT, 2004). Além de sua utilização como um intermediário na indústria de química fina para síntese de perfumes, aromas, herbicidas, produtos farmacêuticos, produção de *p*-cresol entre outros. (MARTÍN-LUENGO, 2008).

Estudos demonstram que a obtenção do *p*-cimeno venha a partir da aromatização do γ -terpineno e a partir daí o *p*-cimeno poderá dar origem a vários outros monoterpenos por hidroxilação, dando origem ao timol ou seguido por hidroxilação no C-2 do anel, no caso de carvacrol ou hidroxilação em posições na cadeia lateral no caso de *p*-cimen-8-ol e álcool cuminil. De acordo com esse regime, γ -terpineno assume um papel chave no processo de aromatização, enquanto *p*-cimeno é o precursor central dos componentes oxigenados (POULOSE, 1978).

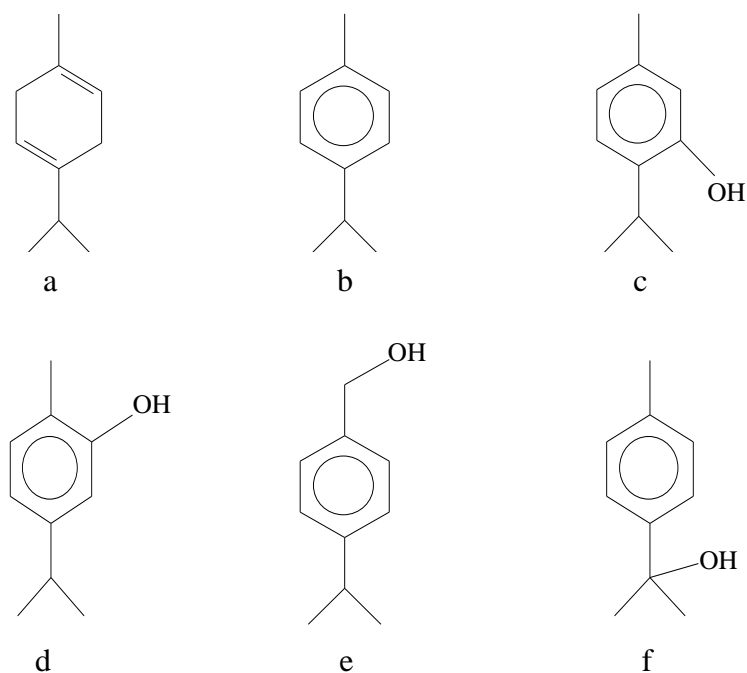


Ilustração 3 – Estruturas química do γ -terpineno (a), *p*-cimeno (b), timol (c), carvacrol (d), álcool cuminil (e) e *p*-cimen-8-ol (f).

Fonte: Arquivo pessoal.

Este monoterpene também pode ser produzido a partir da alquilação Friedel-Crafts de derivados de petróleo: benzeno com metálicos e halogenos isopropílico usando $AlCl_3$ como um ácido catalisador ou tolueno com álcool isopropílico (BASF, 1967). A partir da utilização de irradiação de microondas para a produção de *p*-cimeno a partir limoneno (MARTÍN-LUENGO, 2008).

Alguns estudos vêm sendo feito em relação ao *p*-cimeno demonstrando propriedades lipolítica. De fato, tem sido relatado que os efeitos antimicrobiano do *p*-cimeno e derivados carvacrol, timol e γ -terpineno pode resultar, pelo menos parcialmente, a partir de uma perturbação bruta da fração lipídica da membrana plasmática, deliberando por romper a membrana citoplasmática (CRISTANI, 2007). O *p*-cimeno tem menor efeito antimicrobiano do que carvacrol, quando utilizado sozinho, sendo que o *p*-cimeno carece de um grupo hidroxila, para desempenhar um papel importante na atividade antimicrobiana (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002). Sinergismo entre carvacrol e *p*-cimeno contra *B. cereus in vitro* e *in vivo* tem sido relatada (ULTEE et al., 2000). Em estudos *in vitro* demonstraram que o monoterpene pode ser usado como um antimicrobiano contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e as Gram-negativas (*Escherichia coli*) (CRISTANI et al., 2007; SHAPIRA; MIMRAN, 2007). Além disso, diferentes estudos têm mostrado que o *p*-cimeno e os seus derivados monoterpenos são eficazes antioxidantes e agentes anticarcinogênicas (BURT, 2004).

A espécie conhecida como vindicar (*Alpinia speciosa*) é usada como espasmolítica e hipotensora, tendo também ação cardiovascular e depressora no sistema nervoso central (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001). Os monoterpenos limoneno, terpinen-4-ol, α -terpineno e *p*-cimeno foram os componentes principais encontrados neste óleo essencial (LUZ et al, 1985; ZOGHBI; ANDRADE; MAIA, 1999). A atividade antinociceptiva do *p*-cimeno também foi confirmada, podendo modular tanto a dor neurogênica como inflamatória. Além disso, parece, pelo menos em parte, que a ação antinociceptiva de *p*-cimeno envolve o sistema opióide (SANTANA et al., 2011).

Estes estudos reforçam o interesse desta dissertação em busca de um produto natural com atividade anticonvulsivante em modelo animal para possível utilização em tratamento clínico da epilepsia.

3.4 Epilepsia

A epilepsia é uma das doenças neurológica mais prevalente, desconhecendo idade, raça, padrão social ou limites geográficos, afetando pelo menos 50 milhões de pessoas em todo o mundo (SCHEUER; PEDLEY, 1990; BOER, 2008). Por definição, epilepsia é caracterizada por crises espontâneas e recorrentes causados por alterações paroxísticas focais ou generalizadas nas funções neurológicas desencadeadas por atividade elétrica anormal no cortex (DICTER, 1994). Como envolve neurônios hiperexcitados, um pressuposto básico liga a patogênese da epilepsia e a geração de atividade neuronal sincronizado com um desequilíbrio entre neurotransmissão inibitória [g- ácido aminobutírico (GABA) - mediador e excitatório (glutamato - mediador), suposição mais aceita (DALBY, 2001).

A crise epilética pode ser definida como uma manifestação excessiva e/ou hipsincrônica resultante da atividade epilética, usualmente auto-limitada ou não de neurônios cerebrais. As crises não auto-limitado são denominadas crises contínuas e configuram o quadro de EP. Este pode ser definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual da maioria das crises recorrentes sem que a função do SNC retorne ao período interictal (ENGEL, 2001). EP pode se desenvolver com graus diferentes de envolvimento muscular. O evento motor consiste de um aumento ou diminuição da contração muscular. O aumento da contração pode ser do tipo tônico (contração mantida durante segundos ou minutos), clônico (contrações, seguidas de relaxamentos gerando abalos musculares sucessivos) ou mioclônico (contrações muito breves, semelhantes a choques). A diminuição da contração caracteriza as mioclonias negativas e as crises atônicas (ENGEL, 2001).

Segundo a Classificação Internacional das Crises Epiléticas de 1981, (Comissão de Classificação e Terminologia do ILAE, 1981); há três grupos de crises: as parciais ou focais, as generalizadas e as crises não classificáveis. Parcial ou focal são convulsões que possuem evidência clínica ou eletroencefalografia (EEG) de início local e pode se espalhar para outras partes do cérebro durante uma convulsão, enquanto convulsões generalizadas começam simultaneamente em ambos os hemisférios cerebrais (DUNCAN, 2006). Por razões prática, quando a crise epilética persistir por mais de 5 minutos deve ser considerada como estado de mal epilético e deve ser tratado como tal (JAMA, 1993; ALLDREADGE, 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, alguns estudos sugerem que entre 70% e 80% das pessoas com epilepsia vão conseguir diminuição das crises, enquanto que os demais pacientes continuam a ter convulsões, mesmo sobre tratamento com a terapia disponível no momento (KWAN; SANDER, 2004; HALATCHEV, 2000). Além disso, pacientes com epilepsia, especialmente aqueles com pior controle com medicação, têm maior co-morbidade,

especialmente psiquiátrica (quadros de depressão, ansiedade, psicose), juntamente com maiores dificuldades de trabalho e social (KANNER; BALABANOV, 2002; KANNER, 2008).

O século 20 assistiu o considerável progresso no desenvolvimento de medicamentos anticonvulsivantes (LÖSCHER; SCHMIDT, 1994). Os principais medicamentos em uso clínico, ou seja, fenitoína, valproato, carbamazepina, benzodiazepínicos, etossuximida, fenobarbital e primidona, foram desenvolvidos e introduzidos, entre 1910 e 1970 e são referidos como “velhas drogas” ou drogas de “primeira geração”. Após um período de mais de 20 anos, várias novas drogas anticonvulsivantes, tais como, vigabatrina, gabapentina, lamotrigina, felbamato, oxcarbazepina, tiagabina e topiramato foram introduzidas na prática clínica, referidas como “novas drogas” ou drogas de “segunda geração”. Os anticonvulsivantes mais recentes que estão em desenvolvimento pré-clínico ou clínico será encaminhado como drogas de “terceira geração” (LÖSCHER, 1998).

Embora o progresso continue a ser feito em relação ao modelo experimental, pesquisas na clínica médica da epilepsia são importantes (incluindo o desenvolvimento de um número de novas drogas antiepilépticas). A epilepsia permanece um problema clínico importante que requer tratamento precoce e eficaz (SCORZA et al., 2011)

Portanto, medicamentos a base de plantas pode potencialmente desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas para pacientes farmacoresistentes (NSOUR et al., 2000), servindo de base para este estudo.

3.5 Modelo Animal de Epilepsia

A descoberta de novas drogas antiepilépticas (DAE) depende do trabalho pré-clínico dos modelos animais para estabelecer eficácia e segurança antes da introdução das DAE em voluntários humanos (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Claramente, quanto mais preditivo o modelo animal para qualquer tipo de crise dada ou síndrome, maior a probabilidade de que uma investigação DAE irá demonstrar eficácia em ensaios clínicos humanos (SMITH et al., 2007).

A alta prevalência da doença assim como ausência de um tratamento anti-epileptógeno torna necessária à realização de novos estudos e criação de modelos animais experimentais que nos permitam compreender os mecanismos fisiopatológicos básicos e identificar tratamentos eficazes. Hoje se considera válido o modelo animal que é capaz de reproduzir um

número de características clínicas, que podem então ser transferidas para seres humanos ou outros animais (GARCIA; MORALES; GUIU, 2010).

Na epilepsia temos modelos de epilepsia aguda e crônica. A epilepsia aguda é induzida pela administração de drogas convulsivantes ou estimulação elétrica. O modelo da epilepsia crônica requer maior cuidado, trabalho e custo econômico, mas há maior probabilidade de melhor reprodução da fisiopatologia da epilepsia em humanos. Ambos os modelos reproduzem crises parciais e generalizadas, no entanto, uma vez que a epilepsia é caracterizada pelo aparecimento de crises recorrentes ao longo do tempo, apenas os modelos que reproduzem esta condição são considerados modelos de epilepsia (GARCIA; MORALES; GUIU, 2010).

O modelo experimental do estado de mal epilético tenta explicar os mecanismos fisiopatológicos que o produz e as causas do déficit neurológico secundário, também tenta encontrar tratamentos eficazes que nos permitem reduzir a morbidade e mortalidade. Para este modelo, os animais são submetidos aos agentes químicos (administração sistêmica de ácido caínico ou pilocarpina) ou estimulação elétrica (na amígdala ou hipocampo) até um estado epilético (GARCIA; MORALES; GUIU, 2010). Isso resulta em um estado de mal epilético agudo com crises tônico-clônicas que é o evento inicial. Depois desse episódio, há uma fase latente ou sem crises, que podem durar semanas, depois que começam espontaneamente e crises recorrentes (fase crônica). Estudos anatômicos do hipocampo de ratos submetidos a este método mostram alterações semelhantes aos da esclerose medial temporal humano com a morte neuronal e astrogliose no hipocampo e amígdala (BEN-ARI, 2001).

As alterações produzidas por drogas psicoativas utilizadas no tratamento da epilepsia e das psicopatologias associadas, não estão ausentes de efeitos adversos, havendo a necessidade da realização de estudos clínicos e experimentais, a fim de minimizar ou abolir esses efeitos prejudiciais aos pacientes epiléticos. Sendo, assim, o modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, fornece ainda várias possibilidades de futuras pesquisas em animais na tentativa de estabelecer os mecanismos fisiopatológicos das convulsões límbicas em humanos, no intuito também de descobrir drogas antiepiléticas mais eficazes e seguras para uso clínico em humanos (FREITAS, 2011).

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P.; Identifation of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois: **Allured Publishing**, p.141, 2007.

ALLDREDGE, B.K., GELB, A. M.; ISAACS, S. M.; CORRY, M. D.; ALENN, F.; ULRICH, S.; GOTTWALD, M.D.; ONEIL, N.; NEUHAUS, J.M.; SEGAL, M.R.; LOWENSTEIN, D.H. A comparison of lorazepam, diazepam, and placebo for the treatment of out-of-hospital status epilepticus. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 631–637, 2001.

ALWIS, R.; FUJITA, K.; ASHITANI, T.; KURODA, K. Volatile and non-volatile monoterpenos produced by elicitor-stimulated *Cupressus lusitanica* cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 720-728, 2009.

ARAÚJO, D.A.M.; FREITAS, C.; CRUZ, J.S. Essential oils components as new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life Sciences**, v. 89, p. 540-544, 2011.

BACH, T. Preclinical and clinical overview of Terpenes in the treatment of urolithiasis. **European Urology Supplements**, v. 9, p. 814-818, 2012.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linaool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v.21, p. 33-42, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA – FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.F.M; BATISTA,L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.

BASF, **US PATENTE**. n.99-87-6. 103, 1967.

BEN-ARI, Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. **Epilepsia**, v. 42, p. 5-7, 2001.

BETTS, T.J., Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 33–46, 2001.

BOER, H.M.; MULA, M.; SANDER, J.W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 12, p. 540–546, 2008.

BOWLES, E.J. **Chemistry of Aromatherapeutic Oils**. 3rd ed. Australian: ALLEN & UNWIN, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no. 971, de 03 de Maio de 2006. Aprova a política nacional de praticas integrativas e complementares no SUS. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto no. 5.813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

BUCKMASTER, P.S. DIDEK, F.E. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainite-treated rats. **Journal Computational Neuroscience**, v.385, p. 385-404, 1997.

BURT, S.A.; Essential oils: The antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

CARDOSO-LOPES, E.M.; CARREIRA, R.C.; AGRIPINO, D.G.; TORRES,L.M.B.; CORDEIRO, I.; BOLZANI, V.S.; DIETRICH, S.M.C.; YOUNG, M.C.M. Screening for

antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 655-660, 2008.

CIMANGA, K.; KAMBU, K; TONA, L.; APERS, S. DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo **Journal Ethnopharmacol**, v. 79, p. 213, 2002.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v. 30, p. 389–99, 1989.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a polycarpine model in mice. **Neuroscience letts**, v. 523, p.115-118, 2012.

CRISTANI, M.T. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308, 2007.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, p. 1250-1318, 2000.

CUSTÓDIO, J.B.A.; RIBEIRO, M.V.; SILVA, F.S.G.; MACHADO, M.; SOUSA, M.C. The essential oils component p-cymene induces pronon leak through Fo-ATP synthase and uncouplin of mitochondrial respiration. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 3, p. 69- 76, 2011.

DALBY, N.O.; MODY, I. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. **Current Opinion in Neurology**, v.14, p.187–192, 2001.

DE, B.; DEBBARMA, T.; SEN, S.; CHAKRANBORTY, R. Tribal life in the environment and biodiversity of Tripura, India. **Current World Environment**, v. 5, p. 59–66, 2010.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T.B.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v.70, p. 1621-1637, 2009.

DICHTER, M.A. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. **Epilepsia**, v. 35, p. 51–57, 1994.

DUCAN, J.S.; SANDER, J.W.; SISODIYA, S.M.; WALKER, M.C. Adult epilepsy. **Lancet**, p. 367, 2006.

DUBEY, N.K.; KUMAR, R.; TRIPATHI, P. Global promotion of herbal medicine: India's opportunity. **Current Science**, v. 86, p. 37–41, 2004.

ENGEL, J.JR. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796- 80, 2001.

FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma revisão de Literatura. **Revista Neurociência**, v. 19, p. 128-138, 2011.

GARCIA, M.E.G.; MORALES, I.G.; GUIU, J.M. Modelos experimentales em epilepsia. **Neurología**, v. 25, p. 181-188, 2010.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of Escherichia coli Listeria monocytogenes an Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal Food Microbiology**, v. 108, p. 1-9, 2006.

HALATCHEV, V.N. Epidemiology of epilepsy—recent achievements and future. **Folia Medica (Plovdiv)**, v. 42, p. 17–22, 2000.

HESDORFFER, D.C.; LOGROSCINO, G.; CASCINO, G.; ANNEGERS, J.F.; HAUSER, W.A. Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota, 1965–1984. **Neurology**, v. 50, p. 735–741, 1998.

KAMBOJ, V.P. Herbal medicine. **Current Science**, v. 78, p. 35-39, 2000.

KANNER, A.M.; BALABANOV, A. Depression and epilepsy. How closely related are they? **Neurology**, v. 58, p. 27-39, 2002.

KANNER, A.M. Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences. **Current Opinion in Neurology**, v. 21, p. 190-194, 2008.

KELLER, K.; KNÖSS, W.; REH, K.; SCHNÄDELBACH, D. Phytopharmaka. Begriffsbestimmungen und Hintergründe. In: **Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz**, v. 46, p 1036–1039, 2003.

KODALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, EBRU.; Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8788-8795, 2008.

KWAN, P.; SANDER, J.W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. **Journal Neurology Neurosurg Psychiatry**, v.75, p. 1376–1381, 2004.

LEITE, J.P. GARCIA-CAIRASCO, N. CAVALHEIRO, E.A. New insights from the use of pilocarpine and cainate models. **Epilepsy**, v. 50, p. 93-103, 2002.

LEITE, M.P.; FASSIN JUNIOR, J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 661-666, 2008.

LICK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIQUEIRÓ, M.; PIATO, A.L.; HERRMANN, A.P.; DUPONT BIRCK, F.; CAMARÃO, E.B.; NUNES, D.S.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Inhaled linallo induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v.16, p. 303-307, 2009.

LÖSCHER, W, SCHIMIDT, D. Strategies in antiepileptic drug development: Is rational drug design superior to random screening and structural variation? **Epilepsy**, v. 17, p. 95-134, 1994.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, v. 342, p. 1-13, 1998.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

LUZ, A.I.R.; **Journal Natural Product**, v. 47, p. 906, 1985.

MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. Plantas Aromáticas na Amazônia e seus Óleos Essencias. **Museu Paraense Emmílio Goeldi (Série Adolpho Ducke)**, 2001.

MARTÍN-LUENGO, M.A; YATES, M.; MARTÍNEZ, D.; CASAL, B. IGLESIAS, M.; ESTEBAN, M.; RUIZ-HITZKY, E. Synthesis of p-cymene from limonene, a renewable feedstock. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 81, p. 218-224, 2008.

MATHERN, G.W.; BABB, T.L.; PRETORIUS, J.K.; LEITE, J.P. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human Fascia dentata. **Journal Neuroscience**, v. 15, p. 3990-4004.

MATTSON, R.H. Selection of antiepileptic drug therapy. *In*: LEVY, R.H., MATTSON, R.H., MELDRUM, B.S. **Antiepileptic Drugs**, 4 ed. Raven Press, New York, p. 123-136, 1995.

MEDEIROS, M.G.F; SILVA, A. C.CITÓ, A. M. G. L. BORGES, A.R.; LIMA, S.G., LOPES, J. A. D.; FIQUEIRDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.60, p 237-241, 2011.

MELLO, L.E. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, p. 985-995, 1993.

MUJHERJEE, P.K. **Quality control of herbal drugs**, 1st ed. New Delhi: Business Horizons Pharmaceutical Publications; 2008.

NICOLETTI, M.A. OLIVEIRA, M.A.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P.Y; TAVARES, A.P.L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v. 19, n. 1, p. 32-50, 2007.

NSOUR, W.N.; LAU, C.B.S; WONG, I.C.K. 2000. Review on phytotherapy in epilepsy. **Seizure**, v. 9, p. 96-107, 2000.

O'CONNOR, K.A., ROTH, B.L. Screening the receptorome for plant-base psychoactive compounds. **Life Sciences**, v.78, p. 506-511, 2005.

PASSOS, C.S.; ARBO, M.D.; RATES, S.M.K.; VON POSER, G.L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140-149, 2009.

PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T; RODRIGUES, M.; MORAIS, E.K.L.; MACIEL, M.A.M. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 521-528, 2007.

PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G.; CARVALHO, J.C.T. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 686-689, 2008.

PICHRISKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808–811, 2006.

POULOUSE, A.J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes Conversion of γ -Terpinene to *p*-Cymene and Thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2 p. 307-314, 1978.

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsant properties – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M.F.; SOUSA, M.F.V., BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 179-184, 2002.

RECOMMENDATIONS OF THE EPILEPSY FOUNDATION OF AMERICA'S WORKING GROUP ON STATUS EPILEPTICUS. Treatment of convulsive status epilepticus. **The Journal of the American Medical Association**, v. 270, p. 854–859, 1993.

SANGSTER, J. Octanol- water Partition coefficients of simple organic compounds. **Journal of Physics and Chemistry**, v.18, n.3, p. 1111-1227, 1989.

SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G.B.; GUMIRÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S. SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S; BONJARDIM, L.R. P-cymene redices orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.8, p. 1138-1143, 2011.

SCHEUER, M.L, PEDLEY, T.A. The evaluation and treatment of seizures. **New England Journal of Medicine**, v. 323, p.1468-1474, 1990.

SCORZA, F.A., CYSNEIROS, R.M.; ALBUQUERQUE, M.; SCATTOLINI, M.; ARIDA, R.M. Sudden unexpected death in epilepsy: an important concern. **Clinics**, v. 66, p. 65-69, 2011.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; DE, B. Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context. **Journal of Herbal Medicine I**, p. 67-75, 2011.

SHARMA, A.; SHANKER, C.; TYAGI, L.K.; SINGH, M.; RAO, C.V. Herbal medicine for market potential in India: an overview. **Academy Journal Plant Science**, v. 1, p. 26–36, 2008.

SHAPIRA, R.; MIMRAN, E. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. **Microbial Drug Resistance**, v. 94, p. 223-253, 2004.

SILVA, N.C.C; FERNADES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 402-413, 2010.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SMITH, M.; WILCOX, K.S. WHITE, H.S. Discovery of antiepileptics. **Neurotherapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

SOUSA, F.C.F., MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTENELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F.F.; ALMEIDA, R.N.; Influence of the chirality of (*R*)-(-)- and (*S*)-(+)- carvone in the central nervous system: a comparative study. **Chirality**, v. 19, p. 264-268, 2007a.

SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.; CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007b.

SUBHAN, N. Bioactivity of *Excoecaria agallocha*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 521-526, 2008.

ULTEE, A. BENNIK, M.H.J. MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; SLUMP, R.A.; STEGING, G.; SMID, E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal Food Protection**, v.63, p 620-624, 2000.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. **Journal Flavour Fragrances**, v.14, p.411, 1999.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Medicinal activities of essential oils: Role in Disease Prevention. **Bioactives Foods in Promoting Health: Fruits and vegetables**, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines – **Report of a WHO Global Survey**, 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7916e>> acesso em: 08.07.2012.

**CAPÍTULO I: Efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno no modelo de pilocarpina
em camundongos**

(Capítulo do livro Recent Research Developments in Brain Research)

Efeito Anticonvulsivante do *p*-cimeno em camundongos após convulsão induzida por pilocarpina

OLIVEIRA, TM¹; CARVALHO, RBF^{1,2}; TOMÉ, AR³; MARQUÊS, THC^{1,4}; FREITAS, RM^{1,4}; DE LIMA, SG^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

³Universidade Estadual do Ceará, Campus do Iraperi, Fortaleza - CE, Brasil.

⁴Programa de Pós Graduação em Biotecnologia/RENORBIO, Teresina – PI, Brasil

RESUMO

Este trabalho foi realizado para investigar o efeito anticonvulsivo do *p*-cimeno (CIM), um hidrocarbomneto natural presente em óleos essenciais, isto é, produto natural extraído de materiais vegetais, usando experimentos com modelo de convulsão na comparação com um anticonvulsivante conhecido, fenobarbital. CIM em doses de 50, 100 ou 150 mgkg⁻¹ proporcionou uma redução de 25, 50 e 75%, respectivamente, contra convulsões induzidas por pilocarpina, e foi eficaz no aumento da latência para primeira crise epiléptica e a na percentagem de sobrevivência, resultando em 25, 50 e 87,5% de proteção da morte induzida por convulsões, respectivamente. A droga de referência fenobarbital (50 mgkg⁻¹) produziu também uma proteção significativa (50%). O monoterpeno, 50, 100 ou 150 mgkg⁻¹, foi também capaz de aumentar a latência para a instalação do estado de mal epiléptico induzido pela pilocarpina. Além disso, observou-se que o pré-tratamento com CIM aumentou a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo dos animais com crise epiléptica induzida por pilocarpina. Os presentes resultados indicam claramente a capacidade anticonvulsivante de CIM, que pode ser, pelo menos em parte, explicada pelo aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase. Conclui-se que o *p*-cimeno pode ter efeito anticonvulsivante nas convulsões induzidas pela pilocarpina, e estes efeitos podem ser mediados por transmissão GABAérgica.

PALAVRAS-CHAVE: Epilepsia, Anticonvulsivante, Estado de mal Epileptico, Monoterpeno, Modelo de Pilocarpina, *p*-Cimeno

ABSTRACT: Anticonvulsant effects of *p*-cymene in mice after pilocarpine-induced seizures

This experiment was performed to investigate the anticonvulsant-like effects of *p*-cymene (CYM), a natural hydrocarbon that is a component of essential oils, ie, natural products extracted from vegetable materials, by using experimental paradigms of convulsions in comparison with a known anticonvulsant, phenobarbital. CYM at doses of 50, 100 or 150 mgkg⁻¹ promoted a reduction of 25, 50 and 75%, respectively, against pilocarpine-induced seizures, and it was efficacious in increasing both the latency to first seizures and the survival percentage, resulting in 25, 50 and 87,5% of protection against death induced by seizures, respectively. The reference drug phenobarbital (50 mgkg⁻¹) also produced a significant protection (50%), respectively. Its monoterpene, at 50, 100 or 150 mgkg⁻¹, was also capable to increase the latency for installation of status epilepticus induced by pilocarpine. Additionally, it was observed that the CYM pretreatment increased the acetylcholinesterase activity in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. The present results clearly indicate the anticonvulsant ability of CYM, which can be, at least in part, explained by the increased activity of the acetylcholinesterase enzyme. It is concluded that *p*-cymene may have anticonvulsant-like effects in the pilocarpine-induced seizures, and these effects may be mediated by GABAergic transmission.

KEYWORDS: Epilepsy, Anticonvulsant, Status epilepticus, Pilocarpine model, *p*-Cymene

INTRODUÇÃO

O objetivo deste capítulo é descrever vários estudos que tentaram detectar os efeitos do composto natural (*p*-cimeno) em alterações comportamentais e danos neuronais no hipocampo e corpo estriado de roedores no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina. A epilepsia é uma doença caracterizada por uma grande variedade de sintomas resultantes de distúrbios cerebrais. Semiologicamente, ela é classificada como parcial ou generalizada. As manifestações clínicas podem surgir através de sinais sensíveis, sensoriais, psicológicas, vegetativos e motores e sintomas de natureza simples ou complexa, dependendo do sistema neural implicada na gênese da doença. Crises de epilepsia têm um carácter recorrente e tendem a apresentar as mesmas características durante um período longo. Epilepsia não é uma única doença, mas representa uma variedade de distúrbios refletindo as disfunções cerebrais subjacentes que podem resultar de muitas causas diferentes. Assim, a priori, que compreende uma fusão clínica heterogênea (FISHER et al., 2005).

Estimou-se que 50 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de epilepsia. Epilepsia parcial é a forma mais comum, ocorrendo em cerca de 60% dos pacientes com epilepsia. Até 30% dos pacientes com epilepsia não vão alcançar o controle adequado da doença (SMITH, 2001).

É importante diferenciar as convulsões de ataques epiléticos. Convulsões significa ocorrências transitórias de sinais e sintomas decorrentes da sincrônica ou excessiva atividade anormal neuronal no cérebro, desencadeado por fatores convulsogênicos. Estes incluem distúrbios metabólicos envolvendo glicose, eletrólitos, temperatura aumentada ou traumatismo crânio-encefálico, entre outros. Por outro lado, a epilepsia é um distúrbio cerebral duradouro com predisposição para a geração de crises epiléticas, que levam as consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. O estado de mal epilético é uma forma grave de apresentação clínica das crises epiléticas e é caracterizada por longa duração. Dependendo do tipo de crise, pode elevar à morbidade e mortalidade (FISHER et al., 2005).

As drogas antiepiléticas são o tratamento inicial para a grande maioria dos pacientes com epilepsia. Há 150 anos, os médicos prescrevem drogas antiepiléticas em pacientes com diagnósticos recentes de epilepsia, sem qualquer avaliação científica formal acerca da eficácia, segurança e tolerabilidade de tais drogas. Por exemplo, fenobarbital e fenitoína foram registrados e colocados no mercado sem qualquer ensaio clínico randomizado conduzido para avaliar sua eficácia e segurança (GLAUSER et al., 2006). Indicação de uma

droga específica para uma determinada condição de epilepsia é baseada em estudos clínicos com diferentes níveis de evidências, muitas delas sem qualidade metodológica suficiente. As drogas são escolhidas no que diz respeito não só para os dados sobre os ensaios clínicos disponíveis, mas também as variáveis tais como o tipo de epilepsia, a idade do paciente e do suposto mecanismo de ação da droga (GARCIA et al., 2008).

A ação das drogas antiepiléticas ocorre através de vários mecanismos. Embora um número considerável de drogas antiepiléticas estejam disponíveis para o tratamento da epilepsia, há ainda uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novas drogas como alternativas (KUPFERBERG, 1992).

Os óleos essenciais são produtos naturais que apresentam uma variedade de propriedades biológicas, tais como analgésico (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001), anticonvulsivantes (ALMEIDA; MOTTA; LEITE, 2003) e ansiolítico (ALMEIDA et al., 2004) e (UMEZU et al., 2002). Estes efeitos são atribuídos aos monoterpenos que são os componentes químicos principais destes óleos essenciais. Por exemplo, o monoterpeno ciano-carvona, tem sido relatado como tendo atividade anticonvulsiva em camundongos. Do mesmo modo, ciano-carvona apresentou aumentos significativos na latência de convulsões induzidas por pilocarpina (COSTA et al., 2012).

p-Cimeno (1-metil-4-isopropilbenzeno; **Ilustração 1**) é um hidrocarboneto natural e um componente dos óleos essenciais, isto é, produtos naturais extraídos de materiais vegetais. Por exemplo, os óleos essenciais obtidos a partir de orégano e tomilho, especiarias tradicionais do Mediterrâneo, são caracterizados por um teor muito elevado de monoterpenos tais como *p*-cimeno (traço a 52%), γ -terpineno (2-52%), timol (traço a 64%), e carvacrol (1-80%) (BARATTA et al., 1998; RUSSO et al., 1998)

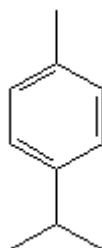


Ilustração 1 – Estrutura química do *p*-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno).

No entanto, *p*-cimeno ocorre nos óleos de muitas outras plantas gimnosperma e angiospermas. É metabolizado pelo fígado e seu metabólito majoritário é o álcool cuminil (PASS et al., 2002). Além disso, a formação de *p*-cimeno como um metabólito final a partir de certos monoterpenos não aromáticos tem sido observada em culturas de enriquecimento anóxicas (HARDER; PROBIAN, 1995; HÄNER; HÖHENER; ZEYER, 1995) e a degradação foi também demonstrada com bactérias anaeróbicas e aeróbicas (HARMS; RABUS; WIDDEL, 1999).

Algumas das ações farmacológicas de *p*-cimeno têm sido estudadas (KISKÓ; ROLLER, 2005; CUSTÓDIO et al., 2011). De acordo com estudos anteriores, o efeito antimicrobiano de monoterpenos tais *p*-cimeno pode resultar, pelo menos parcialmente, a partir de uma perturbação bruta da fração lipídica da membrana plasmática do microorganismo (GILL; HOLLEY, 2006; BRUL; COOTE, 1999).

Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a atividade anticonvulsivante de *p*-cimeno, bem como os seus efeitos sobre o dano neuronal no hipocampo e corpo estriado em camundongos em modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina.

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas

As drogas utilizadas neste trabalho, cloridrato de pilocarpina, *p*-cimeno em 50 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ e 150 mg kg⁻¹, Atropina 25 mg kg⁻¹, Fenobarbital 50 mg kg⁻¹ e o monooleato de polioxi-etileno-sorbitan (Tween 80) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. St. Louis., (USA) e o diazepam da Cristália (Brasil). Todos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) dissolvidas em água destilada (o *p*-cimeno foi dissolvido em Tween 80) em um volume final de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal.

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, adultos com 2 meses de idade, com peso variando de 25–30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C), recebendo ração padrão do tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram

realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (Protocolo de nº 038/2009).

Procedimento Experimental

Os animais com peso variando entre 25–30 g foram divididos em cinco grupos (n=12). O primeiro grupo foi usado como controle e recebeu o veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina de 0,9%), o segundo grupo foi tratado com cloridrato de pilocarpina 400mg kg⁻¹ (P400). Os demais foram tratados com *p*-cimeno (CIM) em concentrações de 50, 100 e 150 mg kg⁻¹ e observados. Após 1h e 24 horas da administração de pilocarpina, os animais que apresentaram convulsões, estado epiléptico e sobreviveram ao tratamento foram sacrificados, e seus cérebros removidos. O hipocampo e o corpo estriado foram dissecados sobre gelo e armazenados em condições apropriadas para a realização dos estudos neuroquímicos.

Em outra série de experimentos, com 7 grupos de camundongos (n=12). O primeiro grupo foi tratado com veículo, o segundo com diazepam (DZP) 5 mg kg⁻¹, o terceiro com fenobarbital (FBT) 50 mg kg⁻¹, o quarto com atropina (ATR) 25 mg kg⁻¹ e os demais com *p*-cimeno (CIM) em concentrações de 50, 100 e 150 mgkg⁻¹, todos os grupo recebendo após 30 minutos uma dose de P400 e em seguida foram observados. Diazepam (5 mg kg⁻¹) e Atropina (25 mg kg⁻¹) foram utilizados como drogas de referência.

Os animais tratados e os controles foram divididos em gaiolas contendo no máximo 6 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. As drogas tiveram toda a administração intraperitoneal (i.p.). Todos os grupos experimentais foram observados após a administração das drogas, perfazendo um total de 1 hora e 24 horas. Os seguintes parâmetros foram observados: a latência da instalação da primeira crise epiléptica (LIPC), latência para o desenvolvimento de mal epiléptico (LDEP), a ocorrência de crise epiléptica tônicas, clônicas e tônico-clônicas, o número de animais que apresentaram crise epiléptica e o número de animais que sobreviveram após a administração de pilocarpina.

Efeito das alterações histopatológicas do p-cimeno em modelo de epilepsia

Após esse período, os sobreviventes dos grupos foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para análise histopatológica. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a a partir de um

corte próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 mm foram feitas, corando em hematoxilina & eosina (HE) e analisados com um microscópio óptico em um aumento 100. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos e Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado analisados de acordo com o método descrito anteriormente (MALONE, 1977; AL-HABORI et al., 2002). Foi definido como lesão cerebral nos animais havia pelo menos 50% de alteração no hipocampo ou corpo estriado conforme estudos anteriores (CAMPELO et al., 2011).

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações Comportamentais no Modelo de Epilepsia

O estado de mal epiléptico é uma emergência médica e neurológica. Em geral, a mortalidade é de 17 a 26% (LOGROSCINO et al., 2001; LORENZO et al., 1996). Um adicional de 10 a 23% dos pacientes que sobrevivem ao estado de mal epiléptico saem com um déficit ou uma nova incapacidade neurológica (CLAASSEN et al., 2002; LOWENSTEIN; ALLDREDGE, 1998). Tradicionalmente, o estado de mal epiléptico é definido como uma atividade epiléptica contínua ou repetitiva que persista por pelo menos 30 minutos sem recuperação da consciência entre os ataques. Mais recentemente, autores têm sugerido que as crises epilépticas superiores a 5 a 11 minutos devem ser consideradas estado de mal epiléptico (LOWENSTEIN; BLECK; MacDONALD, 1999; JENSSEN; GRACELY; SPERLING, 2006). Para todos os efeitos práticos, um paciente deve ser considerado em estado de mal epiléptico se uma crise epiléptica persiste por mais de 5 minutos, sendo que poucas crises individuais duram este tempo.

Vários tipos de estado de mal epiléptico podem existir. Clinicamente, a distinção mais importante a fazer é entre estado de mal epiléptico convulsivo e não convulsivo com base em

ter ou não, espasmos rítmico das extremidades observadas. Tipicamente, os pacientes que apresentam estado de mal convulsivo generalizado são esperados que despertassem gradualmente após o desaparecimento das crises com as características motoras. Se o nível de consciência não melhora por 20 minutos após a cessação dos movimentos, ou o estado mental anormal permanece de 30 a 60 minutos após o cessar da crise, o estado de mal epilético não convulsivo deve ser considerada e o eletroencefalograma urgente é aconselhado.

Em um estudo realizado por De Lorenzo e colaboradores (1998), 14% dos pacientes tratados com sucesso para o estado de mal epilético convulsivo estavam em estado de mal epilético não convulsivo quando foi iniciado o eletroencefalograma; dos pacientes submetidos a monitoramento contínuo com eletroencefalograma depois de estado de mal epilético convulsivo foram controlado, 48% tiveram crise epilética não convulsiva.

O estado de mal epilético é uma situação de emergência que requer tratamento médico imediato. Se for danos cerebrais graves permanentes ou morte tem de ser evitada com o pré-tratamento com os compostos naturais. Estado de mal epilético, muitas vezes ocorre em indivíduos com história de crise epilética, em quem não são substratos neuronais já predispostos para apoiar a atividade de crise epilética.

O modelo experimental de pilocarpina em animal é útil para investigar o desenvolvimento de fases agudas, silenciosos e crônica (CAVALHEIRO, 1991). Imediatamente após a administração de pilocarpina, todos os animais persistentemente apresentaram mudanças de comportamento, incluindo inicialmente acinesia, ataxia, sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção automatismos, cromodacriorréia, diarreia e automatismo mastigatória), movimentos estereotipados (lamber e cheirar a pata e *wet dog shakes* que persistiu por 10-15 min), movimentos clônicos de membros dianteiros, balançando a cabeça e tremores. Essas mudanças de comportamento evoluíram para crises epiléticas motoras límbicas, como descritas anteriormente por Tursky e colaboradores, 1983. Convulsões límbicas duraram 7-15 min evoluindo para estado de mal epileptico por um período superior a 30 min. Durante 1 h de fase aguda de convulsões, nenhum caso de letalidade foi observado entre os camundongos adultos. No entanto, durante a observação de 24 h desta fase, 100% dos animais adultos morreram (COSTA et al., 2012; CAVALHEIRO et al., 1994; ALMEIDA et al., 2012).

De igual modo, estes resultados para as alterações comportamentais no modelo induzido por pilocarpina foram previamente relatados (COSTA et al., 2012; MARINHO et al., 1998). De acordo com nossos estudos anteriores (COSTA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012), poucos minutos após a administração de pilocarpina, os animais apresentaram movimentos

estereotipados orais e mastigatórios, hipocinesia, salivação, tremores e convulsões parciais ou generalizadas límbicas. Aproximadamente 30 minutos após a injeção de pilocarpina, as convulsões evoluíram para estado de mal epilético duradouro 12-18 h. Durante este período, 80% dos animais morreram devido ao estado de mal epilético. Esta fase aguda foi seguida por um período silencioso variando de 4 a 44 dias (média de 15 dias) durante o qual os animais indicaram comportamento normal.

Um período crônico de crises espontâneas e recorrentes (CER) (3-4 crises por semana) também foi observado e todos os animais que sobreviveram ao estado de mal epilético, apresentaram a fase crônica. Durante este período, não houve alterações comportamentais nos animais.

No modelo de epilepsia, induzido pela pilocarpina, a primeira crise epilética ocorreu em $7,83 \pm 0,27$ min. Todos os camundongos que receberam injeção de pilocarpina (na dose de 400 mgkg^{-1} , i.p.) apresentaram crises generalizadas tônico-clônicas com estado de mal epilético, e nenhum animal sobreviveu às crises (COSTA et al., 2012) No presente estudo, foi demonstrado que a administração sistêmica de *p*-cimeno pode abolir completamente as crises epilepticas induzidas pela pilocarpina. Isso ficou evidente a partir de mudanças comportamentais simultâneas consistentes com o estado convulsivo. Isso também se refletiu provocando alterações no estresse oxidativo e atividade de acetilcolinesterase após convulsões induzidas por pilocarpina. Considerando-se que o *p*-cimeno conseguiu prevenir as convulsões tônicas induzidas pela pilocarpina este composto poderia ser útil no tratamento da epilepsia de grande mal.

Efeitos do p-cimeno sobre alterações comportamentais no Modelo de Epilepsia

O estado de mal epilético é uma emergência neurológica que necessita diagnóstico e tratamento, está associado com uma maior probabilidade de má resposta ao tratamento e pior prognóstico. A convulsão generalizada no estado de mal epilético é uma das emergências médicas mais comuns na prática clínica. O estado de mal epilético ocorre não só em pessoas com epilepsia, mas também no contexto de outras desordens neurológicas e doença sistêmica. A incidência anual no Reino Unido é de cerca de 9000-14000 novos casos (SHORVON, 2001).

Estado de mal epilético é responsável por 3,5% das internações para os departamentos de emergência nos países desenvolvidos e de 11% em um país em desenvolvimento (MEENA; PRASAD; KAUL, 2000). O pronto reconhecimento e tratamento são necessários

para evitar complicações associadas. No entanto, estudos prospectivos randomizados sobre o tratamento são poucos. Formulações de anticonvulsivantes mais recentes são limitadas a via oral e, portanto, não poderia ser amplamente utilizado no tratamento inicial de estado de mal epilético. Deste modo, existe uma necessidade substancial para melhorar as medidas de prevenção e gestão eficaz desta condição com risco de morte.

A pesquisa no reino vegetal para um tratamento ou cura para as crises epiléticas convulsivas ou não é uma abordagem razoável para o problema; particularmente, quando se considera que nenhum protótipo farmacológico foi encontrado fora da flora ou fauna. A história de tratamentos com ervas para convulsões coincide com a história da medicina, bem como com a história da própria civilização. Os anticonvulsivantes são usados para controlar convulsões que ocorrem na epilepsia, tétano, hemorragia cerebral, eclâmpsia e no envenenamento com convulsivantes (CHAUHAN; DOBHAL; JOSHI, 1988).

De acordo com Cheymol (1950), o surgimento das convulsões é devido a uma descarga repentina excessiva e rápida na massa cinzenta do cérebro. Convulsões têm a origem focal, a forma da crise epilética depende do local no cérebro, das regiões que se espalha a descarga e os efeitos da paralisia pós ictal nestas regiões.

O sistema nervoso contém algumas enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase e glutathione peroxidase que são expressas em quantidades superiores a catalase (SHIVAKUMAR; ANANN DATHEERTHAVARADA; RAVINDRANATH, 1991). Este espectro de defesa enzimática sugere que o cérebro pode eficientemente metabolizar superóxido, mas pode ter dificuldades em eliminar o peróxido de hidrogênio produzido por esta reação. A acumulação de peróxido de hidrogênio é de grande preocupação uma vez que o cérebro contém grande quantidade de ferro e cobre, que podem catalisar a formação de radical hidroxila, o qual, por sua vez, pode induzir a peroxidação lipídica (CASTAGNE et al., 1990).

A glutathione peroxidase é apresentado em grandes quantidades durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), mas decresce em camundongos idosos (NANDA; TOLPUTT; COLLARD, 1996). No entanto, outros captadores, tais como ácido ascórbico e alfa-tocoferol também poderia diminuir a propagação de reação radical em cadeia. Por estas razões, os radicais livres têm sido apontados como moléculas importantes envolvidas nas patologias do sistema nervoso, tais como doença de Huntington, doença de Alzheimer, isquemia e a epilepsia (JENNER, 1998).

No modelo de epilepsia induzida pela administração de pilocarpina, observamos que a superóxido dismutase e a catalase no hipocampo não são alterados durante a fase aguda de convulsões. Por outro lado, segundo vários autores, o aumento dessas atividades enzimáticas

pode diminuir os níveis da O_2^- e H_2O_2 . Em conjunto, estes resultados mostram que durante a fase aguda, o hipocampo dos animais adultos no modelo da pilocarpina após convulsões é mais vulnerável ao estresse oxidativo.

Além disso, altos níveis de hidroperóxidos foram também observados no mesmo grupo de animais, o que indicava que a peroxidação lipídica pode ser dependente da deficiência da atividade antioxidante enzimática (superóxido dismutase e catalase). À medida que os hidroperóxidos são uma classe de compostos produzidos como resultado da peroxidação de fosfolípido, a sua concentração elevada no tecido sugere que as células do hipocampo são mais vulneráveis aos danos, durante o período agudo de convulsões. Assim, os resultados descritos na literatura sobre o modelo de pilocarpina sugerem que o efeito benéfico dos compostos antioxidantes em reduzir as alterações comportamentais causadas por convulsões pode ser parcialmente explicado pela sua capacidade de remover os radicais livres e prevenir a formação de hidroperóxidos no hipocampo dos camundongos em crise.

Adesina (1985) realizou estudos fitoquímicos e farmacológicos em 50 plantas que foram utilizados em testes como anticonvulsivantes, anti-leptazol e anti-estricnina. Chang (1983) relatou a caracterização de compostos biologicamente ativos a partir do reino vegetal. Este capítulo se restringe ao *p*-cimeno e sua atividade anticonvulsiva e os resultados estão resumidos na **Tabela 1**.

A necessidade de modelos em animais de epilepsia é impulsionada pelas restrições de estudar o cérebro epilético humano. Embora muito tenha sido aprendido através do estudo de tecido cerebral humano epilético ao longo dos últimos 100 anos, e particularmente com base em experiências recentes com o modelo de pilocarpina, nosso trabalho teve por objetivo investigar os efeitos antioxidantes do *p*-cimeno em camundongos adultos em modelo de convulsão induzido por pilocarpina. Os nossos estudos têm demonstrado que todos os animais pré-tratados com o *p*-cimeno, com a dose (50, 100 ou 150 mg kg⁻¹) durante os primeiros 3-5 minutos da fase aguda de crise epilética induzida por injeção de pilocarpina também manifestaram alterações de comportamento, tais como sinais colinérgicos periféricos, tremores, automatismos faciais, *wet dog shakes*, chegaram a crises epiléticas motoras, que se desenvolvem progressivamente dentro de 10 min em um estado de mal epilético de longa duração. No entanto, estas alterações comportamentais ocorreram a taxas mais baixas (**Tabela 1**). Os resultados também sugerem que, quando administrada 30 min antes da pilocarpina, o *p*-cimeno reduz a percentagem de animais que convulsionam, aumenta a latência para a primeira crise epilética e a percentagem de sobrevivência (**Tabela 1**).

Na prática pré-clínica, os animais pré-tratados com *p*-cimeno (50 mg kg^{-1}) no modelo da pilocarpina desenvolveram reações colinérgicas, 75% tiveram convulsões, 75% chegaram até o estado epiléptico e 25% dos animais sobreviveram (**Tabela 1**). Na administração de 50 mg kg^{-1} de *p*-cimeno, 30 min antes de pilocarpina, aumentou o tempo de latência para o início da primeira crise epiléptica em 129% (**Tabela 1**). No modelo de pilocarpina, foi também mostrado que, quando administrado na dose de 100 mg kg^{-1} , 30 min antes da injeção de pilocarpina, *p*-cimeno diminuiu em 50%, a percentagem de animais que convulsionam, aumentou (213%) de latência para primeira convulsão, e aumentou a sobrevivência (41%) (**Tabela 1**).

O pré-tratamento com *p*-cimeno, em doses de 50, 100 ou 150 mg kg^{-1} não foi capaz de reverter sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados induzidos por pilocarpina, mas o composto provocou uma redução dose-dependente nas convulsões induzidas por pilocarpina, nas doses de 50 (25%), 100 (50%) e 150 mg kg^{-1} (75%). Um efeito protetor claro foi também observada com ATR 25 mg kg^{-1} , FBT (50 mg kg^{-1}) e DZP (5 mg kg^{-1}), que foram utilizados como fármacos de referência (**Tabela 1**). Como verificado em nosso estudo, *p*-cimeno teve eficácia dose-dependente em aumentar o tempo de latência para primeira convulsões induzidas pela pilocarpina nas doses de 50, 100 e 150 mg kg^{-1} .

Tabela 1. Efeito do pré-tratamento com *p*-cimeno sobre as alterações comportamentais em crises epilépticas induzidas por pilocarpina e letalidade em camundongos adultos.

Drogas	Dose mg kg^{-1}	Reações Colinérgicas (%)	LIPC (min)	CP (%)	EME (%)	Taxa de Sobrevivencia (%)
Pilocarpina	400	100	$7,83 \pm 0,27$	100	100	00
<i>p</i> -cimeno	50	100	$18,0 \pm 0,27^a$	75^d	75^d	25^d
	100	100	$24,5 \pm 0,82^{a,b}$	$50^{d,e}$	$50^{d,e}$	$50^{d,e}$
	150	100	$52,0 \pm 5,0^{a,b,c}$	$25^{d,e,f}$	$25^{d,e,f}$	$87,5^{d,e,f}$
Diazepam	5	100	$9,0 \pm 0,98^a$	100	100	25^d
Fenobarbital	50	100	$45,3 \pm 1,70^a$	50^d	50^d	50^d
Atropina	25	00	-	00^d	00^d	100^d

Estado de mal epiléptico (E.M.E.) e taxa de sobrevivência. Os resultados da latência para primeira crises epilépticas são expressos em minutos (min) com média \pm E.P.M. do número de experiências mostradas no grupo experimental e os outros em percentagem. ^a $p < 0,05$, vs

pilocarpina; ^bp<0,05 vs *p*-cimeno 50; ^cp<0,05 vs *p*-cimeno 100 (ANOVA e *t*-Student Newman Keuls teste *post hoc*); ^dp<0,05, vs pilocarpina; ^ep<0,05 vs *p*-cimeno 50; ^fp<0,05 vs *p*-cimeno 100 (χ^2 test).

De acordo com a Tabela 1, *p*-cimeno causou um aumento de latência para a instalação do estado de mal epiléptico induzido pela pilocarpina (400 mg kg⁻¹) em doses de 50 (96%), 100 (158%) e 150 mg kg⁻¹ (481%). A Tabela 1 mostra que *p*-cimeno aumentou significativamente a taxa de sobrevivência após convulsões induzidas por pilocarpina em doses de 50 (25%), 100 (50%) e 150 mg kg⁻¹ (87,5%). As drogas de referências ATR (25 mg kg⁻¹), FBT (50 mg kg⁻¹) e DZP (5 mg kg⁻¹) produziram também uma proteção significativa (100, 50 e 75%), respectivamente. Nenhum dos animais do grupo controle (veículo, atropina, diazepam, fenobarbital ou *p*-cimeno) apresentou mudanças comportamentais.

Assim, com os resultados sugerem que os compostos naturais, como *p*-cimeno, podem ser usados como limpadores de radicais livres, reduzindo a lesão cerebral induzida por pilocarpina. Em análise histopatológica anteriores, *p*-cimeno protegeu animais contra crises epilépticas, estado de mal epiléptico e danos cerebrais induzidos por pilocarpina (**Ilustração 2**) através da diminuição da percentagem de crises epilépticas, estado de mal epiléptico e morte em relação às três doses testadas.

Efeitos do p-cimeno sobre Alterações Histopatológicas no Modelo de Epilepsia

Uma grande variedade de lesões tem sido relatada em diferentes estudos de epilepsia na literatura, embora a questão ainda seja gerada se estas lesões observadas são a causa ou a consequência das crises epilépticas. As lesões que podem desempenhar um papel no início, manutenção e progressão da farmacoresistência aos ataques epilépticos, bem como as lesões que ainda podem resultar e não estão bem compreendidos (KHANI; ASSAAD, 2008).

Ao longo das últimas décadas, o refinamento e avanço de ferramentas para a investigação neurobiológica, juntamente com a proliferação da cirurgia de epilepsia têm oferecido a possibilidade de estudar em detalhe algumas propriedades celulares e moleculares do cérebro humano (AVOLI, 1993; AVOLI; WILLIAMSON, 1996). Tais análises, que têm sido mais frequentemente realizadas em tecido cerebral obtido a partir de pacientes epilépticos, não só têm revelado alguns princípios básicos da rede e da fisiologia celular de células nervosas humanas, mas também têm fornecido informação direta sobre a fisiopatologia subjacente a esta doença.

Os primeiros relatórios de necropsia demonstraram duas formas etiológicas da epilepsia do lobo temporal. Esta patologia poderia ser devida a lesões estruturais específicas epileptogênicas ou discretas alterações histológicas no hipocampo que foram dadas o nome genérico de esclerose hipocampal (BABB et al., 1984; SOMMER, 1880). Esclerose hipocampal é caracterizada por extensa perda de corpos celulares piramidais particularmente em CA1, gliose reativa, a dispersão dos grânulos de células no giro dentado e reorganização de fibras musgosas (BABB et al., 1991; LIEB; BABB; ENGEL, 1989).

Pacientes epiléticos com esclerose hipocampal acentuada tem uma história clínica característica, alterações eletroencefalográficas bem localizadas, déficits neuropsicológicos e padrões metabólicos que individualizam uma síndrome denominada epilepsia do lobo temporal mesial. Epilepsia do lobo temporal mesial é de longe a forma mais comum de epilepsia do lobo temporal (ENGEL, 1993; MARGERISON; CORSELLIS, 1966). Ela geralmente aparece entre cinco e 10 anos, embora às vezes com um início mais tardio, depois de complicadas convulsões febris, estado de mal epilético, encefalite ou traumatismo craniano (GAGE; OLEJNICZAK; ARMSTRONG, 1998). Crises espontâneas de epilepsia do lobo temporal mesial recorrente estão associados com alterações de consciência e automatismos orofaciais; convulsões motoras secundariamente generalizadas são raras.

Estudos pré-clínicos demonstraram que os roedores sustentam prolongados déficits comportamentais após lesão cerebral epilética, em alguns casos, culminando nas características cognitivas e histopatológicas da epilepsia humana. No entanto, poucos estudos examinaram as conseqüências em longo prazo e os efeitos de compostos naturais em lesão cerebral experimental de epilepsia.

Algumas observações devem ser feitas neste momento. Por exemplo, deve ser enfatizado que a maioria dos dados humanos resultou a partir de abordagens metodológicas *in vivo* com roedores e em particular da preparação em fatia do cérebro e, portanto, estes resultados refletem a atividade de um sistema “reduzido” que não possui a capacidade de um cérebro intacto (STERIADE, 2001).

Além disso, a maioria destes experimentos foram realizados em roedores que se apresentam com distúrbios epiléticos parciais que são muitas vezes farmacoresistentes e, portanto, favorável para investigações aprofundadas que conduzem a intervenções neurocirúrgicas. É também importante notar que a interpretação dos dados obtidos a partir de experiências com humanos é dificultada pela ausência de controle humano “normal”. Tal problema foi parcialmente trabalhado por empregar amostras corticais “não-epilético” (por

exemplo, o tecido ressecado durante a remoção de um tumor localizado no fundo do cérebro). No entanto, mesmo em tais casos, é pouco provável que este tecido cerebral seja “normal”.

Diversos modelos experimentais de epilepsia que vêm sendo desenvolvidos refletem os efeitos de ácido lipóico, ubiquinona, ciano-carvona, ácido ascórbico e alfa-tocoferol e especifica sua ação (KOZA et al., 2007; SANTOS et al., 2010). Anteriormente, tinha sido demonstrado que os compostos naturais reduziram a frequência de atividade epileptiforme (AYYILDIZ; YILDIRIM; AGAR, 2006; AYYILDIZ et al., 2007). Nos últimos anos, muitos dos efeitos de *p*-cimeno, foram descobertos, incluindo as suas ações sobre as funções mitocondriais.

Alguns estudos relataram que *p*-cimeno não altera o consumo de oxigênio pela cadeia respiratória (respiração estado 2). No entanto, *p*-cimeno diminui o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), deprime a taxa de fosforilação ADP (**estado 3**), e estimula o consumo de oxigênio após a fosforilação de ADP (**estado 4**). O índice de controle respiratório (**estado 3/estado 4**) foi diminuído como uma consequência da inibição do estado 3 e estimulação da respiração estado 4, mas o índice de ADP/O permaneceu inalterado, bem como os fluxos de Ca^{2+} de mitocondriais. Além disso, *p*-cimeno não induz ruptura da membrana mitocondrial, mas deprime o $\Delta\psi$ e o efeito estimulatório observado no estado 4, semelhante ao efeito observado sobre a respiração no estado 2 mais ATP, foi inibida por oligomicina. Estes efeitos sugerem que *p*-cimeno permite uma fuga de próton através da fração F_0 do sistema fosforilativo, alterando a força próton motriz mitocondrial e capacidade de síntese de ATP (CUSTÓDIO et al., 2011). Portanto, esses dados sugerem ser a mitocôndria alvo do mecanismo de ação do *p*-cimeno.

Esses resultados demonstraram que o padrão de convulsão e dano cerebral observados em animais tratados com pilocarpina difere daqueles pré-tratado com *p*-cimeno mais pilocarpina. O último reproduziu a síndrome com menor intensidade de alterações histopatológicas e taxa de mortalidade, corroborando os resultados obtidos por Ayyildiz e colaboradores (2007), Costa e colaboradores (COSTA et al., 2012) e Freitas (2011). A percentagem de estado de mal epiléptico (100%) que foi encontrada corrobora com as investigações anteriores (COSTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2005).

O alvo preciso da ação anticonvulsivante do *p*-cimeno e derivados ainda não foi totalmente estabelecido, mas tem sido relatado que o modo de ação envolve vários alvos na célula. O *p*-cimeno tem demonstrado que tem propriedades neuroprotetoras. De fato, tem sido relatado que os efeitos anticonvulsivantes de *p*-cimeno e derivados podem resultar, pelo menos parcialmente, a partir de uma redução da perturbação da fração lipídica da membrana

plasmática, atuando por proteção da membrana citoplasmática contra os radicais livres. A integridade da membrana favorece as suas funções não só como uma barreira, mas também como uma matriz para as enzimas e como um transdutor de energia.

As alterações na composição de ácido graxos de membrana das células neuronais (um aumento de ácidos graxos insaturados) e mudanças na fluidez da membrana foram observadas durante convulsões induzidas por pilocarpina (COSTA et al., 2012; FREITAS, 2009). Portanto, a hidrofobicidade que lhes permite a partição nos lípidos da membrana celular e as mitocôndrias, tornando-os permeável e levando a fuga do conteúdo das células (FREITAS et al., 2003). Para além dos efeitos sobre a integridade da membrana e do potencial transmembranar, o tratamento com este monoterpene pode induzir aumentos dos níveis intracelulares de ATP, quando as células neuronais foram expostas a atividade epiléptica.

Exames de tecido cerebral dos animais pré-tratados com *p*-cimeno (50, 100 ou 150 mg kg⁻¹ e Ilustração 1 F, G e H), não revelaram alterações histopatológicas no hipocampo. Em seguida, os animais tratados com pilocarpina apresentaram perda neuronal, gliose, e degeneração vacuolar típico em região do hipocampo (Ilustração 2 B). Danos histopatológico no hipocampo foram observados apenas em 37,5% dos animais pré-tratados com pilocarpina (400 mg kg⁻¹) e *p*-cimeno (50 mg kg⁻¹) (Tabela 2 e Ilustração 2 C).

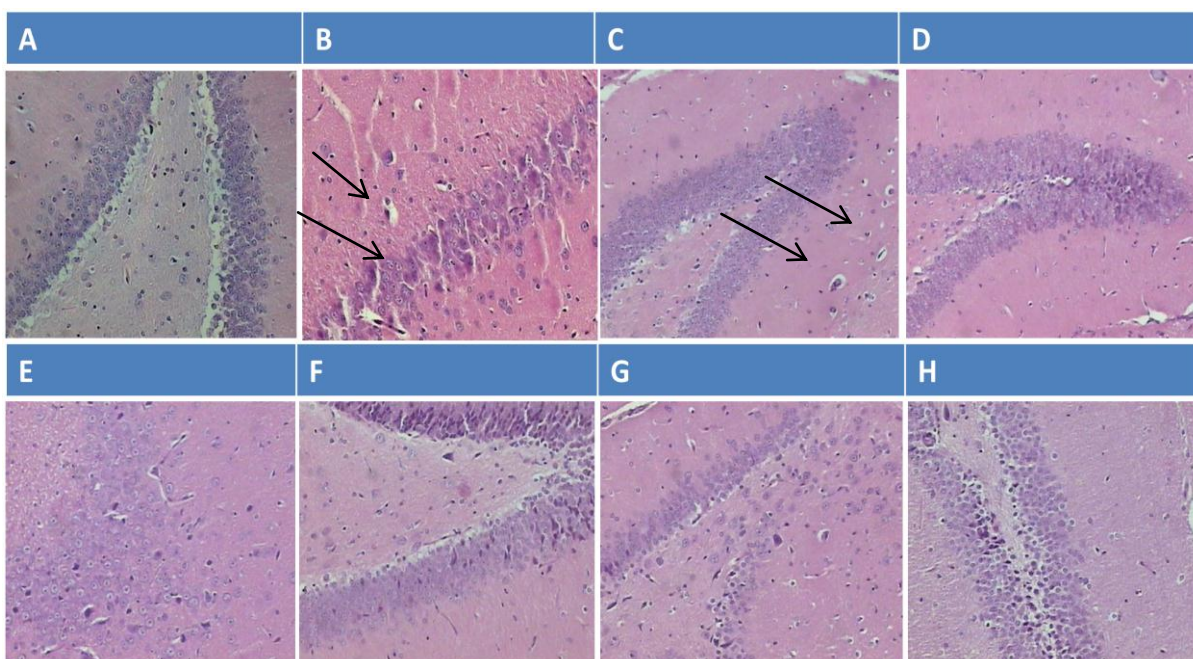


Ilustração 2. Avaliação do efeito do tratamento com *p*-cimeno no hipocampo de camundongos adultos.

[A] grupo controle; [B] Grupo pilocarpina; [C] Grupo pré-tratado com *p*-cimeno (50 mg kg⁻¹) e 30 min depois com pilocarpina; [D] Grupo pré-tratado com *p*-cimeno (100 mg kg⁻¹) e 30 min depois com pilocarpina; [E] Grupo pré-tratado com *p*-cimeno (150 mg kg⁻¹) e 30 min depois com pilocarpina; [F] grupo *p*-cimeno (50 mg kg⁻¹); [G] grupo *p*-cimeno 100; [H] grupo *p*-cimeno (150 mg kg⁻¹). A gravidade da lesão foi expressa como média ± E.M.P. dos escores de danos com base em uma escala de zero (nenhum) a 100 por cento (total) de comprometimento estrutural. O dano cerebral foi considerado positivo se havia pelo menos 50% de comprometimento do hipocampo.

Além disso, as análises de danos histopatológico no hipocampo de camundongos pré-tratados com *p*-cimeno (100 ou 150 mg kg⁻¹) e que receberam pilocarpina (400 mg kg⁻¹) não revelou alterações histopatológicas no hipocampo (**Tabela 2 e Ilustração 2 D e E**). Além disso, as análises de danos histopatológico no hipocampo dos camundongos pré-tratados com veículo (grupo de controle) não revelaram qualquer dano neuronal (**Ilustração 2 A**).

Severidade da lesão no hipocampo foi reduzida em 51,2% dos animais co-administrados com *p*-cimeno (50 mg kg⁻¹), e que 30 min após o pré-tratamento receberam pilocarpina (400 mg kg⁻¹), respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2. Alteração histopatológica no hipocampo de camundongos pré-tratados com *p*-cimeno apos convulsão induzida por pilocarpina.

Drogas	Dose (mg kg ⁻¹)	Camundongos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Numero de animais com lesão por grupo (%)
Pilocarpina	400	87,5	63,92±0,3	7
<i>p</i> -cimeno	50	00	00	0
	100	00	00	0
	150	00	00	0
<i>p</i> -cimeno + pilocarpina	50	37,5 ^a	12,9±0,2 ^b	3 ^a
	100	00	00	0
	150	00	00	0

A gravidade da lesão foi expressa como média ± E.P.M. de expressão de danos com base numa escala de zero (nenhum) a 100 por cento (total) de comprometimento estrutural. Foi definido como dano cerebral se houvesse pelo menos 50 % de envolvimento do hipocampo. Os resultados para % de animais com lesão cerebral e da gravidade da lesão são expressos

como percentagens do número de animais que estão em parênteses. ^ap <0,05 comparado com o grupo pilocarpina (χ^2 teste). ^bp <0,05 comparado com o grupo pilocarpina (ANOVA e *t*-Student Newman Keuls *post hoc*).

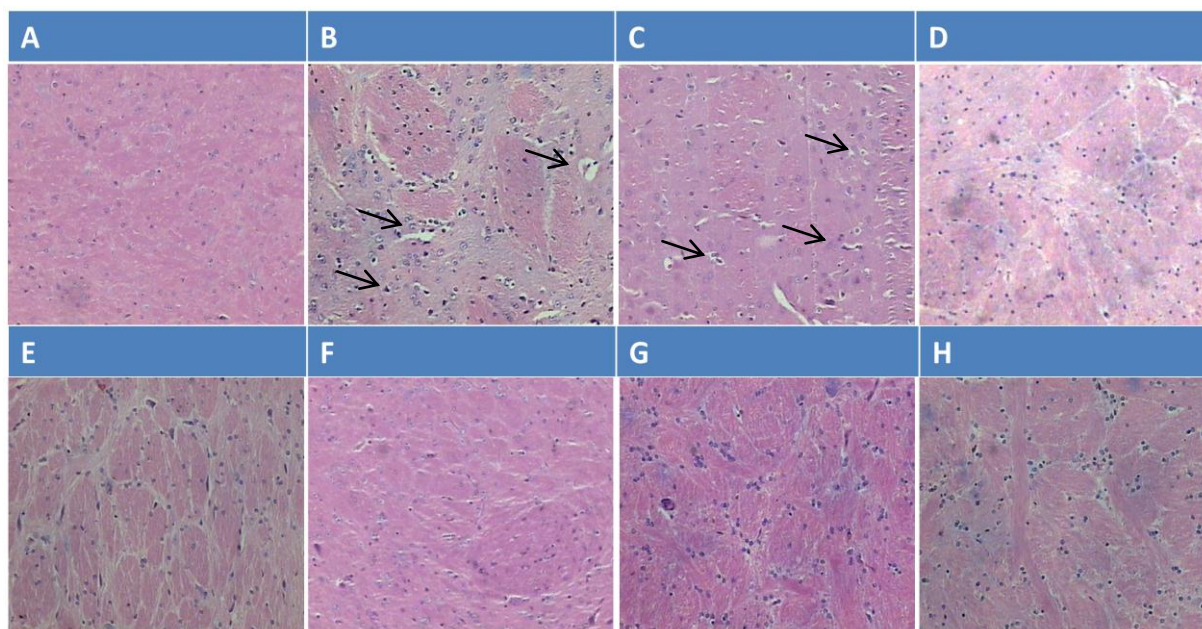


Ilustração 3. Alteração histopatológica em corpo estriado de camundongos tratados com pilocarpina, *p*-cimeno ou suas combinações.

Gravidade da lesão foi expressa como uma média \pm E.P.M. dos escores de danos com base em uma escala de zero (nenhum) a 100 (total) a porcentagem de envolvimento do corpo estriado. Dano cerebral foi considerado positivo se houvesse pelo menos 50% do comprometimento do corpo estriado corado por Hematoxilina&eosina (HE). Imagem mostrada (100 X) de uma amostra representativa de $n = 8$. [A] grupo controle; [B] Grupo pilocarpina; [C] Grupo pré-tratado com *p*-cimeno (50 mg kg^{-1}) e 30 min depois com pilocarpina; [D] Grupo pré-tratado com *p*-cimeno (100 mg kg^{-1}) e 30 min depois com pilocarpina; [E] Grupo pré-tratado com *p*-cimeno (150 mg kg^{-1}) e 30 min depois com pilocarpina; [F] grupo *p*-cimeno (50 mg kg^{-1}); [G] grupo *p*-cimeno 100; [H] grupo *p*-cimeno (150 mg kg^{-1}). A gravidade da lesão foi expressa como média \pm E.M.P. dos escores de danos com base em uma escala de zero (nenhum) a 100 por cento (total) de comprometimento estrutural. O dano cerebral foi considerado positivo se havia pelo menos 50% de comprometimento do hipocampo.

Exames de tecido cerebral dos animais pré-tratados com *p*-cimeno (50, 100 ou 150 mg kg^{-1} e **Ilustração 3 F, G e H**), não revelou alterações histopatológicas do corpo estriado. Em seguida, novamente, os animais tratados com pilocarpina apresentaram perda neuronal e

degeneração vacuolar típico na região corpo estriado (**Ilustração 3 B**). Danos histopatológico em campo estriado foi observada apenas em 25% dos animais tratados com *p*-cimeno (50 mg kg^{-1}) 30 min após o tratamento com pilocarpina (400 mg kg^{-1}) (**Tabela 3 e Ilustração 3 C**). Além disso, as análises de danos histopatológico em corpo estriado de camundongos pré-tratados com *p*-cimeno (100 ou 150 mg kg^{-1}), e que 30 min após o pré-tratamento recebeu pilocarpina (400 mg kg^{-1}) não revelou alterações histopatológicas do campo estriado (**Tabela 3 e as Ilustrações 3 D e E**). Além disso, as análises de danos histopatológicos em corpo estriado de camundongos pré-tratados com veículo (grupo de controle) não revelaram qualquer dano neuronal (**Ilustração 3 A**).

A severidade da lesão no hipocampo foi reduzida em 44,23% dos animais co-administrados com *p*-cimeno (50 mg kg^{-1}) 30 min antes do tratamento com pilocarpina (400 mg kg^{-1}), respectivamente (**Tabela 3**).

Os resultados confirmam que *p*-cimeno (50 , 100 ou 150 mg kg^{-1}) reduziu a frequência de convulsões induzidas por pilocarpina, estado epilético e lesões cerebrais em camundongos. Além disso, *p*-cimeno diminui a gravidade das lesões do hipocampo e do corpo estriado e a taxa de mortalidade causada pela pilocarpina. Costa e colaboradores (2012) demonstraram em comparação que a injeção de ciano-carvona, 30 min antes da administração de pilocarpina, impediu a ocorrência de descargas epiléticas. Uma vez que existem grandes variações de doses de *p*-cimeno e ciano-carvona utilizadas em diferentes modelos de convulsão, mais investigações detalhadas são necessárias antes de uma última conclusão sobre os efeitos de tais compostos sobre convulsões induzidas por pilocarpina.

Tabela 3. Alteração histopatológica no corpo estriado de camundongos pré tratados com *p*-cimeno após convulsão induzida por pilocarpina.

Drogas	Dose (mg kg ⁻¹)	Camundongos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão por grupo (%)
Pilocarpina	400	62,5	56,19±0,34	5
<i>p</i> -cimeno	50	00	00	0
	100	00	00	0
	150	00	00	0
<i>p</i> -cimeno +pilocarpina	50	25 ^a	11,96±0,57 ^a	2
	100	00	00	0
	150	00	00	0

Pilocarpina foi administrada em uma dose única (400 mg kg⁻¹, pilocarpina, n = 8), grupo *p*-cimeno, com *p*-cimeno (50, 100 ou 150 mg kg⁻¹, n = 8). O grupo *p*-cimeno mais pilocarpina foi tratado com *p*-cimeno (50, 100 ou 150 mg kg⁻¹, n = 8) 30 min antes da pilocarpina. A gravidade da lesão foi expressa como média ± E.P.M. de pontuações de danos com base numa escala de zero (nenhum) a 100 por cento (total) de comprometimento estrutural. Os danos cerebrais foram definidos se apresentado pelo menos 50% de comprometimento do hipocampo. Os resultados da % de lesão cerebral em camundongos e % da gravidade da lesão são expressos como percentagens do número de animais dentro dos parênteses. ^ap <0,05 comparado com o grupo pilocarpina (χ^2 teste). ^bp <0,05 comparado com o grupo pilocarpina (ANOVA e *t*-Student Newman Keuls *post hoc*).

Em conclusão há um acúmulo de radicais livres após o estado de mal epiléptico induzido pela pilocarpina e alterações oxidativas em outros parâmetros durante a fase aguda. Este achado sugere que as crises epiléticas, estado de mal epiléptico e morte induzidos por pilocarpina tem uma grande participação do estresse oxidativo cerebral, que está intimamente relacionado com o mecanismo de propagação e/ou manutenção do foco epiléptico pela pilocarpina. Estes resultados sugerem que os radicais livres, bem como a ativação do receptor muscarínico parecem estar envolvidos na gênese das crises epiléticas e danos cerebrais

obtidos com pilocarpina. Por outro lado, a ativação muscarínica parece desempenhar um papel importante no dano neuronal produzido por pilocarpina. O *p*-cimeno pode exercer a função neuroprotetora durante a fase aguda das crises epiléticas, diminuindo assim a gravidade das lesões do hipocampo e do corpo estriado. Todos estes resultados indicam o potencial terapêutico promissor do *p*-cimeno em tratamentos para doenças neurodegenerativas.

CONCLUSÃO

Estes resultados mostram que *p*-cimeno possui atividade anticonvulsivante, provavelmente devido à modulação do sistema colinérgico. O *p*-cimeno pode ser útil para produzir proteção neuronal e pode ser considerado como um potencial anticonvulsivo natural. No entanto, estudos adicionais entre eles os toxicológicos, devem ser conduzidos a fim de determinar a sua utilização anticonvulsivante na clínica.

REFERÊNCIAS

- ADESINA, S.K. Constituents of *Solanum dasyphyllum* fruit. **Journal Natural Products**, v. 48, p. 147, 1985.
- AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.
- AL KHANI, R.; ASSAAD, F; Histopathological findings in chronic pharmacoresistant temporal epilepsy: A pathognomonic combination of lesions maintaining neuron injury? **Pan Arab Journal of Neurosurgery**, v. 12, p. 86-93, 2008.
- ALMEIDA, A.A.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALLANI, B.; LEITE, J.R.; Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 361-364, 2004.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; MOTTA, S.C.; LEITE, J.R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletín. Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromatáticas**, v.2, p. 3-6, 2003.

AYYILDIZ, M.; COSKUN, S.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The involvement of nitric oxide in the anticonvulsant effects of α -tocopherol on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Epilepsy Research**, v. 73, p. 166-172, 2007a.

AYYILDIZ, M.; COSKUN, S.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Epilepsia**, v.48, p. 1388-1395, 2007b.

AYYILDIZ, M.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The effects of vitamin E on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Experimental Brain Research**, v. 174, p. 109-113, 2006.

AVOLI, M. Electrophysiology and pharmacology of human neocortex and hippocampus *in vitro*. In: SCHWARTZKROIN, P.A. **Epilepsy: Models, Mechanisms and Concepts**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 244, 1977.

AVOLI, M.; WILLIAMSON, A. Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained *in vitro*. **Progress Neurobiology**, v. 48, p. 519-554, 1996.

BABB, T.L.; BROWN, W.J.; PRETOTIUS, J.K.; DAVENPORT, C.; LIEB, J.P.; CRANDALL, P.H. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 25, p.729-740, 1984.

BABB, T.L.; KUPFER, W.R.; PRETOTIUS J.K.; CRANDALL, P.H.; LEVESQUE, M.F. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, v. 42, p. 351-363, 1991.

BABB, T.L.; WILSON, C.L.; ISOKAWA-AKESSON, M. Firing pattern of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures. **Electroenceph and Clinical Neurophysiology**, v. 6, p. 467-482, 1987.

BARATTA, T.M.; DORMAN, D.J.H.; DEANS, G.S.; BIONDI, D.M.; RUBERTO, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal Essential Oil. Research**, v. 10, p. 618-627, 1998.

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A., FREITAS, R.M. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

CAMPÊLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletim Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 9, n. 6, p. 440-445, 2011.

CASTAGNE, V.; GASTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P.G.H. Relationship between neuronal death and cellular redox status, focus on the developing nervous system. **Progress Neurophysiology**, v. 59, p. 397-423, 1999.

CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

CAVALHEIRO, E.A.; LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; TURSKI, W.A., IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, p. 778-782, 1991.

CHANG, C.C. Isolation and structure determination of biologically active compounds from the plant-kingdom. **Dissertation Abstracts International Section B**, v. 43, p. 3567, 1983.

CHAUNHAN, A.K.; DOBHAL, M.P.; JOSHI, B.C. A review of medicinal plants showing anticonvulsant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 11-23, 1988.

CHEYMOL, J. Experimental convulsions and antiepileptic drugs. **Actualites pharmacologiques**, v. 2, p. 1, 1950.

CLAASSEN, J.; LOKIN, J. K.; FITZSIMMONS, B.F.M.; MENDELSON, F.A.; MAYER, S.A. Predictors of functional disability and mortality after status epilepticus. **Neurology**, v. 58, p. 139-142, 2002.

COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.L.; LIMA, T.C.; SANTOS, D.P.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, p. 633-640, 2012.

CUSTÓDIO, J.B.A.; RIBEIRO, M.V.; SILVA, F.S.G.; MACHADO, M.; SOUSA, M.C. The essential oils component p-cymene induces proton leak through Fo-ATP synthase and uncoupling of mitochondrial respiration. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 3, p. 69-76, 2011.

DE LANEROLLE, N.C.; KIM, J.H.; ROBBINS, R.J.; SPENCER, D.D. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. **Brain Research**, v. 495, p. 387-395, 1989.

DE LORENZO, R.J.; HAUSER, W.A.; TOWNSEND, A.R.; BOGGS, J.G., PELLOCK, J.M.; PENBERTHY, L.; GARNETT, L.; FORTNER, C.A.; KO, D. A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. **Neurology**, v. 46, p. 1029-1035, 1996.

DE LORENZO, R.J.; WATERHOUSE, E.J.; TOWNE, A.R.; BOGGS, J.G.; KO, D.; DE LORENZO, G.A.; BROWN, A., GARNETT, L. Persistent nonconvulsive status epilepticus after the control of convulsive status epilepticus. **Epilepsia**, v. 39, p. 833-840, 1998.

EATON, R.W. *p*-Cymene Catabolic Pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and Characterization of DNA Encoding Conversion of *ip*-Cymene to *p*-Cumate. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 3171-3180, 1997.

EENGL, J.J; Update on surgical treatment of the epilepsies: summary of the second international Palm Desert conference on the surgical treatment of the epilepsies. **Neurology**, v. 43, p. 1612-1617, 1993.

FALCONER, M.A; Mesial temporal (Ammon's horn) sclerosis as a common cause of epilepsy. Aetiology, treatment and prevention. **Lancet**, v. 2, p.767-770, 1974.

FALCONER, M.A.; SERAFETINIDES, E.; CORSELLIS, J.A.N. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Archives of Neurology**, v. 10, p. 233-248, 1964.

FALCONER, M.A., TAYLOR, D.C. Surgical treatment of drug resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. **Archives of Neurology**, v. 19, p. 353-361, 1968.

FISHER, R.S.; VAN, E.B.W.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J.J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v.46, p. 470-472, 2005.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 140-144, 2009.

FREITAS, R.M. Antioxidant Treatments: Effect on Behaviour, Histopathological and Oxidative Stress in Epilepsy Model. In: Amit Agrawal; Aleksandar Lazinica. (Org.). **Brain Injury - Pathogenesis, Monitoring, Recovery and Management**, Rijeka: InTech - Open Access Publisher, p. 393-415, 2011.

FREITAS, R.M.; JORDAN, J.; FENG, D. Lipoic acid effects on monoaminergic system after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 477, p. 129-133, 2010.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Acute alterations of neurotransmitters levels in striatum of young rat after pilocarpine-induced status epilepticus. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, p. 430-433, 2003.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry Behaviour**, v. 78, p. 327-332, 2004.

GABY A.R. Natural approaches to epilepsy. **Alternative Medicine Review**, v. 12, p. 9-24, 2007.

GAGE, F.H., OLEJNICZAK, P.; ARMASTRONG, D.M. Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. **Experimental Neurology**, v. 102, p. 2-13, 1998.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 108, p. 1-9, 2006.

GLAUSER, T.; BRN-MENACHEM, E.; BOURGEOIS, B.; CNAAN, A.; CHADWICK, D.; GUERREIRO, C.; KALVIAINEN, R.; MATTSON, R.; PERUCCA, E.; TOMSON, T. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. **Epilepsia**, v. 47, p. 1094-1120, 2006.

GREEN, J.R. Temporal lobectomy, with special reference to selection of epileptic patients. **Journal Neurosurgery**, v. 26, p. 584-593, 1967.

GUIMARES, P.O.; KIM, J.H.; LANEROLLE, N.C.; ROBBINS, R.J.; SPENCER, D.D. A quantitative evaluation of hippocampal neuronal loss in temporal lobe epilepsy without primary glial tumor. **Journal Neuropathology Experimental Neurology**, v. 47, p. 372, 1988.

HÄNER, A.; HÖHENER, P.; ZEYER, J. Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3185-3188, 1995.

HARDER, J.; PROBIAN, C. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3804-3808, 1995.

HARMS, G.; RABUS, R.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon *p*-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 172, p. 303-312, 1999.

JENNER, P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 13, p. 24-34, 1998.

KISKÓ, G.; ROLLER, S. Carvacrol and *p*-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **BioMedCentral Microbiology**, v. 5, p. 36-43, 2005.

KUPFERBERG, H.J.; Strategies for identifying and developing new anticonvulsant drugs. **Pharmacy World & Science**, v. 14, p. 132-138, 1992.

LIEB, J.P.; BABB, T.L.; EENGEL, J. Quantitative comparison of cell loss and thiopental-induced EEG changes in human epileptic hippocampus. **Epilepsia**, v. 30, p. 147-156, 1989.

LOGROSCINO, G.; HESDORFFER, D.C.; CASCINO, G.; ANNEGERS, J.F.; HAUSERM W.A. Time trends in incidence, mortality, and case-fatality after first episode of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 42, p. 1031-1035, 2001.

LOWENSTEIN, D.H.; ALLDREDGE, B.K. Status epilepticus. **New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 970-976, 1998.

LOWENSTEIN, D.H.; BLECK, T.; MCDONALD, R.L. It's time to revise the definition of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 40, p. 120-122, 1999.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: WAGNER, H.; WOLF, P. **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, Berlin: Springer Verlag, 1977, p. 23.

MARGERISON, J.H.; CORSELLIS, J.A.N. Epilepsy and the temporal lobe. **Brain**, v. 89, p. 499-530, 1966.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V.M.S.; VALE, M.R.; VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MEENA, A.K.; PRASAD, V.S.; KAUL, S. Neurological intensive care in India- disease spectrum and outcome. **Neurology India**, v. 48, p. 1-7, 2000.

NANDA, D.; TOLPUTT, J.; COLLARD, K.J. Changes in brain glutathione levels during postnatal development in the rat. **Developmental Brain Research**, v. 94, p. 238-241, 1996.

OLIVEIRA, A.A.; NASCIMENTO, V.S.; FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: cholinergic muscarinic system involvement. **Neuroscience Letters**, v. 385, p. 184-188, 2005.

PASS, G.J.; McLEAN, S.; STUPANS, I.; DAVIES, N.W. Microsomal metabolism and enzyme kinetics of the terpene *p*-cymene in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), koala (*Phascolarctos cinereus*) and rat. **Xenobiotica**, v. 32, p. 383-397, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The brain in stereotaxic coordinates**, New York: Academic Press, 1986.

RUSSO, M.; GALLETTI, G.C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3741, 1998.

SANTOS, I.M.S.; FREITAS, R.L.M.; SILVA, E.P.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; TOMÉ, A.R.; FENG D.; FREITAS, R.M. Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus during pilocarpine-induced seizures. **Brain Research**, v. 1315, p. 33-40, 2010.

SHIVAKUMAR, B.R.; ANANNDATEERTHAVARADA, H.K.; RAVINDRANATH, V. Free radical scavenging system in developing rat brain. **International Journal Developmental Neuroscience**, v. 9, p. 181-185, 1991.

SHORVON, S.D. The management of status epilepticus. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 70, ii22, 2001.

SMITH, P.E.; Oxcarbazepine Advisory Board. Clinical recommendations for oxcarbazepine. **Seizure**, v.10, p. 87, 2001.

SOMMER, W. Erkrankung des Ammonshorns als eatiologisches Moment des Epilepsie. **Archives Psychiatry NervenKrankh**, v. 10, p. 631-675, 1880.

STERIADE, M. **The Intact and Sliced Brain**. The MIT Press, Cambridge, MA, 2001.

KOZA, R.; AYYILDIZ, M.; COSKUN, S.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The influence of ethanol intake and its withdrawal on the anticonvulsant effect of α -tocopherol in the penicillin-induced pileptiform activity in rats. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 463-470, 2007.

TODOROVA, V.K.; HARMS, S.A.; KAUFMAM, Y.; LUO, S.; LUO, K.Q.; BABB, K.; KLIMBERG, V.S. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 88, p. 247-256, 2004.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEIRONK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315-335, 1983.

UMEZU, T.; ITO, H.; NAGANO, K.; YAMAKOSHI, M.; OOUCHI, H.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effect of rose oil and identification of its active constituents. **Life Science**, v. 72, p. 91-102. 2002.

XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2007.

**CAPÍTULO II: Um possível mecanismo de ação para o efeito anticonvulsivante
do *p*-cimeno**

(Artigo submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada)

Um possível mecanismo para o efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno

OLIVEIRA, TM¹; FREITAS, RM¹; DE LIMA, SG^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

O efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno, um monoterpene monocíclico, foi investigado em modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. O *p*-cimeno nas doses de 50, 100 e 150 mg kg⁻¹, foi eficiente em aumentar a latência para primeira crise epilética em $17,83 \pm 0,27$, $25,80 \pm 0,83$ e $31,33 \pm 1,89$, respectivamente. *p*-Cimeno promoveu proteção significativa contra a mortalidade induzida pelo processo convulsivo nas doses de 50 (33,3%), 100 (50%) e 150 (66,7%), respectivamente. Atropina, uma droga de referência de (25 mg kg⁻¹) também produziu uma proteção significativa de 100%. Esse monoterpene também foi capaz de produzir um aumento latência para instalação do estado de mal epilético induzido por pilocarpina nas doses testadas. Além disso, nenhum efeito do *p*-cimeno no modelo de pilocarpina foi bloqueado pelo pré-tratamento com atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos, porém pôde ser observado que os efeitos foram revertidos quando administrado o flumazenil, um antagonista dos receptores benzodiazepínicos. É sugerido que o *p*-cimeno apresente atividade anticonvulsivante por modulação do sistema de neurotransmissão GABAérgico que precisa ser melhor investigado, indicando que este monoterpene possa ter aplicação clínica no tratamento da epilepsia humana.

PALAVRAS-CHAVES: Anticonvulsivantes; Camundongos; *p*-Cimeno; Modelo de Pilocarpina; Monoterpenos; GABA; Benzodiazepínico.

ABSTRACT: A possible mechanism for anticonvulsant effects of *p*-cymene

The anticonvulsant effect of *p*-cymene, a monocyclic monoterpene, was investigated in epilepsy model induced by pilocarpine. *P*-cymene at 50, 100 e 150 mgkg⁻¹ doses was effective in to increase the latency to first epileptic crisis in 17.83 ± 0.27 , 25.80 ± 0.83 and 31.33 ± 1.89 , respectively. *p*-Cymene promoted significant protection against mortality induced by convulsive process at 50 (33,3%), 100 (50%) e 150 (66,7%) doses, respectively. Atropine, a reference drug (25 mgkg⁻¹), also produced a significant protection of 100%. This monoterpene was also able to produce a latency increase for installation of epilepticus status induced by pilocarpine in tested doses. Furthermore, no *p*-cymene effect in pilocarpine model was blocked by pretreatment with atropine, a muscarinic antagonist, but it can be seen that effects were reversed when administered the flumazenil, a benzodiazepine antagonist. We suggest that *p*-cymene present anticonvulsant activity by modulation of GABAergic neurotransmitter system that need to be more investigated, indicating that this monoterpene may to have clinical application in human epilepsy treatment.

KEYWORDS: Anticonvulsants; Mice; *p*-Cymene; Pilocarpine Model; Monoterpenes; GABA; Benzodiazepine.

INTRODUÇÃO

Epilepsia é o distúrbio mais comum após o acidente vascular cerebral, com prevalência de 0,5% (BROWNE; HOLMES, 2001). Epilepsias são complexos distúrbios neurológicos comportamentais resultantes de um aumento da excitabilidade de neurónios colinérgicos em várias regiões do cérebro que podem ser difundidas por vários neurotransmissores (RAUCA et al., 2004). O estado de mal epiléptico (EME) é uma situação de emergência menos apreciada e com morbidade e mortalidade substancial que requer tratamento imediato e eficaz (KNAKE et al., 2009).

O modelo experimental largamente utilizado para estudar a fisiopatologia das crises epilépticas e a identificação dos potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia é uma administração aguda de dose elevada de pilocarpina em roedores. Os sistemas de neurotransmissão envolvidos no modelo experimental de epilepsia induzido pela pilocarpina, ainda não estão completamente definidos. Os diferentes modelos de convulsão em animais são bastante utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduz alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos (FREITAS, 2011).

Por outro lado, aproximadamente 70% dos pacientes com epilepsia são bem controlados por monoterapia com drogas antiepiléticas disponíveis no momento. Outros 5-10% dos pacientes são estabilizados pela adição de outra droga antiepilética, mas permanece mais de 20% dos pacientes cujas crises epilépticas não são controladas. Portanto, fitomedicamentos podem potencialmente desempenhar uma papel importante no desenvolvimento de novas drogas antiepiléticas aos pacientes farmacoresistentes (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008). Desta forma estudos anteriores utilizando alguns monoterpenos como citronelol (DE SOUSA et al., 2006), α,β -epóxi-carvona (DE SOUSA et al., 2007a), α -terpineol (DE SOUSA et al., 2007b), e isopulegol (SILVA et al., 2009), presente em alguns óleos essenciais, possuem atividade anticonvulsivante em estudos realizados em animais. O *p*-cimeno definido como 1-metil-4-isopropilbenzeno (Ilustração I) é um monoterpeno aromático biosintético de fórmula molecular $C_{10}H_{14}$, precursor do carvacrol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo o constituinte majoritário em várias espécies vegetais como em *Origanum saccatum* 83,75%, *Origanum solymicum* 53,07% e *Thymus vulgaris* 44,13% (POULOSE; CROTEAU, 1978; ADAMS, 2007). Além disso, o *p*-cimeno vem sendo alvo de estudos em outros trabalhos como atividade antinociceptiva (SANTANA et al., 2011), antibacteriana (BAGAMBOULA et al., 2004), antifúngica,

herbicida (KODALI et al., 2008), antileishmania (DE MEDEIROS et al, 2011) e ação na anticolinesterase (ÖZTÜRK, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticonvulsivante do p-cimeno e investigar o possível mecanismo de ação caracterizar seu mecanismo de ação em modelo de convulsão em camundongos induzido por pilocarpina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, adultos com 2 meses de idade, com peso variando entre 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (**Ilustração 1**). Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C), recebendo ração padrão do tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (nº 038/2009).

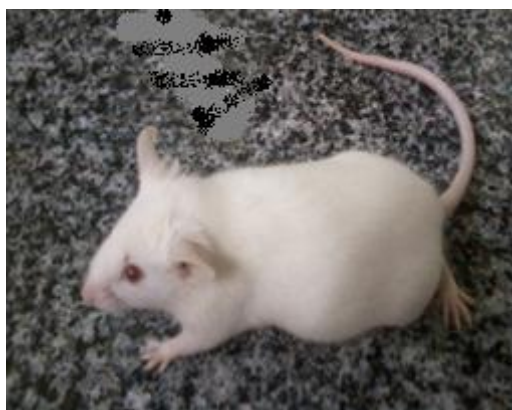


Ilustração 1- Camundongo *Swiss* macho.

Fonte: Arquivo Pessoal

Drogas Administradas

As drogas utilizadas nesse trabalho, cloridrato de pilocarpina, *p*-cimeno, atropina, flumazenil e o monooleato de polioxietileno-sorbitan (Tween 80) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. St. Louis., (USA) e o Diazepam da Cristália (Brasil). Todos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) dissolvidas em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% em um volume final de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal.

Procedimento Experimental

Os animais com peso variando entre 25–30 g foram divididos em 5 grupos (n=12 por grupo). O primeiro grupo foi usado como controle e recebeu o veículo (Tween 80% 0,05% dissolvido em uma solução salina de 0,9%), o segundo grupo foi tratado com cloridrato de pilocarpina 400 mg kg (P400) via intraperitoneal, os demais foram tratados com *p*-cimeno (CIM) nas doses de 50, 100 e 150 mg kg⁻¹, trinta minutos após administração das drogas os camundongos foram tratados com pilocarpina 400 mg kg⁻¹ (i.p) e observados quanto ao comportamento como os movimentos estereotipados, movimentos tônico e clônico, crise epilética tônico-clônico, o período de latência para primeira crise convulsiva, latência para desenvolvimento de mal epilético e a taxa de sobrevivência dos animais (FREITAS, 2009).

Em outra etapa de experimento, no primeiro grupo após 30 minutos após a administração com veículo foi administrado pilocarpina, no segundo após administração de *p*-cimeno 150 mg kg⁻¹ foi feita administração de pilocarpina, no terceiro após atropina 25 mg kg⁻¹ 30 min foi administrado a pilocarpina. No quarto e quinto foi administrado atropina 25 mg kg e depois de 15 min injetado *p*-cimeno 150 mg kg, sendo que no quinto grupo após 30 min foi administrado a pilocarpina P400 nos animais (n=12). Todos foram observados durante 1 hora para detectar a latência de instalação da crise epilética (LIPC), latência de estado de mal epilético (LDEP), ocorrência de crise epilética e o número de animais sobreviventes após a administração de pilocarpina. Atropina 25 mg kg⁻¹, *p*-cimeno 150 mg kg⁻¹ e Atropina 25 mg kg⁻¹ + *p*-cimeno 150 mg kg⁻¹ foram utilizadas como droga de referência.

Em outra série de experimentos, com 5 grupo com 12 animais cada, o primeiro grupo foi tratado com diazepam 5 mg kg⁻¹ (DZP), o segundo grupo foi tratado com diazepam 5 mg kg⁻¹ (DZP) e 30 minutos após foi feito tratamento com pilocarpina 400 mg, no terceiro grupo foi administrado o flumazenil 25 mg kg⁻¹ (FLU) e depois de 30 min a pilocarpina 400 mg. No quarto e quinto grupo foi administrado flumazenil 25 mg kg⁻¹ sendo que no quarto após 15 min administrou-se diazepam 5 mg kg⁻¹ e após 30 min tratou com pilocarpina 400 mg e no

quinto após os 15 min administrou o *p*-cimeno 150 mg kg⁻¹ e após 30 min a pilocarpina 400 mg . Os animais foram observados durante 1 h para detectar a LIPC, LDEP, a ocorrência de crises epiléticas, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que morreram após a administração de pilocarpina. Diazepam (5 mgkg⁻¹) e flumazenil (25 mgkg⁻¹) foram utilizados como drogas de referência.

O flumazenil foi administrado em dois grupos de camundongos cada, 15 minutos antes dos tratamentos com diazepam ou *p*-cimeno 150 mgkg⁻¹. Após 30 minutos do último tratamento foi administrado a pilocarpina. Os parâmetros observados foram o LIPC, LDEP, o número de animais que apresentaram crises epiléticas e determinar a taxa de sobrevivência.

Os animais tratados e os controles foram divididos em gaiolas contendo no máximo 6 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. As drogas foram todas administradas por via intraperitoneal (i.p.). Todos os grupos experimentais foram observados após a administração das drogas, perfazendo um total de 1 h e 24 h de observação; Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, tremores, movimentos estereotipados, latência da primeira crise epilética, crise epilética motora que progrediram para o estado de mal epilético, latência do estado de mal epilético e o número de animais que morreram em cada grupo (TURSKI et al., 1983) .

Análises Estatísticas

Os dados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc* (p<0,05). O número de animais que apresentaram crises convulsivas e o número de sobreviventes foi calculado como porcentagens (porcentagem de crises epiléticas, porcentagem de estado de mal epilético e a taxa porcentagem de sobrevivência, respectivamente) e comparados com um teste não paramétrico (χ^2).

RESULTADOS

No presente trabalho foi verificado no grupo tratado somente com a pilocarpina 400 mg que induziu a primeira crise epilética em $7,83 \pm 0,23$ min. Durante os primeiros 3 a 5 minutos após administração de pilocarpina foi observado alterações de comportamento, como sinais periféricos colinérgicos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarréia e movimentos orofaríngeos), movimentos estereotipados (roer, coçar, mastigar) seguidos de crises epiléticas

tônico-clônico e desenvolvimento progressivo dentro de minutos em um estado de mal epilético em 100% dos animais estudados ($p < 0,001$) (**Tabela 1**). Com os animais pré-tratados com *p*-cimeno em doses de 50, 100 e 150 mg kg^{-1} resultaram em alterações comportamentais como sinais colinérgicos periféricos, tremores, cromodaciorréia, automatismo faciais, *wet dog shakes* e espirrar em 100% dos camundongos.

O efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno demonstraram um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo no tempo de latência das crises epiléticas induzidas por pilocarpina nas doses de 50 ($17,83 \pm 0,27$), 100 ($25,80 \pm 0,83$) e 150 mg kg^{-1} ($31,33 \pm 1,89$) em comparação com o grupo P400 ($7,83 \pm 0,27$). Além disso, com o pré-tratamento se observou o aumento em relação no tempo de latência para o desenvolvimento do estado de mal epilético nos animais após as doses de 50 ($25,50 \pm 0,42$), 100 ($31,33 \pm 1,24$) e 150 ($35,92 \pm 1,81$) em comparação com o P400 ($15,00 \pm 0,42$). O efeito de neuroproteção também foi observado em relação à taxa de sobrevivência com as drogas atropina (25 mg kg^{-1}) e diazepam (5 mg kg^{-1}) utilizadas como drogas de referência (**Tabela 1 e 2**).

Tabela 1. Efeito de pré-tratamento com *p*-cimeno nas alterações comportamentais de camundongos adultos durante crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupos	CE (%)	LIPC (min)	E.M.E. (%)	LDEP (min)	TS (%)
P400	100	$7,83 \pm 0,27$	100	$15,00 \pm 0,42$	0
CIM 50	0	0	0	0	100
CIM 100	0	0	0	0	100
CIM 150	0	0	0	0	100
CIM 50 + P400	100	$17,83 \pm 0,27^a$	100	$25,50 \pm 0,42^a$	$33,33^d$
CIM 100 + P400	100	$25,80 \pm 0,83^{ab}$	100	$31,33 \pm 1,24^a$	50^d
CIM 150 + P400	100	$31,33 \pm 1,89^{abc}$	100	$35,92 \pm 1,81^{ab}$	$66,67^{de}$
ATR 25	0	0	0	0	100
ATR 25 + P400	0	0	0	0	100
ATR 25 + CIM150	0	0	0	0	100
ATR 25 + CIM150 + P400	0	0	0	0	100

Determinação de crise epilética (CE), estado de mal epilético (E.M.E.), latência de instalação de primeira crise epilética (LIPC), latência para desenvolvimento de estado de mal epilético (LDEP) e taxa de sobrevivência (TS). Os resultados de LIPC e LDEP estão expressos em minutos (min) com média \pm E.P.M. e os demais como porcentagem. ^a $p < 0,05$ em comparação ao grupo P400; ^b $p < 0,05$ em comparação ao grupo CIM 50 + P400; ^c $p < 0,05$ em comparação ao grupo CIM 100 + P400. ANOVA e teste de Student Newman Keuls como *post hoc* teste.

^dp<0,05 em comparação ao grupo P400; ^ep<0,05 em comparação ao grupo CIM 50 + P400. Teste do Qui-quadrado.

Foi observado que com a utilização de atropina nos animais com crise epilética induzida por pilocarpina não houve nenhuma alteração no comportamento, nem mesmo quando concomitante ao *p*-cimeno, entretanto o composto provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência com as doses de 50 (33,33%), 100 (50%) e 150 mg kg (66,67%) (**Tabela 1**).

A dose de 150 mg kg⁻¹ foi escolhida para análise do mecanismo de ação, uma vez que demonstrou um maior aumento no tempo de latência para instalação da primeira crise epilética e estado de mal epilético. Além disso, produziu um aumento em relação à taxa de sobrevivência, quando comparado ao grupo tratado somente com pilocarpina (p<0,05) (**Tabela 1**).

O efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno é superior ao Diazepam nas doses escolhidas de cada (**Tabela 2**). Por outro lado, a fim de determinar se o efeitos anticonvulsivante do *p*-cimeno é exercidos por meio do sistema GABAérgico, os camundongos tratados com *p*-cimeno foram submetidos ao tratamento com flumazenil, um antagonista do receptor benzodiazepínico, apresentando um comportamento semelhante entre os camundongos tratados com diazepam e o *p*-cimeno (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito de pré-tratamento com *p*-cimeno nas alterações comportamentais de camundongos adultos durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupos	CE (%)	LIPC (min)	E.M.E (%)	LDEP (min)	TS (%)
P400	100	7,83 ±0,27	100	15,00 ±0,42	0
CIM 150 + P400	100	31,33 ±1,89 ^a	100	35,92 ±1,81 ^a	66,67 ^c
DZP 5	0	0	0	0	100
DZP 5 + P400	100	10,00 ±0,54 ^b	100	18,83 ±0,81 ^b	25 ^d
FLU 25	0	0	0	0	100
FLU 25 + DZP 5+ P400	100	8,25 ±0,27 ^b	100	16,42 ±0,67 ^b	0 ^d
FLU 25 + CIM 150 + P400	100	7,75 ±0,30 ^b	100	16,08 ±0,74 ^b	16,67 ^d

Determinação de crise epilética (CE), estado de mal epilético (E.M.E), latência de instalação da primeira crise epilética (LIPC), latência para o desenvolvimento de estado de mal epilético (LDEP) e taxa de sobrevivência (TS). Os resultados de LDEP e LDEP estão expressos em minutos (min) com média ± E.P.M.e os demais como porcentagem. ^ap<0,05 em comparação ao grupo P400; ^bp<0,05 em comparação ao grupo CIM 150 + P400. ANOVA e teste de

Student Newman Keuls como *post hoc* teste. ^c $p < 0,05$ em comparação ao grupo P400; ^d $p < 0,05$ em comparação ao grupo CIM 150 + P400. Teste do Qui-quadrado.

DISCUSSÃO

As crises epiléticas decorrente do tratamento com pilocarpina, em doses convulsivas, parecem depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinosítídeos e é capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais. A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico e pode produzir alterações em outros sistemas de neurotransmissores [noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), glutamato e ácido γ -amino-butírico (GABA)], embora pouco se saiba sobre essas alterações (FREITAS, 2011). A injeção subcutânea de pilocarpina (400 mg/kg) produz uma sequência de alterações comportamentais incluindo sinais colinérgicos periféricos, tremores, *staring spell*, automatismo facial, crises epiléticas límbicas, que se desenvolvem progressivamente dentro de 1-2h em estado de mal epilético (TURSKI et al., 1983; FREITAS et al., 2003).

No presente trabalho, o mecanismo da ação anticonvulsivante do *p*-cimeno foi estudados. O pré-tratamento com *p*-cimeno, em doses de 50, 100 ou 150 mg kg⁻¹ não foi capaz de reverter os sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados. Entretanto o composto provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência.

Drogas que atuam sobre o sistema nervoso central podem demonstrar a capacidade de modular as crises epiléticas atenuando e/ou potencializando o estado de mal epilético induzido pela pilocarpina (FREITAS, 2011). Estes resultados dos efeitos anticonvulsivantes do *p*-cimeno demonstraram um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo no tempo de latência das crises epiléticas e para o desenvolvimento do estado de mal epilético induzidas por pilocarpina nos animais em relação à taxa de sobrevivência com as drogas atropina e diazepam utilizadas como droga de referência.

Atropina é um antagonista do receptor muscarínico. As crises epiléticas induzidas pela pilocarpina podem ser bloqueadas por tratamento prévio com atropina, demonstrando o envolvimento do sistema colinérgico em crises epiléticas e estado de mal epilético (BARAK; DUDAI, 1979). Sendo utilizada para avaliar o possível mecanismo de ação anticonvulsivante do *p*-cimeno. A não alteração do comportamento na crise epilética mesmo

concomitante ao *p*-cimeno, serve como indicativo da ausência de efeito anticonvulsivante pelos receptores colinérgicos muscarínicos.

O processo convulsivo decorrente do tratamento de camundongos com pilocarpina, parece interagir com o sistema GABAérgico, uma vez que a ativação do receptor GABAérgico pode estar diminuída em decorrência do aumento da concentração do cálcio intracelular induzida pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que pode ser essencial para a instalação e propagação da atividade epilética (RANG et al., 2007). A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor do sistema GABAérgico. Associado às crises epiléticas induzidas por pilocarpina, ocorre o aumento na concentração do GABA após o estado de mal epilético e uma diminuição após 24 h da fase aguda das crises epiléticas (FREITAS, 2011). Os benzodiazepínicos como diazepam e o clonazepam não interferem na incidência de nenhum dos parâmetros comportamentais observados em camundongos, sugerindo que o sistema GABAérgico não interage nos efeitos periféricos mediados pela pilocarpina. Por sua vez, o diazepam demonstrou bastante eficácia na redução do número de animais que convulsionam e que evoluem para o estado de mal epilético e diminuiu também a taxa de mortalidade, também aumentou a LDEP e a LIPC. Característica essa também encontrada de forma semelhante entre os animais tratados com *p*-cimeno. Reforçando a hipótese sobre o possível mecanismo de ação do *p*-cimeno que pode estar relacionada diretamente com o sistema GABAérgico.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o *p*-cimeno aumentou o tempo de latência para primeira crise epilética e estado de mal epilético, e a taxa de sobrevivência nos animais, confirmando seu potencial antiepilético e neuroprotetor durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina, provavelmente pelo sistema GABAérgico. Além disso, tais achados podem ser importantes nas perspectivas de busca e desenvolvimento de novos agentes antiepiléticos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P.; Identifation of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois: **Allured Publishing**, p.141, 2007.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 33–42, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARAK, J.B.; DUDAI, Y. Cholinergic binding sites in rat hippocampal formations: properties and ontogenis. **Brain Research**, v. 166, p. 247–257, 1979.

BROWNE, T.R.; HOLMES, G.L. Epilepsy. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 15, p. 1145-1451, 2001.

DE MEDEIROS, M.G.F.; DA SILVA, A.C.; CITO, A.M.G.L.; BORGES, A.R.; DE LIMA, S.G.; LOPES, J.A.D.; FIQUEIREDO, R.C.B.Q. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology**, v. 60, p. 237-41, 2011.

DE SOUSA D.P.; GONÇALVES J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ J.S.; ARAÚJO D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.

DE SOUSA, D.P.; NOBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α - β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007a.

DE SOUSA, D.P.; QUINTANS, J.L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the Anticonvulsant Activity of alfa-Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 69-70, 2007b.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 140-144, 2009.

FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma revisão de Literatura. **Revista Neurociência**, v.19, p.128-138, 2011.

KNAKE, S.; HAMER, H.M.; ROSENOW, F. Status epilepticus: A critical review. **Epilepsy & Behavior**, v. 15, p. 10-14, 2009.

KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; ÖZER, H.; ÇAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E.; Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8788–8795, 2008.

ÖZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**, v. 134, p. 48–54, 2012.

PASINI, A.; TORTORELLA, A.; GALE, K. Anticonvulsant effect of intranigral fluoxetine. **Brain Research**, v. 593, p. 287-290, 1992.

POULOUSE, A.J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes Conversion of γ -Terpinene to *p*-Cymene and Thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.187, n. 2 p. 307-314, 1978.

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsant properties – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K; Farmacologia. 7^a. ed. Elsevier, Rio de Janeiro. **Elsevier**, p. 263, 2007.

RAUCA, C.; WISWEDEL,I; ZERBE,R; KEILHOFF,G; KRUG,M. The role of superoxide dismutase and α -tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylenetetrazol - influence of the radical scavenger α -phenyl-N-tert-butyl nitron. **Brain Research**, v. 1009, p. 203–212, 2004.

SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G.B.; GUMIRÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S. SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S; BONJARDIM, L.R. *p*-cymene redices orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, p. 1138-1143, 2011.

SILVA, M.I.; SILVA, M.A.; AQUINO NETO, M.R.; MOURA, B.A.; SOUSA, H.L.; LAVOR, E.P.; VASCONCELOS, P.F.; MACÊDO, D.S.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINRONK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315–336, 1983.

CAPÍTULO III: Avaliação antioxidante de um monoterpeno cíclico de origem natural

(Artigo submetido em Journal Current Bioactive Compounds)

Avaliação antioxidante de um monoterpene cíclico de origem natural

OLIVEIRA, TM¹, CARVALHO, RBF^{1,2}, FREITAS, RM^{1,*}, DE LIMA SG^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

O *p*-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno; CIM) é um monoterpene cíclico, de fórmula molecular C₁₀H₁₄. Neste trabalho foi realizada a avaliação do potencial antioxidante do *p*-cimeno em hipocampo de camundongos adultos por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de nitrito e atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Camundongos *Swiss* foram tratados com Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; i.p., grupo controle), ácido ascórbico 250 mg kg⁻¹ (i.p., grupo controle positivo, AA 250) e com *p*-cimeno nas doses de 50, 100 e 150 mg kg⁻¹, (i.p., grupos CIM 50, 100 e 150), respectivamente. Após 24h da administração os grupos foram eutanasiados com pertobarbital sódico (50mg kg⁻¹; i.p) para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo. O tratamento com *p*-cimeno reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante *in vivo* uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Além disso, o *p*-cimeno aumentou a atividade das enzimas CAT e SOD, no hipocampo de camundongos, sugerindo que seu papel antioxidante pode ser devido à modulação positiva da atividade dessas enzimas. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que o *p*-cimeno, apresenta potencial antioxidante *in vivo* e pode atuar como um agente neuroprotetor cerebral. Esse composto pode constituir uma nova estratégia no desenvolvimento de tratamentos para diversas patologias nas quais o estresse oxidativo desempenha um papel importante em sua fisiopatologia.

PALAVRAS-CHAVES: Catalase; Monoterpenos; *p*-Cimeno; Nitrito; Peroxidação lipídica; Superóxido dismutase.

ABSTRACT

The *p*-cymene (1-methyl-4-isopropylbenzene; CYM) is a cyclic monoterpene, molecular formula C₁₀H₁₄. In this study, we performed the evaluation of *p*-cymene antioxidant potential in hippocampus of adult mice by the levels determination of acidic substances reactives with thiobarbituric acid (TBARS), nitrite content and activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes. *Swiss* mice were treated with Tween 80 0,05% solubilized in saline solution 0,9% (vehicle; i.p., control group), ascorbic acid 250 mg kg⁻¹ (i.p., positive control group, AA 250) and *p*-cymene at 50, 100 e 150 mg kg⁻¹ doses, (i.p., CYM 50, 100 and 150 groups), respectively. After 24h treatments the groups were euthanized with sodium pentobarbital (50mg kg⁻¹; i.p) to brain remotion and hippocampal dissection. The *p*-cymene treatment reduced significantly the lipidic peroxidation level and nitrite content, suggesting an *in vivo* antioxidant role once was able to reduce the formation of reactive species derived from oxygen and nitrogen. Furthermore, *p*-cymene increased the enzyme activity of CAT and SOD in mice hippocampus, suggesting that its antioxidant role may to be due the positive modulation of enzymes activity. Therefore, the results of this study show that *p*-cymene present *in vivo* antioxidant potential and may to act as a brain neuroprotect agent. This compound may to be a new strategy in the development of treatments for several diseases in which oxidative stress plays an important role in their physiopathology.

KEYWORDS: Catalase; Monoterpens; *p*-Cymene; Nitrite; Lipid Peroxidation; Superoxide dismutase.

INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização humana as plantas têm sido utilizadas com fins medicinais, para tratamento, prevenção e cura de diversas doenças (MENGUES; MENTZ; SCHENKEL, 2011; CAMPELO et al., 2011a). No Brasil, devido a sua extensa diversidade genética vegetal, com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (DIAS, 1996; RODRIGUES, 2008) e uma privilegiada situação geográfica, existem diversos estudos com substâncias naturais derivadas de plantas para o tratamento de inúmeras patologias (CAMPELO et al., 2011b; ALMEIDA et al., 2012). Dentre essas patologias merece atenção especial a investigação do potencial antioxidante *in vitro* (COSTA JÚNIOR et al, 2011; MARQUES et al., 2012) e *in vivo* (COSTA, 2012), uma vez que o estresse oxidativo pode responder pela fisiopatologia de diversas doenças (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Nesse contexto, durante o processo celular de obtenção de energia podem ser gerados compostos chamados espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS) que, em demasia, podem causar danos celulares, culminado em um processo denominado de estresse oxidativo. Tal processo resulta no desequilíbrio no estado de óxido-redução a favor da oxidação.

Nesse sentido, podemos citar as enzimas superóxido dismutase (SOD), juntamente com catalase e glutathione peroxidase promovem a desintoxicação dos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente (WICKENS, 2001). Dos mecanismos de defesa antioxidante, participam enzimas endógenas e algumas vitaminas e minerais (SIQUEIRA-CATANIA et al., 2009).

Agentes antioxidantes podem diminuir ou prevenir os danos oxidativos nos tecidos humanos produzidos por EROS e espécies reativas derivados de nitrogênio (ERNS). Dessa forma, pode ser definido como um grupo diverso de moléculas naturais, que pode estar presente em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas com ação antioxidante (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 1991).

Diversos estudos demonstram atividade antioxidante dos monoterpenos, α -terpineol (BICAS, 2011), α -tujona (MOTHANA et al., 2011), 1,8-cineol, α -pineno (WANNES et al., 2010), γ -terpineno (RUBERTO; BARATTA, 2000), R(+)- α -pineno, S(-)- β -pineno, α -pineno (mistura racêmica), α -terpineno, linalol e limoneno (APEL et al., 2001; 2008).

Entre os monoterpenos, podemos destacar o *p*-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno), monoterpeno precursor biológico de carvacrol e um dos principais constituintes do óleo essencial a partir de espécies de *Protium*, com mais de 80% das espécies encontradas na

região Amazônica (SIANI et al., 1999; SANTANA et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que espécies rica em *p*-cimeno, como *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, *P. kleinii* Cuatrec., Burseraceae, *Hyptis pectinata* (L.) Poit., Lamiaceae and *Zataria multiflora* Boiss., Lamiaceae, mostram atividade antinociceptiva em roedores (SANTANA et al., 2011; RAMEZANI et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante do *p*-cimeno em hipocampo de camundongos adultos tratados de forma aguda por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de nitrito e da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

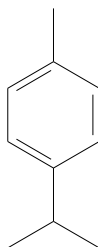


Ilustração 1. Estrutura química do *p*-cimeno (1-metil-4-isopropil-benzeno).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, adultos com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. As unidades experimentais receberam água e ração padrão tipo Purina *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h 6h claro/ 18h escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, do Departamento dos EUA de Saúde e Serviços Humanos, Washington DC, 1985. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 013/2011 CEEA/UFPI).

Tratamento dos grupos experimentais

O *p*-cimeno foi emulsionado com Tween 80 (0,05%) (Sigma-EUA) e dissolvido em solução salina 0,9%. Os 35 animais foram divididos em cinco grupos experimentais. O primeiro grupo foi tratado com veículo 0,01 ml/g (Tween 80 0,05% com salina 0,9%, i.p., grupo controle negativo; n=7). O segundo grupo recebeu ácido ascórbico na dose de 250 mgkg⁻¹ (controle positivo, i.p., grupo AA 250; n=7). E os outros três grupos foram tratados com *p*-cimeno (50 e 100, 150 mgkg⁻¹, i.p.; grupos CIM 50, CIM 100 e CIM 150, respectivamente; n=7).

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo no máximo 6 animais e colocados em ambiente reservado, com observação direta durante 24 horas para visualização e registro de possíveis sinais de toxicidade do composto. Após a avaliação dos parâmetros relacionados à toxicidade aguda durante o período de observação, os animais foram submetidos à eutanásia pela administração de pentobarbital sódico (40 mg kg⁻¹; i.p) para remoção do cérebro e dissecação do hipocampo de ambos os lados para os estudos neuroquímicos: determinação dos níveis de TBARS, conteúdo de nitrito e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Métodos para determinação dos conteúdos de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de peroxidação lipídica foi mensurado por meio da determinação dos níveis de TBARS, método previamente descrito por Draper e Hadley (1990). Foi preparado o homogenato a 10% (w/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 com as áreas hipocampais de todos os grupos, veículo (n=7), AA 250 (n=7) e CIM 50, 100 e 150 (n=7). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

Método da determinação do conteúdo de nitrito e da atividade da Catalase (CAT)

O conteúdo de nitrito nos grupos experimentais, veículo (n=7), AA 250 (n=7) e CIM 50, 100 e 150 (n=7), foram determinados com base na reação de Griess (GREEN et al., 1981). Os resultados foram expressos em mM. A atividade da CAT foi medida nos grupos experimentais, veículo (n=7), AA 250 (n=7) e CIM 50, 100 e 150 (n=7), utilizando o princípio básico da medida da velocidade de produção de O₂ e H₂O (CHANCE; MAEHLI, 1954). A concentração de proteínas foi determinada (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína (CHANCE; MAEHLI, 1954).

Método da determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Os homogenatos hipocampais 10% foram centrifugados ($800 \times g$, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para determinar a atividade de superóxido dismutase (SOD). Atividade da SOD nos grupos veículo (n=7), AA 250 (n=7) e CIM 50, 100 e 150 (n=7) foi investigada por meio da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina - xantina oxidase como fonte geradora de ânion superóxido (O_2^-) (ARTHUR; BOYNE, 1985). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da atividade da SOD corresponde à inibição de 50% da reação do O_2^- com o Citocromo C. A concentração de proteínas nos homogenatos foi obtida pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), os grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo e com o controle positivo (ácido ascórbico). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos tratados com *p*-cimeno de forma aguda.

Na **ilustração 2** foram apresentados os resultados dos efeitos do tratamento com *p*-cimeno na peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos adultos. No grupo AA ($0,39 \pm 0,28$) foi verificado uma diminuição significativa de 50,77% na peroxidação lipídica em relação ao veículo ($1,24 \pm 0,03$) no hipocampo de camundongos adultos. Por sua vez, o tratamento com *p*-cimeno na dose de 50 mg kg^{-1} ($0,42 \pm 0,03$), produziu uma redução significativa de 65,54% na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle. No entanto, não foi verificada nenhuma alteração significativa em relação ao grupo tratado com AA 250. Também foi

detectada uma redução significativa no grupo tratado *p*-cimeno na dose de 100 mg kg⁻¹ (0,33 ± 0,01) em comparação aos valores do grupo veículo (73,29%), AA 250 (16,57%) e CIM 50 (22,49%). No grupo que recebeu a dose de 150 mg kg⁻¹ (0,12 ± 0,01) foi observado uma diminuição significativa em relação ao grupo veículo (89,83%), AC 250 (68,26%), CIM 50 (70,5%) e CIM 100 (61,95%), respectivamente.

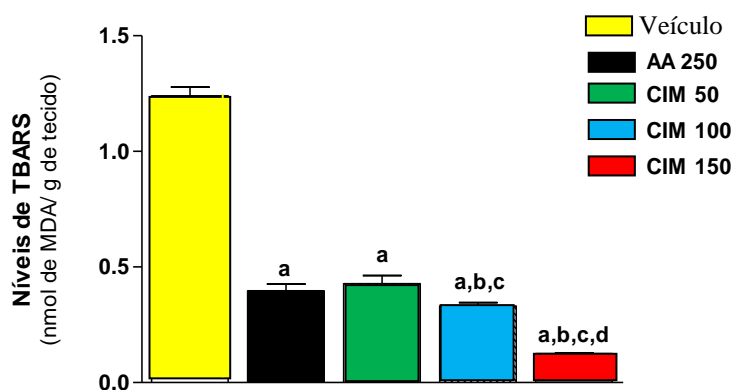


Ilustração 2. Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos tratados com *p*-cimeno de forma aguda.

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,05, quando comparados ao grupo veículo; ^bp<0,05, quando comparados ao grupo AA 250; ^cp<0,05, quando comparados ao grupo CIM 50; ^dp<0,05, quando comparados ao grupo CIM 100 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como teste *post hoc*).

Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos tratados com *p*-cimeno de forma aguda

Na **Ilustração 3** foram apresentados os resultados dos efeitos do *p*-cimeno no conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos adultos. No grupo AA 250 (53,2 ± 1,88) foi verificado uma diminuição significativa de 32,73% no conteúdo de nitrito em relação ao grupo veículo (79,1 ± 1,88) no hipocampo de camundongos adultos.

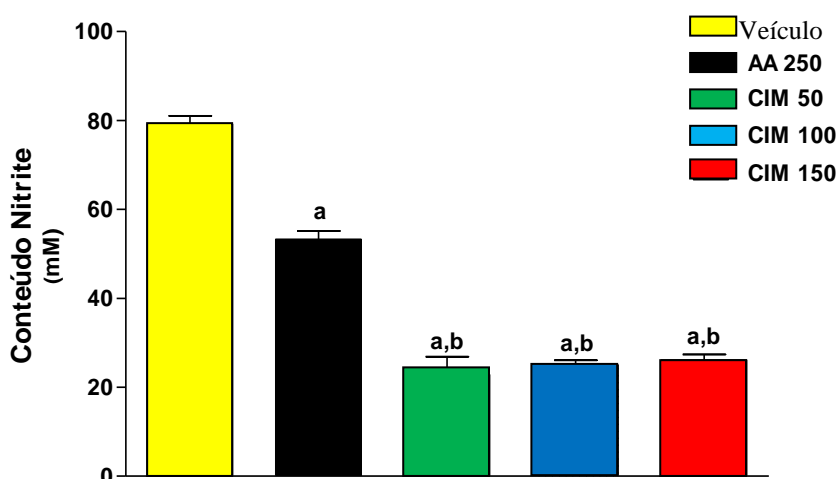


Ilustração 3. Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos tratados com *p*-cimeno de forma aguda.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,05, quando comparados ao grupo veículo; ^bp<0,05, quando comparados ao grupo AA 250; ^cp<0,05, quando comparados ao grupo CIM 50; ^dp<0,05, quando comparados ao grupo CIM 100 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como teste *post hoc*).

Por sua vez, o tratamento com *p*-cimeno na dose de 50 mg kg⁻¹ (22,79 \pm 1,29), produziu uma redução significativa de 71,21% quando comparado ao grupo veículo e 57,20% ao grupo AA 250. Também foi detectada uma redução significativa no grupo tratado *p*-cimeno na dose de 100 mgkg⁻¹ (25,01 \pm 1,04) em comparação aos valores do grupo veículo (68,61%) e AA 250 (53,03%). No grupo que recebeu a dose de 150 mgkg⁻¹ (26,12 \pm 1,22) foi observado uma diminuição significativa em relação ao grupo veículo (67%) e AA 250 (50,94%).

Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos tratados com p-cimeno de forma aguda

Os resultados apresentados na **ilustração 4** demonstram que o *p*-cimeno nas concentrações testadas foi capaz de aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de maneira significativa em relação ao grupo tratado com o veículo (2,28 \pm 0,14) [CIM 50: 22,7% (2,81 \pm 0,07); CIM 100: 33,9% (3,09 \pm 0,04); CIM 150: 63,1% (3,73 \pm 0,10)]. Por sua vez, houve um aumento significativo da SOD em todas as concentrações testadas [CIM

50: 22,4% ($2,81 \pm 0,07$); CIM 100: 34,60% ($3,08 \pm 0,04$); CIM 150: 62,70% ($3,73 \pm 0,10$)] em relação ao grupo AA 250 ($2,29 \pm 0,14$).

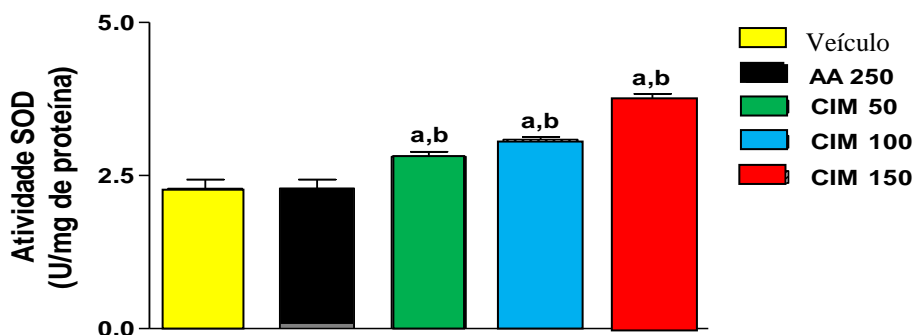


Ilustração 4. Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos tratados com *p*-cimeno de forma aguda.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos ($n=7$ por grupo). ^a $p<0,05$, quando comparados ao grupo veículo; ^b $p<0,05$, quando comparados ao grupo AA 250 (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como teste *post hoc*).

Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos tratados com p-cimeno de forma aguda

Na **Ilustração 5** foram apresentados o efeito do tratamento com *p*-cimeno na atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos adultos. Os resultados obtidos mostraram que em todas as doses testadas (50, 100 e 150 mg kg⁻¹), o *p*-cimeno produz um aumento da atividade da enzima catalase em relação ao grupo tratado com veículo ($13,87 \pm 0,55$) [CIM 50: 119,25% ($30,41 \pm 1,72$); CIM 100: 151,83% ($34,93 \pm 1,72$); 150: 182,70% ($39,21 \pm 0,35$).

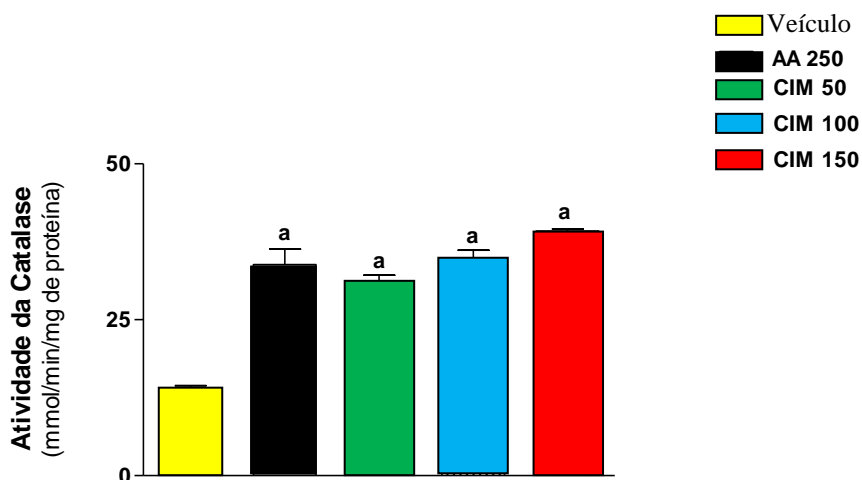


Ilustração 5. Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos tratados com *p*-cimeno de forma aguda.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais utilizados nos experimentos (n=7 por grupo). ^ap<0,05, quando comparados ao grupo veículo (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como teste *post hoc*).

DISCUSSÃO

A oxidação é um processo metabólico que conduz à produção de energia necessária para atividades essenciais das células. Porém, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também conduz à produção de radicais (STIEVEN et al., 2009; XAVIER et al., 2007). Antioxidantes que possam sequestrar esses radicais livres apresentam elevado potencial terapêutico em doenças associadas (SILVA et al., 2006). Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (SILVA, 2006).

O cérebro produz continuamente EROs (CAMPÊLO, 2011; CASTAGNE et al., 1999), na ausência de um mecanismo de defesa eficiente, estes EROS causam a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana (CAMPÊLO, 2011; HALLIWELL; CHIRICO, 1993). O cérebro é particularmente suscetível à peroxidação devido à presença simultânea de altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e de ferro (CAMPÊLO, 2011; CASTAGNE, 1999), que é o alvo de danos dos radicais livres.

Diversos métodos são descritos na literatura para avaliação da peroxidação lipídica, como a determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é usado

para quantificar a peroxidação lipídica que corresponde a um dano na membrana celular causado pelo estresse oxidativo. Song (2007) e Vicentino e Menezes (2007) relataram que doenças degenerativas crônicas como: doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, complicações da Diabetes mellitus, o envelhecimento precoce e outras estejam relacionadas com o estresse oxidativo.

O estudo demonstrou que o *p*-cimeno inibiu de forma proeminente a quantidade de TBARS formado. Dessa forma, esse monoterpreno foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica em todas as doses testadas, indicando uma proteção antioxidante. Vale ressaltar que as doses de CIM 100 e 150 indicou uma proteção antioxidante mais significativa que a produzida pelo ácido ascórbico, composto utilizado como padrão (**Ilustração 2**).

Baseado nos resultados obtidos no estudo realizado foi proposto um possível mecanismo de reação da ação antioxidante do *p*-cimeno contra a formação de radical lipídico como demonstra na **Ilustração 6**. É importante ressaltar que existem duas possibilidades de reação de antioxidante *p*-cimeno na formação de radical lipídico e na formação de radical nitrito (**Ilustração 7**) devido o composto apresentar duas posições com hidrogênios benzílicos.

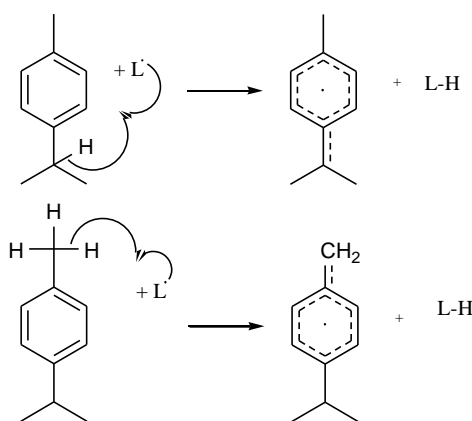


Ilustração 6: Possível mecanismo de reação antioxidante do *p*-cimeno na formação de radical lipídico.

O óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO₂) são espécies reativas derivados de nitrogênio (SONG, 2004; SOUZA et al., 2007). Estudos têm demonstrado que doenças neurodegenerativas geram mudanças no metabolismo do óxido nítrico e interagem com

receptores glutamatérgicos para produzir parte de sua ação estimulante sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) (CAMPÊLO, 2011; SOUZA et al., 2007; FREITAS, 2009). No sistema nervoso o NO participa de diversos processos de sinalização e na defesa do tecido contra os agentes patogênicos, mas é também um agente nocivo em excesso, sofre reações oxidativas/redutoras, produzindo ERNS (FEITAS, 2009; SUEISHI, 2011).

No que se refere ao conteúdo de nitrito os resultados demonstram uma diminuição significativa desse íon em todas as doses testadas, sendo mais significativa que a produzida pelo ácido ascórbico, indicando que o *p*-cimeno pode ser altamente eficaz contra a formação de espécies reativas derivadas de nitrogênio culminando em um papel neuroprotetor.

A diminuição no conteúdo de nitrito pode ser uma consequência da inibição da formação de radicais, *scavenges* de espécies reativas derivadas do oxigênio e produtos de peroxidação lipídica (CAMPÊLO, 2011; SOUZA et al., 2007).

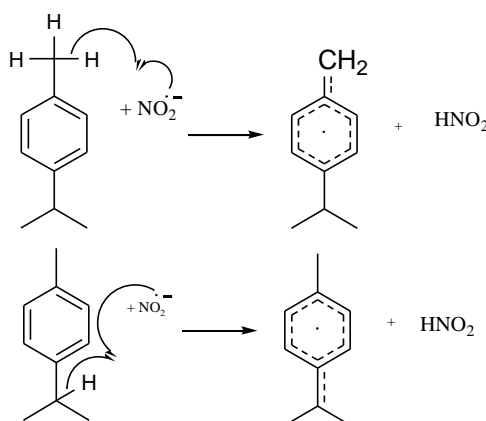


Ilustração 7: Possível mecanismo de reação antioxidante do *p*-cimeno na formação de radical nitrito (NO₂⁻).

Os níveis de EROs são normalmente controlados por um sistema de defesa antioxidante, como as enzimas: MnSOD (superóxido dismutase contendo manganês), CuZnSOD (superóxido dismutase contendo cobre-zinco), CAT e GSH-Px (glutathiona peroxidase), essas tem mostrado uma diminuição significativa em produtos de peroxidação lipídica (VANDER JAGT et al., 1997; GOMES, 2011).

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é degradado pela ação de CAT e GSH-Px (GOMES, 2011; BRAVARD et al., 2002). Nesse sentido o monoterpene foi capaz de aumentar de forma

significativa, tanto a atividade da enzima superóxido dismutase, quanto à atividade da enzima catalase, demonstrando uma mudança positiva no sentido de ampliar as defesas neuroprotetoras cerebrais. O aumento dessa atividade sugere que o *p*-cimeno apresenta um potencial antioxidante relacionado à modulação da atividade enzimática contra a formação de peróxido de hidrogênio. Nesse estudo não foi possível verificar um efeito dose-dependente entre as diferentes doses do CIM avaliado *in vivo*.

CONCLUSÃO

O tratamento com *p*-cimeno reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, sugerindo um papel antioxidante *in vivo* uma vez que foi capaz de reduzir a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio. Além disso, o *p*-cimeno aumentou a atividade das enzimas CAT e SOD, no hipocampo de camundongos, sugerindo que seu papel antioxidante pode ser devido a modulação positiva da atividade dessas enzimas. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que o *p*-cimeno apresenta potencial antioxidante pelos métodos *in vivo* utilizados. Esse composto pode constituir uma nova estratégia no desenvolvimento de tratamentos para diversas patologias em que o estresse oxidativo desempenha um papel inerente em sua fisiologia. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de justificar o mecanismo responsável pela atividade antioxidante do *p*-cimeno, bem como correlacionar a atividade farmacológica com sua estrutura química.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; MENUT, C.; SOBRAL, M.E.G.; HENRIQUES, A.T. Chemical Composition of the Essential Oil of *Siphoneugena reitzii* D. Legr. **Journal of Essential Oil Research**, v.13, p. 429-430, 2001.

APEL, M.A.; NEVES, B.M.; BAUERMANN, L.; SILVA, R.B.; HENRIQUES, A.T. **Avaliação da atividade antioxidante do óleo volátil de *Siphoneugena reitzii* e de monoterpenos isolados**. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2008.

ARTHUR, J.R.; BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. **Life Sciences**, v. 36, p. 1569-1575, 1985.

BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1610-1615, 2011.

BISPO, M.D.; MOURÃO, R.H.V.; FRANZOTTI, E.M.; BOMFIM, K.B.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; MORENO, M.P.N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal Ethnopharmacol**, v. 76, p. 81-86, 2001.

BRAVARD, A.; AGERON-BLANC, A.; ALVAREZ, S.; DRANE, P.; LERHUN, Y.; PARIS, F.; LUCCIONI, C.; MAY, E. Correlation between antioxidant status, tumorigenicity, and radiosensitivity in sister rat cell lines. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 705-711, 2002.

CAMPÊLO, L.M.L. **Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico**. 151p.

Dissertação de Metrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2011.

CAMPÊLO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; SOUZA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine Biotechnology**, v.2011, p. 1-8, 2011.

CAMPÊLO, L.M.L.; SÁ, C.G.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J.P.; MARQUES, T.H.C.; FEITOSA, C. M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Pharmazie**, v. 66, p. 623-627, 2011.

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P.G. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 397-423, 1999.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C.; The assay of catalases and peroxidases. **Methods Biochem Analysis**, v.1, p.357-424, 1954.

COSTA, D.A. **Estudo pré-clínico dos efeitos bioquímicos e farmacológicos da cianocarbona em camundongos:subsídio para o desenvolvimento de fitomedicamentos**.119p. Dissertação de Metrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2012.

COSTA JÚNIOR, J.S.; FERRAZ, A.B.F.; FILHO, B.A.B.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; FREITAS, R.M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidant effects in vitro of Garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 293-299, 2011.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. 1ªed. Campinas: **André Tosello**, 1996.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 421-431, 1990.

DYMOND, A.M.; CRANDALL, P.H. Oxygen availability and blood flow in the temporal lobes during spontaneous epileptic seizures in man. **Brain Research**, v. 102, p. 191-196, 1976.

FREITAS, R.M. *Antioxidant Properties and Therapeutic Potential of Essential Oils*. In: Damiao Pergentino de Sousa. (Org.). *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*. **Nova Science Publishers**, v. 1, p. 1-9, 2011.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v.45), p.140-144, 2009.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F. C. F.; Vasconcelos, S. M. M.; Viana, G. S. B.; Fonteles, M. M. F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in *Wistar* rats. **FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

GOMES, D.B.V. **Estudo da Atividade antioxidante do líquido da castanha de caju (*Anacardium Occidentale* L.) técnico e *in natura* para formulações farmacêuticas**. 102p. Dissertação de Metrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2011.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393,p. 561-564, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v.91, p. 14S-22S, 1991.

HALLIWELL, B.; CHIRICO S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p 715S-724S; 724S-725S, 1993.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement

with follin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; ECHEVARRIA, A; GRYNBERG, N.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MARQUES, T.H.C.; MELO, C.H.S.; FREITAS, R.M. In vitro evaluation of antioxidant, anxiolytic and antidepressant-like effect of the *Bellis perennis* extract. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 22, p. 1044-1052, 2012.

MENGUES, S.S.; MENSTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2011.

MIGLIOREA, L.; COPPEDÈB, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**, v. 674, p. 73-84, 2009.

MOTHANA, R.A.A.; HASSON, S.S.; SCHULTZE, W.; MOWITZ, A.; LINDEQUIST, U.; Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species. **Food Chemistry**, v.126, p. 1149-1154, 2011.

NOQUEIRA NETO, J.D.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidant potential in vitro of nerolidol. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, 2012. *In press*

OLIVEIRA, F.A.; COSTA, C.L.S; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; CAVALCANTE, I.J.M.; LLIMA, A.F.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.; CAMPOS, A.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sciences**, v. 77, p. 2942-2952, 2005.

OTUKI, M.F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.M.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Sciences**, v. 69, p. 2225-2236, 2001.

RAMEZANI, M.; HOSSEINZADEH, H.; SAMIZADEH, S. Antinociceptive effects of *Zataria multiflora* Boiss fractions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 167-170 2004.

RODRIGUES, P.A. **Atividade gastroprotetora e antioxidante de extratos e constituintes químicos de byrsonima sericea dc. E *Pectranthus Grandis* Cramer (Willensem)**. 146p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Ceará, 2008.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53-60, 2007.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174, 2000.

SANTANA, M.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.H.; OLIVEIRA, M.G. B.; GUIMARÃES, A.G.; CUNHA, E.S.; MELO, M.S.; SANTOS, M.R.V.; ARAÚJO, A.A.S.; BONJARDIM, L.R. *p*-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 21, p. 1138-1143, 2011.

SANTOS, P.S.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures is diminished by alpha-tocopherol. **European Journal of Pharmacology**. v. 668, p. 65-71, 2011.

SIANI A.C.; GARRIDO, I.S.; CARVALHO, E.S.; RAMOS, M.F.S.; Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 57-69, 1999.

SILVA, A.P.S.; CERQUEIRA, G.S.; FREITAS, R.M.; NUNES, L.C.C. Effects of an aqueous extract of *Orbignya phalerata* Mart on locomotor activity and motor coordination in mice and as antioxidant in vitro. **Pharmazie**, v. 67, p. 260-263, 2012.

SILVA, D. A.; SILVA, T.M.S.; LINS, A C.S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W.N.; SOUZA, M.F., Chemical constituents and antioxidant activity of *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, p. 1250-1254, 2006.

SIOW, R. C.; ISHII, T.; MANN, G. E. Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. **Redox Report**, v. 12, p. 11-15, 2007.

SIQUEIRA-CATANIA, A.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S. R. G. Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, p. 550-559, 2009.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 649-662, 2004.

SOUZA, W.M.; BREHMER, F.; NAKAO, L.S.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 191-196, 2007.

STIEVEN, A.C.; MOREIRA, J.J.S.; FERRAZ, C. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, p. 7-16, 2009.

SUEISHI, Y.; HORI, M.; KITA, M.; KOTAKE, Y. Nitric oxide (NO) scavenging capacity of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 129, p. 866-870, 2011.

VANDER JAGT, D.L.; HUNSAKER, L.A.; VANDER JAGT, T.J.; GOMEZ, M.S.; GONZALES, D.M.; DECK, L.M.; ROYER, R.E. Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1133-1140, 1997.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 384-387, 2007.

WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M.B.; OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1362-1370, 2010.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respiratory Physiology**. v. 128, p. 379-391, 2001.

XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento agudo com *p*-cimeno revelou possuir atividade anticonvulsivante. Os resultados demonstraram o aumento no tempo de latência para primeira crise epilética e estado de mal epilético, e a taxa de sobrevivência nos animais, confirmando seu potencial antiepilético e neuroprotetor durante as crises epiléticas provavelmente pelo sistema GABAérgico. Este monoterpeno apresenta no estudo seu potencial antioxidante pelos métodos *in vivo* utilizados podendo ser útil para produzir proteção neuronal.



ANEXOS

ANEXO A:

**Capítulo do livro Recent Research Developments in
Brain Research.**



Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Review Article

Recent. Devel. Brain Res., 1(2012): 77-97 ISBN: 978-81-308-0305-4

3. Anticonvulsant effects of *p*-cymene in mice after pilocarpine-induced seizures

Talita Mendes de Oliveira¹, Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho^{1,2}
Adriana da Rocha Tomé³, Thiago Henrique Costa Marques^{1,4}
Rivelilson Mendes de Freitas^{1,4} and Sidney Gonçalo de Lima^{1,2}

¹Laboratory of Neurochemistry Research Experimental Program Graduate Pharmaceutical Sciences Center Health Sciences UFPI. Campus Ministro Petronio Portella 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil;

²Departamento de Química, Campus Ministro Petronio Portella, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil;

³Universidade Estadual do Ceará, Campus Itaperi Av Paranjana 1700 Itaperi, Fortaleza, 60740-000, Ceará, Brasil; ⁴Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/RENORBIO. Campus Ministro Petronio Portella, 64.049-550, Teresina, Piauí Brasil

Abstract. This experiment was performed to investigate the anticonvulsant-like effects of *p*-cymene (CYM), a natural hydrocarbon that is a component of essential oils, ie, natural products extracted from vegetable materials, by using experimental paradigms of convulsions in comparison with a known anticonvulsant, phenobarbital. CYM at doses of 50, 100 or 150 mg/kg promoted a reduction of 25, 50 and 75%, respectively, against pilocarpine-induced seizures, and it was efficacious in increasing both the latency to first seizures and the survival percentage, resulting in 25, 50 and 87.5% of protection against death induced by seizures, respectively. The reference drug phenobarbital (50 mg/kg) also produced a significant protection (50%), respectively. Its monoterpene, at 50, 100 or 150 mg/kg, was

Correspondence/Reprint request: Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental/Campus Ministro Petronio Portella da Universidade Federal do Piauí 64.049-550 Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: rivelilson@pq.cnpq.br

also capable to increase the latency for installation of status epilepticus induced by pilocarpine. Additionally, it was observed that the CYM pretreatment increased the acetylcholinesterase activity in mice hippocampus after pilocarpine-induced seizures. The present results clearly indicate the anticonvulsant ability of CYM, which can be, at least in part, explained by the increased activity of the acetylcholinesterase enzyme. It is concluded that *p*-cymene may have anticonvulsant-like effects in the pilocarpine-induced seizures, and these effects may be mediated by GABAergic transmission.

Introduction

The aim of this chapter is to describe several studies which have attempted to measure/detect effects of compound natural (*p*-cymene) on behavioral alterations and neuronal damage in hippocampus and striatum of rodents in epilepsy model induced by pilocarpine. Epilepsy is a disease characterized by a wide range of symptoms resulting from a variety of cerebral disorders. Semiologically, it is classified as partial or generalized. The clinical manifestations can arise through sensitive, sensory, psychological, vegetative and motor signs and symptoms of simple or complex nature, depending on the neural system implicated in the genesis of the disease. Epilepsy crises have a recurrent nature and tend to always present with the same characteristics over long periods. Epilepsy is not a single disease but represents a variety of diseases with underlying cerebral dysfunctions that may have different causes. Thus, a priori, it comprises a heterogenous clinical entity [1].

It has been estimated that 50 million people worldwide suffer from epilepsy. Partial epilepsy is the most common form, occurring in around 60% of epilepsy patients. Up to 30% of epilepsy patients will not achieve adequate control over the disease [2].

It is important to differentiate convulsions from epileptic seizures. Convulsions signify transitory occurrences of signs and symptoms resulting from synchronic or excessively abnormal neuronal activity in the brain, triggered by convulsogenic factors. These include metabolic disorders involving glucose, electrolytes, increased temperature or cranial-encephalic trauma, among others. On the other hand, epilepsy is a cerebral disorder with long-lasting predisposition towards generating epileptic crises, which lead to neurobiological, cognitive, psychological and social consequences. Status epilepticus is a severe form of clinical presentation of epileptic crises and is characterized by long duration. Depending on the type of crisis, it may have high morbidity-mortality [1].

Antiepileptic drugs are the initial treatment for the great majority of epilepsy patients. For 150 years, physicians have been prescribing

antiepileptic drugs to patients with recent diagnoses of epilepsy, without any formal scientific evaluation regarding the efficacy, safety and tolerability of such drugs. For example, phenobarbital and phenytoin were registered and put on the market without any randomized clinical trial having been conducted to evaluate their efficacy and safety [3]. Indication of a specific drug for a particular condition of epilepsy is based on clinical studies with varying levels of evidence, many without sufficient methodological quality. Drugs are chosen with regard not only to the data on the clinical trials available, but also to variables such as the type of epilepsy, the patient's age and the supposed mechanism of action of the drug.

The action of antiepileptic drugs occurs through several mechanisms. Although a considerable number of antiepileptic drugs are available for the treatment of epilepsy there is still an urgent need for development of new drugs as alternatives [4].

The essential oils are natural products that exhibit a variety of biological properties, such as analgesic [5], anticonvulsant [6] and anxiolytic [7] and [8]. Those effects are attributed to the monoterpenes which are the major chemical components of these essential oils. For instance, the monoterpene cyano-carvone, has been reported to have anticonvulsant activity in mice. Similarly, cyano-carvone presented significant increases in the latency of pilocarpine-induced seizures [9].

p-Cymene (1-isopropyl-4-methylbenzene; Figure 1) is a natural hydrocarbon that is a component of essential oils, ie, natural products extracted from vegetable materials. For example, the essential oils obtained from oregano and thyme, traditional Mediterranean spices, are characterized by a very high content of monoterpenes such as *p*-cymene (trace to 52%), γ -terpinene (2-52%), thymol (trace to 64%), and carvacrol (1-80%) [10,11].

However, *p*-cymene occurs in the oils of many other gymnospermic and angiospermic plants. It is metabolized by the liver and the major *p*-cymene metabolite is cuminyl alcohol [12]. Furthermore, formation of *p*-cymene as a

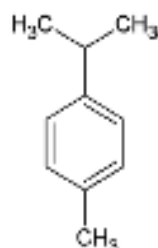


Figure 1. Chemical structure of *p*-cymene (1-isopropyl-4-methylbenzene).

dead-end metabolite from certain nonaromatic monoterpenes has been observed in anoxic enrichment cultures [13,14] and degradation has been also demonstrated with anaerobic and aerobic bacteria [15].

Some of the pharmacological actions of *p*-cymene have been studied [16-18]. According to previous studies, the antimicrobial effect of monoterpenes such *p*-cymene may result, partially at least, from a gross perturbation of the lipid fraction of the plasmic membrane of the microorganism [19,20].

Thus, the objective of the present study was to determine the anticonvulsant activity of *p*-cymene, as well as their effects on neuronal damage in hippocampus and striatum of mice in epilepsy model induced by pilocarpine.

1. Behavioral alterations in epilepsy model

Status epilepticus is a medical and neurological emergency. Overall, mortality is 17 to 26% [21-23]. An additional 10 to 23% of patients who survive status epilepticus are left with new or disabling neurological deficits [22,24]. Traditionally, status epilepticus is defined as continuous or repetitive seizure activity persisting for at least 30 minutes without recovery of consciousness between attacks. More recently, authors have suggested that seizures exceeding 5 to 11 minutes should be considered status epilepticus [25,26]. For all practical purposes, a patient should be considered to be in status epilepticus if a seizure persists for more than 5 minutes, as very few single seizures will last this long.

Several types of status epilepticus exist. Clinically, the most important distinction to make is between convulsive and nonconvulsive status epilepticus, based on whether or not rhythmic jerking of the extremities is observed. Typically, patients who present with generalized convulsive status epilepticus are expected to awaken gradually after the motor features of seizures disappear. If the level of consciousness does not improve by 20 minutes after cessation of movements, or the mental status remains abnormal 30 to 60 minutes after the convulsions cease, nonconvulsive status epilepticus must be considered and urgent electroencephalogram is advised.

In a study by De Lorenzo and colleagues [27], 14% of patients treated successfully for convulsive status epilepticus were in nonconvulsive status epilepticus when electroencephalogram was begun; of the patients who underwent continuous electroencephalogram monitoring after convulsive status epilepticus was controlled, 48% had nonconvulsive seizures.

Status epilepticus is an emergency situation which requires prompt medical treatment. If it is severe permanent brain damage or death has to be

prevented with pretreatment with natural compounds. Status epilepticus often occurs in individuals with a history of seizures, in whom there are neuronal substrates already predisposed towards supporting seizure activity.

The pilocarpine model is an useful animal experimental to investigate the development of acute, silent and chronic phases [28]. Immediately after pilocarpine administration, all animals persistently presented behavioral changes, including initial akinesia, ataxic lurching, peripheral cholinergic signs (miosis, piloerection, chromodacryorrhea, diarrhea and masticatory automatisms), stereotyped movements (continuous sniffing, paw licking, rearing and wet dog shakes that persisted for 10-15 min), clonic movements of forelimbs, head bobbing and tremors.

These behavioral changes progressed to motor limbic seizures as previously described by Tursky and colleagues [29]. Limbic seizures lasted for 7-15 min evolving to status epilepticus for a period longer than 30 min. During 1 h of acute phase of seizures, no case of fatality was observed between the adult mice. However, during the 24 h observation of this phase, 100% of adult animals died [9,30-32]. Similarly, these results for the behavioral alterations in pilocarpine model were described in previously studies [9,33].

According to our previous studies [9,32,34], few minutes after pilocarpine administration, the animals exhibited stereotyped oral and masticatory movements, hypokinesia, salivation, tremor and partial or generalized limbic seizures. Approximately 30 min after pilocarpine injection, the seizures evolved to status epilepticus lasting 12-18 h. During this period, 80% of animals died due to status epilepticus. This acute phase was followed by a silent period varying from 4 to 44 days (mean of 15 days) during which the animals displayed normal behavior.

A chronic period of spontaneous and recurrent seizures (SRS) (3-4 seizures/week) was also observed and all animals which survived status epilepticus, displayed the chronic phase. During the interictal period, there were no behavioral alterations in the animals.

In epilepsy model, pilocarpine induced the first seizure to occur at 7.83 ± 0.27 min. All the mice that received pilocarpine injection (at a dose 400 mg/kg, i.p.) presented generalized tonic-clonic convulsions with status epilepticus, and no animal survived the seizures [9]. In the present study, we have demonstrated that the systemic administration of *p*-cymene can completely abolish pilocarpine-induced seizures. This was evident from concurrent behavioral changes consistent with anticonvulsant state. This was also reflected by elicited alterations in the oxidative stress and acetylcholinesterase activity after pilocarpine-induced seizures. Considering

that, *p*-cymene was effective in preventing tonic convulsions induced by pilocarpine this compound could be useful in grand mal epilepsy.

2. *p*-Cymene effects on behavioral alterations in epilepsy model

Status epilepticus is a neurological emergency that requires prompt diagnosis and treatment, as delay is associated with a higher likelihood of poor response to treatment and worse outcome. Generalized convulsive status epilepticus is one of the most common medical emergencies in clinical practice. Status epilepticus occurs not only in people with epilepsy but also in the context of other neurological disorders and systemic illness. The annual incidence in the UK is about 9000-14000 new cases per year [35].

Status epilepticus accounts for 3.5% of admissions to emergency departments in the developed nations and for 11% in a developing country [36]. Prompt recognition and treatment are required to prevent associated complications. However, prospective randomised trials regarding the treatment are few. Formulation of newer anticonvulsants is limited to the oral route and hence could not be widely used in the initial management of status epilepticus. Hence, there is a substantial need to improve measures for both prevention and effective management of this life-threatening condition.

Searching the plant kingdom for a treatment or cure for convulsions or seizures is not an unreasonable approach to the problem; particularly, when one considers that no pharmacological prototype has been found outside either the plant or animal kingdom. The history of herbal treatments for convulsions is coincidental with the history of medicine as well as with the history of civilization itself. Anticonvulsants are used to control convulsions occurring in epilepsy, tetanus, cerebral hemorrhage, eclampsia and in poisoning with convulsants [37].

According to Cheymol [38], convulsions arise due to a sudden excessive and rapid discharge in the grey matter of the brain. Convulsions have the focal origin, the form of seizures depending on the site of focus in the brain, the regions to which discharge spreads and the effects of post ictal paralysis of these regions.

The nervous system contains some antioxidant enzymes, including superoxide dismutase and glutathione peroxidase that are expressed in higher quantities than catalase [39]. This spectrum of enzymatic defense suggests that the brain may efficiently metabolize superoxide, but it may have difficulties in eliminating the hydrogen peroxide produced by this reaction. The accumulation of hydrogen peroxide is of major concern since the brain contains large quantity of iron and copper, which may catalyze the formation of hydroxyl radical, which, in turn, can induce lipid peroxidation [40].

The glutathione peroxidase is presented in large amounts during the Central Nervous System (CNS) development, but decreases in aged rats [41]. Nevertheless, other scavengers such as ascorbic acid and alpha-tocopherol also decrease the propagation of radical chain reaction. For these reasons, free radicals have been pointed as important molecules involved in the nervous system pathologies such as Huntington disease, Alzheimer, ischaemia and epilepsy [42].

In epilepsy model induced by pilocarpine administration, we found that superoxide dismutase and catalase activities in the hippocampus are not altered during the acute phase of seizures. On the other hand, according to several authors, the augment of these enzymatic activities could decrease the O₂⁻ and H₂O₂ levels. Taken together, these results show that during the acute phase, the hippocampus of the adult animals in pilocarpine model after seizures is more vulnerable to oxidative stress.

In addition, high-levels of hydroperoxides were also observed in the same group of animals, which indicated that the lipid peroxidation could be dependent of disability of the antioxidant enzymatic (superoxide dismutase and catalase) activities. As the hydroperoxides are a class of compounds produced as the result of phospholipid peroxidation, its high concentration in the tissue suggests that the hippocampal cells are more vulnerable to damage during the acute period of seizures. Thus, the results described in literature about pilocarpine model suggest that the beneficial effects of antioxidants compounds in reducing the behavioral changes caused by seizures may be partly explained by their ability to remove free radicals, and prevent the formation of hydroperoxides in hippocampus of seized rats.

Adesina [43] carried out phytochemical and pharmacological studies on 50 plants which were used as anti-convulsants, viz. anti-leptazol and anti-strychrine tests. Chang [44] reported the characterization of biologically active compounds from the plant-kingdom. This chapter is restricted only to *p*-cymene which possess either anticonvulsant activity and the results are summarized in Table 1.

The need for animal models of epilepsy is driven by the constraints of studying human epileptic brain. Although a great deal has been learned through the study of human epileptic brain tissue throughout the past 100 years, and particularly based in recent experiments with pilocarpine model, our work was aimed at investigating the antioxidant effects of *p*-cymene in adult mice under pilocarpine-induced seizures. Our studies have demonstrated that all animals pretreated with the *p*-cymene at the dose (50, 100 or 150 mg/kg) during the first 3-5 minutes of acute phase of seizures induced by pilocarpine injection also manifested behavior alterations, such as peripheral cholinergic signs, tremors, staring spells,

facial automatisms, wet dog shakes, rearing and motor seizures, which develop progressively within 10 min into a long-lasting status epilepticus. However, these behavioral changes occur at lower rates (Table 1). The findings also suggest that when administered 30 min before pilocarpine, *p*-cymene reduces the percentage of animals that seized, increases latency to the first seizure and the survival percentage (Table 1).

In preclinical practice, the animals pretreated with *p*-cymene (50 mg/kg) in pilocarpine model developed cholinergic reactions, 75% had seizures, 75% built up to status epilepticus and 25% of the animal died (Table 1). *p*-Cymene administration, 30 min before pilocarpine injections, increased the latency to the onset of the first seizure in 129% and latency of the status epilepticus in 96% (Table 1). In pilocarpine model, it is also shown that when administered at the smaller dose (100 mg/kg), 30 min before pilocarpine injection, *p*-cymene can be decrease by 50% the percentage of animals that seized, increased (213%) latency to the first seizure, and increased survival (41%) (Table 1).

The pretreatment with *p*-cymene at doses 50, 100 or 150 mg/kg was not able to revert peripheral cholinergic signs, tremors and stereotyped movements induced by pilocarpine, but the compound caused a dose-dependent reduction in pilocarpine-induced seizures, at the doses of 50 (25%), 100 (50%) and 150 mg/kg (75%). A clear protector effect was also observed with atropine (25 mg/kg), phenobarbital (50 mg/kg) and diazepam (5 mg/kg), which were used as a reference drugs (Table 1). As verified in our study, *p*-cymene was dose-dependently effective in increasing the latency to first seizures induced by pilocarpine at the doses of 25, 50 and 75 mg/kg.

According to Table 1, *p*-cymene caused an increase of latency for installation of status epilepticus induced by pilocarpine (400 mg/kg) at doses of 25 (96%), 50 (158%) and 75 mg/kg (481%). Table 1 shows that *p*-cymene significantly increased the survival rate after pilocarpine-induced seizures at doses of 25 (25%), 50 (50%) and 75 mg/kg (87.5%). The reference drugs atropine (25 mg/kg), phenobarbital (50 mg/kg) and diazepam (5 mg/kg) also produced a significant protection (100, 50 and 75%), respectively. None of the control animals (vehicle, atropine, phenobarbital, diazepam or *p*-cymene) presented behavioral changes.

Mice were acutely treated with the drug doses shown in the table above and 30 min afterwards they received pilocarpine (400 mg/kg). Following, the animals were observed for 24 h for assessment of cholinergic reactions, motor seizures which develop progressively within 10-12 min into a long-lasting

Table 1. Effect of pretreatment with *p*-cymene on behavioral alterations in pilocarpine-induced seizures and lethality in adult mice.

Drugs	Dose (mg/kg)	Cholinergic Reactions (%)	Latency to first seizure (min)	Seizures (%)	SE (%)	Survival rate (%)
Pilocarpine	400	100	7.81 ± 0.23 ^a	100	100	0
<i>p</i> -cymene	50	100	18.0 ± 0.23 ^b	75 ^d	75 ^d	25 ^d
	100	100	24.5 ± 0.82 ^c	50 ^e	50 ^e	50 ^e
	150	100	32.0 ± 0.07 ^f	25 ^f	25 ^f	75 ^f
Diazepam	5	100	9.0 ± 0.38 ^g	100	100	25 ^g
Phenobarbital	50	100	45.2 ± 1.30 ^h	50 ^h	50 ^h	50 ^h
Acropine	25	0	-	0 ⁱ	0 ⁱ	100

status epilepticus (SE) and survival rate. Results of latency to first seizure are expressed in minutes (min) as mean ± S.E.M of the number of experiments shown in the experimental groups and the others in percentages. ^a*p*<0.05, vs pilocarpine; ^b*p*<0.05 vs *p*-cymene 50; ^c*p*<0.05 vs *p*-cymene 100 (ANOVA and *t*-Student Newman Keuls *post hoc* test); ^d*p*<0.05, vs pilocarpine; ^e*p*<0.05 vs *p*-cymene 50; ^f*p*<0.05 vs *p*-cymene 100 (χ^2 test).

Hence, it could be expected that natural compounds such as *p*-cymene, can be used as scavengers of free radicals, reducing brain injury induced by pilocarpine. In previous histopathological analyses, *p*-cymene protected animals against seizures, status epilepticus and brain damage induced by pilocarpine (Figure 1) by decreasing the percentage of seizures, status epilepticus and death in relation to three doses tested.

3. *p*-Cymene effects on histopathological alterations in epilepsy model

A wide variety of lesions have been reported in the different studies of epilepsy in the literature; though the question is still raised if these observed lesions are the cause or the consequence of seizures. The lesions that might play a role in the onset, maintenance and progression of pharmacoresistance of epileptic seizures, as well as the lesions that might results in are not yet well predicted and comprehensible [45].

Over the last few decades, the refinement and advancement of neurobiological investigative tools along with the proliferation of epilepsy surgery have offered the possibility to study in detail some network, cellular and molecular properties of the human brain [46-48]. Such analyses, which have been most often performed on brain tissue obtained from epileptic patients, not only have revealed some basic principles of network and cellular physiology of human nerve cells but also have provided direct information on the pathophysiology underlying this disease.

Early necropsy reports have demonstrated two etiological forms of temporal lobe epilepsy. This pathology could be due either to specific structural epileptogenic lesions or to discrete histological abnormalities in the hippocampus which have been given the generic name of hippocampal sclerosis [49-53]. Hippocampal sclerosis is characterized by extensive loss of pyramidal cell bodies particularly in CA1, reactive gliosis, granule cell dispersion in the dentate gyrus, and mossy fibre reorganization [54-59].

Epileptic patients with marked hippocampal sclerosis have a characteristic clinical history, well-localized electroencephalographic abnormalities, neuropsychological deficits and metabolic patterns that individualize a syndrome referred to as mesial temporal lobe epilepsy. Mesial temporal lobe epilepsy is by far the most common form of temporal lobe epilepsy [60,61]. It usually appears between five and 10 years, although sometimes with a later onset, after complicated febrile convulsions, status epilepticus, encephalitis or head trauma [62-63]. Recurrent spontaneous mesial temporal lobe epilepsy seizures are associated with alterations of consciousness and orofacial automatisms; secondarily generalized motor seizures are rare.

Preclinical studies have demonstrated that rodents sustain prolonged behavioral deficits following epileptic brain injury, in some cases culminating in the cognitive and histopathological hallmarks of human epilepsy. However, few studies have examined the long-term consequences and compound natural effects on experimental epileptic brain injury.

Some remarks should be made at this point. For instance, it must be emphasized that the majority of human data have resulted to date from *in vivo* methodological approaches with rodents, and in particular the brain slice preparation; therefore, these findings do reflect the activity of a "reduced" system that does not possess the capabilities of an intact brain [64].

In addition, the majority of these experiments have been performed in rodents presenting with partial epileptic disorders that are often pharmacoresistant and thus amenable for in-depth investigations leading to neurosurgical interventions. It is also important to note that the interpretation of data obtained from human slice experiments is hampered by the absence of "normal" human controls. Such a problem has been partially worked out by employing "non-epileptic" cortical samples (for instance, tissue resected during removal of a tumor located deep in the brain). However, even in such cases, it is unlikely that this brain tissue was "normal". Throughout this chapter we will also compare the findings obtained by studying the *p*-cymene effects on mice brain tissue with evidence gathered in cerebral histopathological analyses in epilepsy model pilocarpine-induced.

A variety of epilepsy models reflect the effects of lipoic acid, ubiquinone, cyano-carvone, acid ascorbic and alpha-tocopherol and specify their action [65-70]. Previously, it had been demonstrated that natural compounds reduced the frequency of epileptiform activity [71-72]. In recent years, many of the effects of *p*-cymene have been discovered, including their actions on mitochondrial functions.

Some studies have reported that *p*-cymene did not change the oxygen consumption by respiratory chain (state 2 respiration). However, *p*-cymene decreased the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$), depressed the rate of ADP phosphorylation (state 3), and stimulated the oxygen consumption after phosphorylation of ADP (state 4). The respiratory control ratio (state 3/state 4) was decreased as a consequence of the inhibition of state 3 and stimulation of state 4 respiration but the ADP/O index remained unaltered as well as the mitochondrial Ca^{2+} fluxes. Moreover, *p*-cymene did not induce mitochondrial membrane disruption but depressed the $\Delta\psi$, and the stimulatory effect observed on state 4, similar to the effect observed on state 2 respiration plus ATP, was inhibited by oligomycin. These effects suggest that *p*-cymene allows a proton leak through the F_0 fraction of the phosphorylative system, changing the mitochondrial proton motive force and ATP synthesis capacity [18]. Therefore, these data suggest mitochondria as a target for *p*-cymene action mechanisms.

Our results demonstrated that seizure pattern and brain damage observed in pilocarpine-treated animals differ from those pretreated with *p*-cymene (100 or mg/kg) plus pilocarpine (400 mg/kg). The latter reproduced the syndrome with lower intensity of histopathological changes and mortality rate, in comparison with the *p*-cymene (100 or 150 mg/kg) plus pilocarpine, corroborating the outcomes obtained by Ayyildiz and collaborators [73], Costa and collaborators [9] and Freitas [74]. The percentage of status epilepticus (100%) that was found further corroborated prior investigations [9,75].

The precise target of the anticonvulsant action of *p*-cymene and derivatives has not yet been fully established but it has been reported that the mode of action involves several targets in the cell. *p*-Cymene has been shown to have neuroprotective properties. In fact, it has been reported that the anticonvulsant effects of *p*-cymene and derivatives may result, partially at least, from a reduction of the perturbation of the lipid fraction of the plasmic membrane, acting by protection the cytoplasmic membrane against free radicals. The membrane integrity favors its functions not only as a barrier but also as a matrix for enzymes and as an energy transducer.

Changes in the fatty acid composition of neuronal cell membranes (an increase in unsaturated fatty acids) and changes in membrane fluidity have

been observed during pilocarpine-induced seizures [9,76]. Therefore, the hydrophobicity enables them to partition in the lipids of the cell membrane and mitochondria, rendering them permeable and leading to leakage of cell contents [77]. In addition to the effects on the membrane integrity and transmembrane potential, treatment with this monoterpenes can induced increases of the intracellular ATP levels when neuronal cells were exposed to epileptic activity.

Brain tissue examinations of the animals pretreated with *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg; Figures 1 C, D and E), did not reveal hippocampal histopathological changes. Then again, pilocarpine-treated animals presented neuronal loss, gliosis, and typical vacuolar degeneration in hippocampus region (Figure 1 B). Histopathological damage in hippocampus was observed only in 37.5% of the animals co-administered with *p*-cymene (50 mg/kg), and that 30 min after pretreatment received pilocarpine (400 mg/kg), respectively (Table 2 and Figure 1 F).

In addition, the analyses of histopathological damage in hippocampus of mice pretreated with *p*-cymene (100 or 150 mg/kg), and that 30 min after pretreatment received pilocarpine (400 mg/kg) did not reveal hippocampal histopathological changes (Table 2 and Figures 1 G and H). Moreover, the analyses of histopathological damage in hippocampus of mice pretreated with vehicle (control group) revealed no neuronal damage (Figure 1 A).

[A] Control group; [B] Pilocarpine group; [C] *p*-cymene 50 group; [D] *p*-cymene 50 plus pilocarpine groups was treated with *p*-cymene (50 mg/kg) and 30 min before pilocarpine; [E] *p*-cymene 100 group; [F] *p*-cymene 100 plus pilocarpine group was treated with *p*-cymene (100 mg/kg) and 30 min before pilocarpine; [G] *p*-cymene 100 group; [H] *p*-cymene 150 plus pilocarpine group was treated with *p*-cymene (150 mg/kg) and 30 min before pilocarpine. Severity of lesion was expressed as mean \pm S.E.M. of scores of damage based in a scale from zero (none) to 100 (total) percent of structural involvement. Brain damage was considered positive if there was at least 50% hippocampal involvement. Hematoxylin & Eosin staining (H&E). Magnification, 100 X. One representative experiment with n=8 is shown.

Severity of lesion in hippocampus was reduced in 51.2% of the animals co-administered with *p*-cymene (50 mg/kg), and that 30 min after pretreatment received pilocarpine (400 mg/kg), respectively (Table 2).

Pilocarpine was administered in a single dose (400 mg/kg, pilocarpine, n=8), and *p*-cymene groups with *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg; n=8). The *p*-cymene plus pilocarpine groups were treated with *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg, n=8) and 30 min before pilocarpine. Severity of lesion was expressed as mean \pm S.E.M. of scores of damage based on a scale from zero (none) to 100 (total) percent of structural involvement. Brain damage was

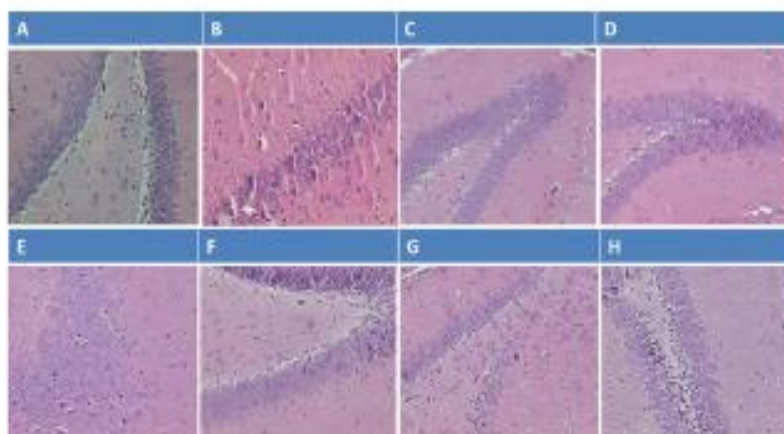


Figure 1. Histopathological alterations in mice hippocampus treated with pilocarpine, *p*-cymene or their combinations.

Table 2. Histopathological alterations in hippocampus of mice pretreated with *p*-cymene after pilocarpine-induced seizures.

Drugs	Dose (mg/kg)	Mice with lesion (%)	Severity of lesion (%)	Number of animals with lesion per group
Pilocarpine	400	87.5	63.92 ± 0.3	7
<i>p</i> -cymene	50	00	00	0
	100	00	00	0
	150	00	00	0
<i>p</i> -cymene plus pilocarpine	50	37.5 ^a	12.9 ± 0.2 ^b	3 ^c
	100	00	00	0
	150	00	00	0

defined as present if there was at least 50% hippocampal involvement. Results for % mice with brain lesion and % severity of lesion are expressed as percentages of the number of animals inside in parenthesis. ^a*p*<0.05 compared with pilocarpine group (χ^2 test). ^b*p*<0.05 compared with pilocarpine group (ANOVA and t-Student Newman Keuls *post hoc* test).

Brain tissue examinations of the animals pretreated with *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg; Figures 2 C, D and E), did not reveal striatal histopathological changes. Then again, pilocarpine-treated animals presented neuronal loss and typical vacuolar degeneration in striatum region (Figure 2 B). Histopathological damage in striatum was observed only in

25% of the animals co-administered with *p*-cymene (50 mg/kg), and that 30 min after pretreatment received pilocarpine (400 mg/kg) (Table 3 and Figure 2 F). In addition, the analyses of histopathological damage in striatum of mice pretreated with *p*-cymene (100 or 150 mg/kg), and that 30 min after pretreatment received pilocarpine (400 mg/kg) did not reveal striatal histopathological changes (Table 3 and Figures 2 G and H). Moreover, the analyses of histopathological damage in striatum of mice pretreated with vehicle (control group) revealed no neuronal damage (Figure 2 A).

Severity of lesion was expressed as a mean \pm S.E.M. of scores of damage based in a scale from zero (none) to 100 (total) percentage of striatum involvement. Brain damage was considered positive if there was at least 50% striatal involvement showed by Hematoxylin & Eosin staining (HE). Pictures (100 X) shown are from one representative experiment of $n=8$. [A] Control group; [B] Pilocarpine group; [C] *p*-cymene 50 group; [D] *p*-cymene 50 plus pilocarpine groups was treated with *p*-cymene (50 mg/kg) and 30 min before pilocarpine; [E] *p*-cymene 100 group; [F] *p*-cymene 100 plus pilocarpine group was treated with *p*-cymene (100 mg/kg) and 30 min before pilocarpine; [G] *p*-cymene 100 group; [H] *p*-cymene 150 plus pilocarpine group was treated with *p*-cymene (150 mg/kg) and 30 min before pilocarpine.

Severity of lesion in hippocampus was reduced in 44.23% of the animals co-administered with *p*-cymene (50 mg/kg), and that 30 min after pretreatment received pilocarpine (400 mg/kg), respectively (Table 3).

The outcomes confirm that *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg) decreased the frequency of pilocarpine-induced seizures, status epilepticus and brain lesions in mice. In addition, *p*-cymene decreases the severity of hippocampal

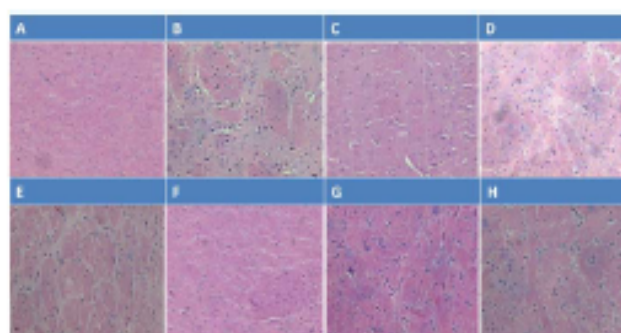


Figure 2. Histopathological alterations in mice striatum treated with pilocarpine, *p*-cymene or their combinations.

Table 3. Histopathological alterations in striatum of mice pretreated with *p*-cymene after pilocarpine-induced seizures.

Drugs	Dose (mg/kg)	Mice with lesion (%)	Severity of lesion (%)	Number of animals with lesion per group
Pilocarpine	400	62.5	56.19 ± 0.34	5
<i>p</i> -cymene	50	00	00	0
	100	00	00	0
	150	00	00	0
<i>p</i> -cymene plus pilocarpine	50	25 ^a	11.96 ± 0.57 ^b	2
	100	00	00	0
	150	00	00	0

and striatal lesions and mortality rate caused by pilocarpine. Costa and collaborators [9] demonstrated that the injection of cyano-carvone, 30 min before pilocarpine administration, prevented the occurrence of epileptic discharges. Since there are wide variations of *p*-cymene and cyano-carvone doses used in different models of seizure, more detailed investigations are necessary before an ultimate conclusion on the effects of those compounds on pilocarpine-induced seizures can be achieved.

Pilocarpine was administered in a single dose (400 mg/kg, pilocarpine, *n*=8), and *p*-cymene groups with *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg; *n*=8). The *p*-cymene plus pilocarpine groups were treated with *p*-cymene (50, 100 or 150 mg/kg, *n*=8) and 30 min before pilocarpine. Severity of lesion was expressed as mean ± S.E.M. of scores of damage based on a scale from zero (none) to 100 (total) percent of structural involvement. Brain damage was defined as present if there was at least 50% striatal involvement. Results for % mice with brain lesion and % severity of lesion are expressed as percentages of the number of animals inside in parenthesis. ^a*p*<0.05 compared with pilocarpine group (χ^2 test); ^b*p*<0.05 compared with pilocarpine group (ANOVA and *t*-Student Newman Keuls *post hoc* test).

In conclusion, there is an accumulation of free radicals after status epilepticus induced by pilocarpine, and oxidative changes in other parameters during the acute phase. This finding suggests that seizures, status epilepticus and deaths induced by pilocarpine have a large participation in brain oxidative stress, which is closely related to the mechanism of propagation and/or maintenance of the epileptic focus by pilocarpine. These results suggest that free radicals as well as the muscarinic receptor activation seem to be involved in the genesis of seizures and brain damage obtained with pilocarpine. On the other hand, the muscarinic activation seems to play a major role in the neuronal damage produced by pilocarpine. *p*-Cymene can

exert neuroprotective function during acute phase of seizures, thereby decreasing the severity of hippocampal and striatal lesions. All these outcomes indicate the promising therapeutic potential of *p*-cymene in treatments for neurodegenerative diseases.

Conclusion

Our results have shown that *p*-cymene possesses anticonvulsant activity probably due to the modulation of cholinergic system. *p*-Cymene may be helpful to produce neuronal protection and may be considered as a potential natural anticonvulsant. However, additional studies should be conducted in order to determine its clinical use.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq), Brazil. We would like to thank Stenio Gardel Maia for and Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (UFPI, Picos) for their help with the English editing of the manuscript.

References

1. Fisher, R.S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J.Jr. 2005, Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau of Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46, 470.
2. Smith, P.E. 2001, UK Oxcarbazepine Advisory Board. Clinical recommendations for oxcarbazepine. *Seizure*, 10, 87.
3. Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Chadwick, D., Guerreiro, C., Kalvainen, R., Mattson, R., Perucca, E., Tomson, T. 2006, ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, 47, 1094.
4. Kupferberg, H.J. 1992, Strategies for identifying and developing new anticonvulsant drugs. *Pharm. World Sci.*, 14, 132.
5. Almeida, R.N., Navarro, D.S., Barbosa-Filho, J.M. 2001, Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8, 310.
6. Almeida, R.N., Motta, S.C., Leite, J.R. 2003, Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Bol. Latinoam. Caribe Plan Med. Aromat.*, 2, 3.
7. Almeida, R.N., Motta, S.C., Faturi, C.B., Catallani, B., Leite, J.R. 2004, Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 77, 361.

8. Umezu, T., Ito, H., Nagano, K., Yamakoshi, M., Oouchi, H., Sakaniwa, M., Morita, M. 2002, Anticonflict effect of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sci.*, 72, 91.
9. Costa, D.A., Oliveira, G.A.L., Lima, T.C., Santos, P.S., Sousa, D.P., Freitas, R.M. 2012, Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 32, 633
10. Baratta, T.M., Dorman, D.J.H., Deans, G.S., Biondi, D.M., Ruberto, G. 1998, Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essential Oil Res.*, 10, 618.
11. Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A. 1998, Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3741.
12. Pass, G.J., McLean, S., Stupans, I., Davies, N.W. 2002, Microsomal metabolism and enzyme kinetics of the terpene *p*-cymene in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), koala (*Phascolarctos cinereus*) and rat. *Xenobiotica.*, 32, 383.
13. Harder, J., Probian, C. 1995, Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3804.
14. Häner, A., Höhener, P., Zeyer, J. 1995, Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3185.
15. Harms, G., Rabus, R., Widdel, F. 1999, Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon *p*-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.*, 172, 303.
16. Kiskó, G., Roller, S. 2005, Carvacrol and *p*-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiol.*, 5, 36.
17. Eaton, R.W. 1997, *p*-Cymene Catabolic Pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and Characterization of DNA Encoding Conversion of *p*-Cymene to *p*-Cumate. *J. Bacteriol.*, 179, 3171.
18. Custódio, J.B.A., Ribeiro, M.V., Silva, F.S.G., Machado, M., Sousa, M.C. 2011, The essential oils component *p*-cymene induces proton leak through Fo-ATP synthase and uncoupling of mitochondrial respiration. *J. Exp. Pharmacol.*, 3, 69.
19. Gill, A.O., Holley, R.A. 2006, Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, 1.
20. Brul, S., Coote, P. 1999, Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 1.
21. Logroscino, G., Hesdorffer, D.C., Cascino, G., Annegers, J.F., Hauserm W.A. 2001, Time trends in incidence, mortality, and case-fatality after first episode of status epilepticus. *Epilepsia.*, 42, 1031.
22. Claassen, J., Lokin, J. K., Fitzsimmons, B.F.M., Mendelsohn, F.A., Mayer, S. A. 2002, Predictors of functional disability and mortality after status epilepticus. *Neurology.*, 58, 139.

23. De Lorenzo, R.J., Hauser, W.A., Towne, A.R., Boggs, J.G., Pellock, J.M., Penberthy, L., Garnett, L., Fortner, C.A., Ko, D. 1996, A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology*, 46, 1029.
24. Lowenstein, D.H., Alldredge, B.K. 1998, Status epilepticus. *N. Engl. J. Med.*, 338, 970.
25. Lowenstein, D.H., Bleck, T., Macdonald, R.L. 1999, It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia*, 40, 120.
26. Jenssen, S., Gracely, E.J., Sperling, M.R. 2006, How long do most seizures last? A systematic comparison of seizures recorded in the epilepsy monitoring unit. *Epilepsia*, 47, 1499.
27. De Lorenzo, R.J., Waterhouse, E.J., Towne, A.R., Boggs, J.G., Ko, D., De Lorenzo, G.A., Brown, A., Garnett, L. 1998, Persistent nonconvulsive status epilepticus after the control of convulsive status epilepticus. *Epilepsia*, 39, 833.
28. Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., Turski, L. 1991, Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 32, 778.
29. Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleironk, Z., Turski, L. 1983, Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.*, 9, 315.
30. Cavalheiro, E.A., Fernandes, M.J., Turski, L., Naffah-Mazzacoratti, M.G. 1994, Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia*, 35, 1.
31. Todorova, V.K., Harms, S.A., Kaufman, Y., Luo, S., Luo, K.Q., Babb, K., Klimberg, V.S. 2004, Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res. Tr.*, 88, 247.
32. Almeida, A.A., Costa, J.P., Carvalho, R.B., Sousa, D.P., Freitas, R.M. 2012, Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Res.*, 1448, 56.
33. Marinho, M.M.F., Sousa, F.C.F., Bruin, V.M.S., Vale, M.R., Viana, G.S.B. 1998, Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem. Int.*, 33, 299.
34. Freitas, R.M., Sousa, F.C.F., Vasconcelos, S.M.M., Viana, G.S.B., Fonteles, M.M.F. 2004, Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 78, 327.
35. Shorvon, S.D. 2001, The management of status epilepticus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 70, ii22.
36. Meena, A.K., Prasad, V.S., Kaul, S. 2000, Neurological intensive care in India: disease spectrum and outcome. *Neurol. India*, 48, 51.
37. Chauhan, A.K., Dobhal, M.P., Joshi, B.C. 1988, A review of medicinal plants showing anticonvulsant activity. *J. Ethnopharmacol.*, 22, 11.

38. Cheymol, J. 1950, Experimental convulsions and anti-epileptic drugs. *Actual. pharmacologiques.*, 2, 1.
39. Shivakumar, B.R., Anandatheerthavarada, H.K., Ravindranath, V. 1991, Free radical scavenging system in developing rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9, 181.
40. Castagne, V., Gastschi, M., Lefevre, K., Posada, A., Clarke, P.G.H. 1999, Relationship between neuronal death and cellular redox status, focus on the developing nervous system. *Prog. Neurosurgery.*, 59, 397.
41. Nanda, D., Tolputt, J., Collard, K.J. 1996, Changes in brain glutathione levels during postnatal development in the rat. *Dev. Brain Res.*, 94, 238.
42. Jenner, P. 1998, Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 13, 24.
43. Adesina, S.K. 1985, Constituents of *Solanum dasycarpum* fruit. *J. Nat. Prod.*, 48, 147.
44. Chang, C.C. 1983, Isolation and structure determination of biologically active compounds from the plant-kingdom. *Dissertation Abstracts International Section B.*, 43, 3567.
45. Al Khani, R., Assaad, F. 2008, Histopathological findings in chronic pharmacoresistant temporal epilepsy: A pathognomonic combination of lesions maintaining neuron injury? *Pan Arab Journal of Neurosurgery*, 12, 86.
46. Avoli, M. 1993, Electrophysiology and pharmacology of human neocortex and hippocampus *in vitro*. In: Schwartzkroin, P.A. (Ed.), *Epilepsy: Models, Mechanisms and Concepts*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 244.
47. Avoli, M., Schwartzkroin, P.A. 1993, Electrophysiology and pharmacology of human neocortex and hippocampus *in vitro*. In: Schwartzkroin, P.A. (Ed.), *Epilepsy: Models, Mechanisms and Concepts*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 506.
48. Avoli, M., Williamson, A. 1996, Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained *in vitro*. *Prog. Neurobiol.*, 48, 519.
49. Babb T.L., Brown W J., Pretotius J. K., Davenport C., Lieb J.P., Crandall P.H. 1984, Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.*, 25, 729.
50. Babb T.L., Wilson C.L., Isokawa-Akesson M. 1987, Firing pattern of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 6, 467.
51. De Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Robbins, R.J., Spencer, D.D. 1989, Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*, 495, 387.
52. Falconer, M.A., Serafetinides, E., Corsellis, J.A.N. 1964, Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol.*, 10, 233.
53. Sommer, W. 1880, Erkrankung des Ammonshorns als etiologisches Moment des Epilepsie. *Arch. Psychiat. Nervenkrankh.*, 10, 631.
54. Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretotius J.K., Crandall, P.H., Levesque, M.F. 1991, Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience.*, 42, 351-363.
55. Falconer, M.A. 1974, Mesial temporal (Ammon's horn) sclerosis as a common cause of epilepsy. Aetiology, treatment and prevention. *Lancet II*, 767.

56. Falconer, M.A., Taylor, D.C. 1968, Surgical treatment of drug resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. *Archs Neurol.*, 19, 353.
57. Green, J.R. 1967, Temporal lobectomy, with special reference to selection of epileptic patients. *J. Neurosurg.*, 26, 584.
58. Guimares, P.O., Kim, J.H., Lanerolle, N.C., Robbins, R.J., Spencer, D.D. 1988, A quantitative evaluation of hippocampal neuronal loss in temporal lobe epilepsy without primary glial tumor. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 47, 372.
59. Lieb, J.P., Babb, T.L., Engel, J. 1989, Quantitative comparison of cell loss and thiopental-induced EEG changes in human epileptic hippocampus. *Epilepsia.*, 30, 147.
60. Engel, J.Jr. 1993, Update on surgical treatment of the epilepsies: summary of the second international Palm Desert conference on the surgical treatment of the epilepsies. *Neurology.*, 43, 1612.
61. Margerison, J.H., Corsellis, J.A.N. 1966, Epilepsy and the temporal lobe. *Brain.*, 89, 499.
62. Gage, F.H., Olejniczak, P., Armstrong, D.M. 1998, Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. *Expl. Neurol.*, 102, 2.
63. Steriade, M. 2001, *The Intact and Sliced Brain*. The MIT Press, Cambridge, MA.
64. Koza, R., Ayyildiz, M., Coskun, S., Yildirim, M., Agar, E. 2007, The influence of ethanol intake and its withdrawal on the anticonvulsant effect of α -tocopherol in the penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Neuro Toxicol.*, 28, 463.
65. Gaby, A.R. 2007, Natural approaches to epilepsy. *Altern. Med. Rev.*, 12, 9.
66. Freitas, R.M., Jordan, J., Feng D. 2010, Lipoic acid effects on monoaminergic system after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci. Lett.*, 477, 129.
67. Barros, D.O., Xavier, S.M.L., Barbosa, C.O., Silva, R.F., Maia, F.D., Oliveira, A.A., Freitas, R.M. 2007, Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci. Lett.*, 416, 227.
68. Xavier, S.M.L., Barbosa, C.O., Barros, D.O., Silva, R.F., Oliveira, A.A., Freitas, R.M. 2007, Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neurosci. Lett.*, 420, 76.
69. Santos, I.M.S., Freitas, R.L.M., Silva, E.P., Feitosa, C.M., Saldanha, G.B., Souza, G.F., Tomé, A.R., Feng D., Freitas, R.M. 2010, Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Brain Res.*, 1315, 33.
70. Ayyildiz, M., Yildirim, M., Agar, E. 2006, The effects of vitamin E on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Exp. Brain Res.*, 174, 109.
71. Ayyildiz, M., Coskun, S., Yildirim, M., Agar, E. 2007a, The involvement of nitric oxide in the anticonvulsant effects of α -tocopherol on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsy Res.*, 73, 166.
72. Ayyildiz, M., Coskun, S., Yildirim, M., Agar E. 2007b, The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsia* 48, 1388-1395.
73. Freitas, R.M. 2011, Antioxidant Treatments: Effect on Behaviour, Histopathological and Oxidative Stress in Epilepsy Model. In: Amit Agrawal;

Aleksandar Lazinica. (Org.). *Brain Injury - Pathogenesis, Monitoring, Recovery and Management*. Rijeka, Croatia: InTech - Open Access Publisher, p. 393.

74. Oliveira, A.A., Nascimento, V.S., Freitas, R.M., Sousa, F.C.F., Vasconcelos, S. M.M., Viana, G.S.B., Fonteles, M.M.F. 2005, Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: cholinergic muscarinic system involvement. *Neurosci. Lett.*, 385, 184.
75. Freitas, R.M. 2009, The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci. Lett.* 455,140.
76. Freitas, R.M., Sousa, F.C.F., Vasconcelos, S.M.M., Viana, G.S.B., Fonteles, M.M.F. 2003, Acute alterations of neurotransmitters levels in striatum of young rat after pilocarpine-induced status epilepticus. *Arg. Neuropsiq.*, 61, 430.
77. Barbosa, K.B.F., CostaI, N.M.B., Alfenas, R.C.G., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J. 2010, Oxidative stress: concept, implications and modulating factors *Rev. Nutr.* 23, 629.

ANEXO B:

**Confirmação de submissão à Revista Brasileira de
Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**

FW: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão

> To: rivelilson@pq.cnpq.br
> Subject: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão
> Date: Mon, 22 Oct 2012 13:37:04 -0200
> From: seerfcfar@gmail.com
>
> Rivelilson Mendes Freitas,
>
> Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Um possível mecanismo para o
> efeito anticonvulsivante do p-cimeno" para {\$Revista de Ciências
> Farmacêuticas Básica e Aplicada}.
>
> URL do Manuscrito: > [http://serv-
bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/2672](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/2672)
> Login: river
>
> Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email:
> rcfba@fcfar.unesp.br.
> Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir
> ao público seu trabalho.
>
>
> {\$Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta}
> {\$Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda}
> {\$Editores}
> Rivelilson Mendes de Freitas
> Prof. Dr. Cleópatra da Silva Planeta
> Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
> http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/index
> rcfba@fcfar.unesp.br