

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

Cleide Correia de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO
CARYOCAR coriaceum WITTM**

Santa Maria RS

2016

Cleide Correia de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO *CARYOCAR*
coriaceum WITTM**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para o título de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Cleide Correia de
Avaliação do potencial anticonvulsivante do *Caryocar coriaceum* Wittm. / Cleide Correia de Oliveira.-2016.
96 f.; 30cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Coorientador: Irwin Rose Alencar de Menezes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Produtos naturais 2. *Caryocar coriaceum* Wittm 3. Cariófileno 4. Epilepsia 5. Convulsão I. Oliveira, Mauro Schneider II. Menezes, Irwin Rose Alencar de III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Cleide Correia de Oliveira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

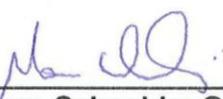
E-mail: cleidecorreia27@hotmail.com

Cleide Correia de Oliveira

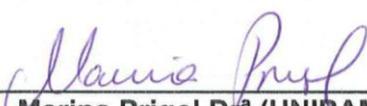
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO CARYOCAR
coriaceum WITTM**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para o título de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

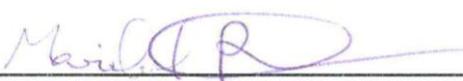
Aprovada em: 08 de abril de 2016.



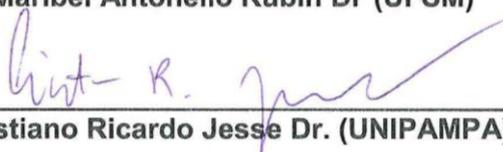
**Mauro Schneider Oliveira Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador**



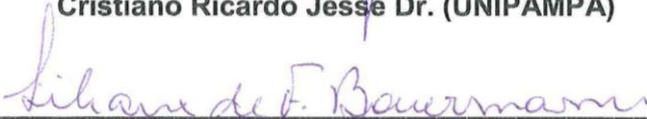
Marina Prigol Dr^a (UNIPAMPA)



Maribel Antonello Rubin Dr^a(UFSM)



Cristiano Ricardo Jesse Dr. (UNIPAMPA)



Liliane de Freitas Bauermann Dr^a (UFSM)

Santa Maria, RS

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu irmão Antônio Correia de Oliveira Neto (*in memoriam*),
que onde está com certeza estará vibrando com minha vitória

“Cleidinha, tudo certo, tudo planejado, tudo certo!”

ACONeto 2013.

AGRADECIMENTOS

E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas

E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar

Gonzaguinha Caminhos do Coração

Chegou o momento de agradecer a tantas e tantas pessoas que passaram pelo meu caminho... E assim começo os meus agradecimentos !

Certamente muitas pessoas contribuíram para a realização e finalização deste estudo, das diferentes formas: discutindo o tema, estimulando a seguir na trajetória, dicas de referências, ideias de testes, envio de materiais, explicando as diversas técnicas, enfim foram tantas as contribuições. Sem desconsiderar a contribuição de todos, gostaria de destacar algumas pessoas que deixaram as suas marcas.

A Deus o Senhor de todo o Universo e todas as coisas ! Minha luz, meu refúgio, meu leme em todos os momentos da vida.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira , pela oportunidade de fazer o estudo e aceitar a orientação ao primeiro e-mail. Obrigada pelo brilhantismo acadêmico com que conduziu a pesquisa, presente em todos os momentos dos experimentos, revisando, planejando e sempre com paciência competência e simplicidade. Foi insubstituível no seu papel! Sou muito grata por ter entendido as minhas limitações e limites. E nem por isso deixou de me instigar a ir em frente e vivenciar o momento dos experimentos Meu muito obrigada!

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Irwin Rose Alencar, pelas dicas e conversas valiosas no seu conteúdo, sempre querendo o melhor conhecimento no desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Dr. João Batista pela oportunidade oferecida e como conduziu todo o processo do curso com sua sabedoria, competência, atenção e simplicidade.

Ao prof. Dr Antônio Álamo pela atenção, pela disponibilidade manifestada, pelo valioso apoio e entusiasmo na concretização do DINTER.

Aos queridos e amados Herson e Hércules, dádiva divina na minha vida, obrigada por tudo nessa caminhada, pela força que me deram possibilitando meu mergulho para concluir o trabalho porque souberam entender a minha ausência.

A minha linda e querida “MAEZINHA”, obrigada pela minha formação, dedicação, esforço, cuidado, apoio, valores, sabedoria e amor prestados a mim e aos meus filhos durante toda a vida.

Ao meu pai Mário Correia de Oliveira e ao meu Irmão Rômulo Correia de Oliveira (*in memoriam*), que com certeza estarão sempre torcendo por mim.

Ao meu irmão Antônio Correia de Oliveira Neto, um enorme obrigada, por acreditar sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida, pelos momentos alegres que passamos juntos nessa vida. Obrigada por me ensinar as primeiras letras, quando iniciava os meus estudos ainda criança. Obrigada pela caminhada nessa jornada, sempre pronto quando precisava para coletar o material na chapada e as idas e vindas à URCA. Obrigada por todos os ensinamentos! Obrigada por cuidar dos meus filhos e de mamãe na minha ausência! Obrigada por tudo! Que DEUS o tenha em um bom lugar. Valeu ! Valeu mesmo! Meu irmão! Saudades! Lindo ! Muito Lindo mesmo!

Ao Mario Correia de Oliveira Júnior, meu obrigada por sacrificar seus feriados para coletar o material na Chapada do Araripe, Ceará, que sorria ao fazermos junto a exsicata, vibrava pela minha conquista e entusiasmado com a perspectiva dos resultados finais.

Ao Mário Correia de Oliveira Neto pela preocupação dedicação e entusiasmo no resultado final. Adoro você !

Aos queridos sobrinhos, Mário Correia de Oliveira Neto, Ana Hirlene e Hilana Hévila, Antônio Lieberth pela compreensão e ternura sempre manifestadas pela excitação e orgulho com que sempre reagiram aos resultados acadêmicos ao longo dos anos. Espero que o entusiasmo, seriedade, luta e empenho que dedico ao trabalho lhes possam servir de estímulo para fazerem sempre e sempre “mais e muito melhor”.

A minha querida a doce e pequena Yasmin, pelo sorriso, alegria e momentos de descontração e ternura vivenciados ao longo do estudo, sempre presente querendo escrever também.

A Waldizia Correia de Oliveira pelas orações e força na minha jornada, sempre disposta a ajudar em todos os aspectos. Meu muito obrigada!

A Profa. Zenira Cardoso de Oliveira, (Tia Zenira), agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição. Sempre prestativa e firme nos seus conselhos. Um apoio incomensurável sempre ao longo da minha existência.

A Maria das Graças Correia de Oliveira, pela preocupação pela excelente amizade, e apoio manifestados não só nas minhas viagens de deslocações para Santa Maria, mas ao longo dos anos sempre prestativa.

A Terezinha Gomes de Azevedo, pela força e orações e pelas horas que tirou de si e de sua família para dedicá-las a mim. Você sabe.

Aos colegas Antônia Eliene, Luiz Marivando, Dennyra Galvão, Francisco Cunha, pelo companheirismo, apoio e momentos prazerosos de trabalho.

A Sandra Mara Duavy, Pimentel (Sandrinha) pelos momentos de descontração na jornada e pelas palavras acolhedoras nos momentos difíceis. O meu agradecimento sempre.

A Fabiola Fernandes, pelas discussões muito proveitosas e por estar sempre disponível as dúvidas e pelo uso dos equipamentos no laboratório.

Ao Departamento e Coordenação de Enfermagem da URCA pela compreensão e as ausências ao assumirem a minha carga horária;

A profa Dra. Marta Almeida pelos encontros na Universidade e pelas discussões muito proveitosas.

Aos membros da banca de qualificação, cujas sugestões foram fundamentais para a finalização desta tese.

Ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, na pessoa do Dr. José Galberto Martins da Costa pelas valiosas contribuições na realização dos experimentos e por gentilmente me cederem espaço em seu laboratório.

A Andeciele Rolim pela força e atenção e por estar sempre prestativa. Obrigada por tudo!

A Leonice, minha madrinha pela força apoio e orações nessa caminhada e pelas as preocupações ao longo da jornada da minha vida;

A Elizângela Beneval, a quem agradeço-lhe a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos na caminhada.

A Profa. Msc. Erine Dantas, pela atenção, disponibilidade, delicadeza ao me ouvir e pela colaboração inestimável.

A Profa. Gleice Adriana, atenção, conselhos e conversas proveitosas toda a caminhada.

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas, pelas ideias e conversas e sugestões que muito contribuíram para a produção desta tese, foi a luz inicial na grande caminhada.

A profa. Dra. Arlene Pessoa, agradeço também pela amabilidade e boa disposição em todos os momentos.

A URCA e Pró-reitoria de Pós-graduação e pesquisa PrPgP na realização do programa DINTER em parceria com A Universidade Federal de Santa Maria;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em, pela oportunidade e oferta do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica -DINTER.

À Família do Laboratório de Produtos Naturais, Samara, Erlanio, Fábio, Valdir, Thiago, Janaina. Muito obrigada pela acolhida!

Ao prof Dr. Germane Alves Pinto, agradeço todo o auxílio e apoio e disponibilidade com os materiais, enviando-os sempre que necessário.

A Maria Eugênia Alves Almeida que me incentivou constantemente a permanecer nesta caminhada e ao longo da nossa jornada de trabalho, sempre ao meu lado.

Aos professores do Programa DINTER: Dr. João Batista Teixeira da Rocha, Dr. Félix Antunes Soares, Dr. Jeferson Luis Franco, Dr. Mauro Schneider de Oliveira, Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. Maria Ester Pereira, Dra. Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dra. Roselei Fachinetto, Vera Maria Morsch, Dra. Thais Posser.

Ana Flávia Furian pela atenção e disponibilidade e por toda ajuda e em ceder o espaço em seu laboratório,

A Clarissa Vasconcelos de Oliveira, Jéssica Grigoletto, Naieli Schiefelbein Souto, pela parceria no aprendizado por me ensinarem as diversas técnicas de laboratório que foram indispensáveis para a realizações dos experimentos.

À Família do Labneuro: Clarissa Vasconcelos de Oliveira, Jéssica Grigoletto, Leandro Rodrigo Ribeiro, Vinícius Rafael Funck, Ana Cláudia Beck Grauncke, Thaíze Lopes de Souza Naieli Schiefelbein Souto, cujas ajudas foram de fundamental importância para a realização desse trabalho e pela acolhida durante todo o período.

Aos colegas Tonny Emanuel, Andréia Couto, Alessandra Bezerra de Brito, Ana Maria Machado, Milena Alencar, Maria Lys Callou, Halana Cecília, Luciana Bessa , Maria Socorro nascimento, obrigada pela colaboração inestimável,

A Miyura, Bobinho Pêpê e Nin, pelos momentos de alegria e descontração nessa jornada sempre ao meu lado com alegria;

A Elvandar, pela receptividade e delicadeza e disponibilidade ao atendimento sempre que precisei;

Aos funcionários do Departamento de Enfermagem e Biologia; Emanuele, Gilvania, Evilene, Luciana, Laura, pela boa vontade e prontidão ao me ajudar.

A CAPES pelo apoio financeiro

E a todos que de uma maneira ou de outra colaboraram na realização dessa tese. Agradeço !!!

Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há
pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam,
mas há pessoas que simplesmente aparecem em
nossas vidas e nos marcam para sempre.

Cecília Meireles

É melhor tentar e falhar do que se preocupar em ver a vida passar, é melhor tentar, embora em vão, do que ficar sem fazer nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar do que em dias tristes em casa me esconder, prefiro ser feliz embora louco do que em conformidade viver...

Martin Luter King

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO *CARYOCAR CORIACEUM* WITTM

AUTORA: Cleide Correia de Oliveira
ORIENTADOR: Dr. Mauro Schneider Oliveira
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

A epilepsia é uma doença crônica que afeta aproximadamente 1-2% da população mundial, e é caracterizada pela ocorrência de crises convulsivas espontâneas e recorrentes que são causadas por uma descarga anormal e sincronização de diferentes neurônios. A epilepsia é considerada um dos problemas neurológicos mais frequentes, acometendo as pessoas independente da idade, sexo, cultura e fator econômico. Devido ao elevado número de pacientes com epilepsia que apresentam convulsões refratárias aos fármacos disponíveis, torna-se importante a busca por novas substâncias com potencial anticonvulsivantes, e os produtos naturais constituem uma fonte promissora de novos fármacos. Na parte mais setentrional do nordeste brasileiro é encontrada a espécie *Caryocar coriaceum* Wittm.(pequi), que exerce importante papel sócio-econômico na Chapada do Araripe e circunvizinhanças nos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, mas que carece de estudos de atividade biológica. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anticonvulsivante da administração oral do óleo fixo da polpa e do cariofileno, componente presente na polpa de *Caryocar coriaceum* Wittm, (pequi) em um modelo de crise epiléptica em camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6. A administração oral do óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceum* (100 mg/kg, v.o.) mostrou uma atividade anticonvulsivante significativa contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Nenhum efeito adverso foi detectado sobre as funções motoras nos testes do campo aberto, rotarod, nado forçado e reconhecimento de objetos. No presente estudo verificou-se que o óleo apresentou um potencial antioxidante eficaz em um método de redução de radicais livres (DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Esta atividade antioxidante pode contribuir para o efeito anticonvulsivante do óleo fixo. Além disso, o β -cariofileno (100 mg/kg, i.p.) aumentou a latência para as crises mioclônicas induzidas por PTZ, sem causar alterações na performance dos animais no teste do campo aberto, nado forçado e rotarod. Entretanto, este composto natural melhorou o desempenho dos animais no teste do reconhecimento de objetos. O β -cariofileno não afetou as mudanças induzidas por PTZ sobre os marcadores de estresse oxidativo (aumento de TBARS e diminuição nos níveis de NPSH). Portanto, com base nos resultados obtidos, podemos sugerir que o óleo fixo da polpa e o β -cariofileno apresentam potencial anticonvulsivante, embora estudos complementares devem ser desenvolvidos para avaliar o mecanismo dos efeitos observados e sua segurança.

Palavras-chave: Produtos naturais. *Caryocar coriaceum* Wittm. Cariofileno. Epilepsia. Convulsão.

ABSTRACT

POTENTIAL EVALUATION ANTICONVULSANT *CARYOCAR coriaceum* WITTM

AUTHOR: Cleide Correia de Oliveira
ADVISOR: Dr. Mauro Schneider Oliveira
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Epilepsy is a chronic disease that affects approximately 1-2% of the world population and is characterized by the occurrence of spontaneous recurrent seizures that are caused by an abnormal discharge and synchronization of different neurons. Epilepsy is one of the most frequent neurological disorders and affects people regardless of age, gender, culture and economic factor. Since a significant number of patients with epilepsy present seizures refractory to available anticonvulsant drugs, it becomes important to search for new substances with anticonvulsant potential, and natural products are a promising source. In the most sententrional portion of the Brazilian Northeast is found the *Caryocar Coriaceum* Wittm-pequi species, which plays an important socio-economic role in the Araripe plateau and surroundings, in the states of Ceará, Pernambuco and Piauí, but studies for its biological activity are only a few. The main purpose of this study is to evaluate the anticonvulsant potential of the fixed oil from the pulp of *Caryocar Coriaceum* Wittm and of the β -caryophyllene which is present in the fruit pulp in a model of epileptic seizures in C57BL/6 mice. Administration of the fixed oil from the pulp of the *Caryocar Coriaceum* (100 mg/kg, v.o.) resulted in a anticonvulsant activity against myoclonic seizures induced by pentilenotetrazol (PTZ). No adverse reaction on the motor functions was detected in the open field, rotarod, forced swimming or object recognition tests. We verified that the oil presented an efficient antioxidant potential in a free radical reduction method (DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Such antioxidant activity may contribute to the anticonvulsant effect of the fixed oil. The β -caryophyllene (100 mg/kg, i.p.) also increased the latency to the mioclonic seizures induced by the PTZ, without changing the animals performances in the open field test, forced swim or rotarod test. Nevertheless, this natural compound increased the mice performance in the object recognition test. The β -caryophyllene did not affect the changes induced by PTZ on the oxidative stress markers (TBARS increase and decrease of the levels of NPSH). Based on the present results, it can be suggested that the fixed oil from the pulp of *Caryocar Coriaceum* Wittm and β -caryophyllene display anticonvulsant potential. Complementary studies must be carried out to evaluate the safety and underlying mechanisms of the anticonvulsant effects.

Key words: Natural products. *Caryocar coriaceum* Wittm. β - Caryophyllene. Epilepsy. Seizure

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. - Diagrama resumo da revisão terminológica para a organização de crise e epilepsias da ILAE de 2010 | 30 |
| Figura 2. - Visão geral dos modelos de crise epiléptica ou de epilepsia adaptada de Locher 2011 | 34 |
| Figura 3. - Bacia Sedimentar da Chapada do Araripe Ce | 38 |
| Figura 4. - Bacia Sedimentar da Chapada do Araripe Ce/ cidades | 39 |
| Figura 5. - O pequizeiro | 40 |
| Figura 6. - Frutos do <i>Caryocar coriaceum</i> | 41 |
| Figura 7. - Flores e folhas e prato típico do <i>Caryocar coriaceum</i> | 41 |
| Figura 8. - Estrutura química do β - Cariofileno | 46 |

LISTAS DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Constituição do fruto do <i>Caryocar coriaceum</i> | 42 |
| Quadro 2 - Relação de alguns dos componentes voláteis encontrados no óleo de <i>Caryocar Brasiliense</i> | 47 |

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- BC- β - Cariofileno
- DAE - Droga antiepiléptica
- ILAE - Liga Internacional Contra a Epilepsia
- MES - Eletrochoque máximo
- OFCC - Óleo fixo do *Caryocar coriaceum*
- PTZ - Pentilenotretazol

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 | Objetivos geral..... | 23 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 23 |
| 3 | REFERENCIAL | 25 |
| 3.1 | Epilepsia..... | 25 |
| 3.2 | Epilepsia conceitos Gerais | 28 |
| 3.3 | Aspectos Epidemiológico e Comorbidades da Epilepsia..... | 30 |
| 3.4 | Fármacos Anticonvulsivantes | 32 |
| 3.5 | Modelos Experimentais de Crise Epilépticas | 33 |
| 4 | CARYOCAR CORIACEUM :UM FRUTO DA CHAPADA DO ARARIPE CEARÁ..... | 37 |
| 4.1 | Caracterização Botânica do Pequi (<i>CARYOCAR coriaceum</i> WITTM) | 39 |
| 4.2 | Importância econômica do <i>Caryocar coriaceum</i> | 43 |
| 4.3 | Uso da <i>Caryocar coriaceum</i> na Medicina popular | 44 |
| 4.4 | β - Cariofileno | 46 |
| 5 | ARTIGOS CIENTÍFICOS..... | 49 |
| 5.1 | ARTIGO 1..... | 50 |
| 5.2 | ARTIGO 2..... | 70 |
| 6 | DISCUSSÃO | 77 |
| 7 | CONCLUSÃO | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |

1 INTRODUÇÃO

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história a epilepsia foi considerada uma doença provocada por causas sobrenaturais, e por séculos pessoas com epilepsia foram mantidas afastadas do meio social (MARCHETTI et al., 2005). Assim como a loucura e as doenças contagiosas a epilepsia sempre foi uma doença estigmatizada, e em decorrência disso muitos pacientes com epilepsia são vítimas de preconceito (MOREIRA, 2004). A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais frequentes e graves que afeta o paciente de forma progressiva e crônica, e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a epilepsia é uma doença grave que afeta 50 milhões de pessoas em todo o mundo, em todas as idades (WHO, 2012; DICHTER, 2007).

A característica marcante da epilepsia é a ocorrência de crises epiléticas recorrentes e espontâneas, que são causadas por uma descarga anormal de neurônios presentes em diferentes áreas do encéfalo (SANDER 2003; FISCHER et al., 2005; LÖCHER, 2011). Mais especificamente, a Liga Internacional de Epilepsia (*International League Against Epilepsy* - ILAE) define a epilepsia como uma doença cerebral causada pela predisposição a gerar crises epiléticas, pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição (FISHER et al., 2014). É um sério problema de saúde acometendo indivíduos em todas as idades, raças e classes socioeconômicas (GUERREIRO et al., 2000), e em decorrência de crises epiléticas e alterações comportamentais e/ou motoras acarretam enorme prejuízo à qualidade de vida dos pacientes afetados e suas famílias (BEN-MENACHEM et al., 2007).

Nos países desenvolvidos, a prevalência da epilepsia está em torno de 0,5% a 0,7% da população, e nos países em desenvolvimento, em torno de 1,5% a 2% da população (NETO e MARCHETTI, 2005). Nos países em desenvolvimento as causas da epilepsia são em uma grande parte atribuíveis a doenças parasitárias (principalmente neurocisticercose), infecções intracranianas virais ou bacterianas, traumatismo crânioencefálico (TCE) e doenças cerebrovasculares (SENANAYAKE, 1993; GOMES, 1994; SCOTT, 2001). A doença infecciosa do sistema nervoso central (SNC) é uma causa importante de foco epileptogênico perfazendo 3% de todas as causas de crises convulsivas, sendo que 22 a 33% das pessoas com cisticercose podem manifestar crises epiléticas. Estudos epidemiológicos mostram

que até 80% dos pacientes com malária apresentam convulsões durante a inflamação aguda. Além disso, pacientes com encefalite causadas por diversos agentes apresentam convulsões, que podem persistir mesmo após eliminação do agente infeccioso e são atenuadas com o tratamento com anti-inflamatórios (HAUSE, 1975; SINGH e PRABHAKAR, 2008).

Apesar do sucessivo desenvolvimento de novos fármacos antiepiléticos (AEDs) nas últimas décadas, a procura por novas terapias com uma melhor eficácia e tolerância permanece como um objetivo importante. Sistemas terapêuticos monoterápicos com anticonvulsivantes promovem o controle das convulsões em aproximadamente 70 a 80% dos pacientes, porém, um número significativo de pacientes, em torno de 20 a 30%, continua a apresentar convulsões não-controláveis, mesmo com o uso de vários fármacos (SANDER, 1993; BEN-MENACHEM et al., 2007). Assim, o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção de convulsões é importante para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes, dependendo fortemente do uso pré-clínico de modelos animais para estabelecer primeiramente a eficácia e a segurança antes dos primeiros testes em humanos (LÖSCHER, 2011).

Considerando a perspectiva histórica é possível observar que os produtos naturais assumem papel relevante para a descoberta de novas fármacos, estando presentes ao longo da evolução da humanidade como ferramentas para cura e tratamento de doenças (NEWMAN et al., 2003). De fato, apesar dos grandes avanços tecnológicos e novas formas de tratamento propostas nas últimas décadas, as plantas medicinais continuam sendo muito utilizadas, e estima-se que cerca de 25% a 30% de todas as fármacos avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008). Nesse contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) acredita que a prática do uso de plantas medicinais é tida como uma das principais opções terapêuticas para aproximadamente 80% da população mundial (PINTO, 2002).

As plantas medicinais têm um importante papel não só na saúde mundial, mas também no Brasil, em particular no Nordeste Brasileiro, onde o uso de plantas para fins medicinais e preparações caseiras assume um importante papel para o tratamento das doenças da população, devido a fatores culturais, fatores como a escassa disponibilidade de acesso aos serviços de saúde e a riqueza da

biodiversidade contribuem para a busca de terapias alternativas ou complementares a partir de produtos naturais (MATOS, 2007).

Na região do nordeste, o estado do Ceará possui a única área de cerrado preservada que está situada na Chapada do Araripe, dentro da área da Floresta Nacional do Araripe (FLONA Araripe), correspondendo a 10.618,75 km², cerca de 27% da área total da FLONA Araripe (www.ibama.gov.br/recursosflorestais/araripe). O cerrado da Chapada do Araripe é uma disjunção situada a altitude de 800 a 900m, encravado no domínio semiárido da caatinga. Esta região apresenta uma vegetação bastante diversificada, variando de acordo com as condições climáticas da região, predominando um cerrado (formação florestal do bioma cerrado que apresenta um tipo denso de vegetação) localizado nas confluências dos Estados de Pernambuco, Ceará e Piauí, abrangendo uma área de 1.050.000 hectares, distribuídos em 35 municípios, onde vivem cerca de 700.000 mil habitantes (ACEP, 1999).

Dentre as espécies arbóreas encontradas na biorregião do Araripe, destaca-se o *Caryocar coriaceum* Wittm, que é de grande importância econômica para a região (LIMA et al., 1984). O *Caryocar coriaceum* é uma árvore, que contém um tronco grosso com cerca de 2m de diâmetro e 12 a 15m de altura, conhecido popularmente como Pequi, uma palavra indígena que significa que seu endocarpo é coberto por inúmeros espinhos delgados (MATOS, 2007).

O óleo do Pequi é utilizado na medicina popular para diversas condições, incluindo tratamento de bronquite, rouquidão, tosses, gripes, resfriados, contusões, dores de garganta, musculares e reumáticas (SILVA e MEDEIROS FILHO, 2006; MATOS, 2007). Também são atribuídas ao Pequi propriedades estimulantes da produção de bile (SANTOS et al., 2004), bem como afrodisíacas, antiabortivas, anti-inflamatórias (OLIVEIRA, CARTAXO e SILVA, 2007) e antioxidantes (MIRANDA-VILELA et al., 2008).

Considerando o potencial uso do Pequi como fonte de novos fármacos, a literatura ainda é escassa em informações sobre suas ações biológicas, mas progressos importantes têm sido feitos. De fato, foi demonstrado que a aplicação tópica do óleo fixo da polpa do Pequi acelera o processo de contração de incisão na orelha de ratos, sugerindo um aumento na velocidade de reparo da lesão (QUIRINO et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que as lesões gástricas induzidas por etanol e ácido acetilsalicílico foram prevenidas pela administração oral de óleo fixo da polpa do Pequi (QUIRINO et al., 2009). Adicionalmente, foi demonstrado que o

óleo fixo da polpa do Pequi apresenta atividade anti-inflamatória tópica significativa contra uma série de agentes químicos aplicados na orelha de camundongos (SARAIVA et al., 2011). A atividade anti-inflamatória foi caracterizada por redução no edema de orelha induzido por óleo de croton ou ácido araquidônico e diminuição da migração de células inflamatórias (neutrófilos polimorfonucleares) (SARAIVA et al., 2011). Em conjunto, estes estudos demonstram que o óleo fixo da polpa do Pequi apresenta um potencial anti-inflamatório significativo, e sugerem que o mesmo pode ter outras atividades biológicas importantes.

Diversos dados clínicos e experimentais indicam uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e a ocorrência de convulsões, e os mediadores da inflamação como agentes prováveis deste mecanismo de excitabilidade aumentada. Além disso, fármacos utilizados clinicamente como anti-inflamatórios também podem possuir ação anticonvulsivante (MELLO E OLIVEIRA; 2014). Considerando este ponto, e na luz dos efeitos anti-inflamatórios já descritos na literatura para o óleo fixo do Pequi, o presente estudo foi realizado para investigar o potencial anticonvulsivante desta preparação e do β -cariofileno constituinte da polpa do Pequi em um modelo experimental amplamente utilizado na descoberta de novos compostos com atividade anticonvulsivante.

2 OBJETIVOS

Somos constituídos da mesma
substância de que
são feitos os sonhos e a
nossa vida está rodeada
pela inconsciência.

William Shakespeare

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anticonvulsivante do óleo fixo da polpa do Pequi e do β -cariofileno no modelo experimental de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Determinar se o óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceaum* Wittm. apresenta atividade antioxidante no teste do DPPH (difeníl-picríl-hidrazina).
- 2 - Avaliar o potencial anticonvulsivante do óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceaum* Wittm. e do β -cariofileno no modelo experimental de crises epiléticas agudas induzidas por PTZ em camundongos.
- 3 - Determinar o efeito da administração do óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceaum* Wittm. de β -cariofileno de β -cariofileno sobre o desempenho dos camundongos nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos, rotarod e nado forçado.
- 4 - Determinar se a administração de β -cariofileno protege do estresse oxidativo após as crises epiléticas agudas induzidas por PTZ em camundongos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Palavra puxa palavra, uma ideia traz outra, e assim se faz um livro, um governo, ou uma revolução, alguns dizem mesmo que assim é que a natureza compôs as suas espécies.

Machado de Assis

3 EPILEPSIA

“Os homens consideram a epilepsia divina simplesmente porque não a compreendem. Mas, se chamassem de divino tudo aquilo que não compreendem, ora, as coisas divinas não teriam fim”.
Hipócrates de Cós (460-377)

3.1 HISTÓRICO

A história da epilepsia vem recheada de crenças e indicativos de possessões demoníacas ou acúmulos de humores do mal, no qual na antiguidade era considerada uma doença provocada por causas sobrenaturais. Em decorrência disso ainda hoje os portadores dessa doença são vítimas do preconceito assim como a loucura, perpetuando essas ideias, fato este que colabora com a resistência de inúmeros portadores da epilepsia na admissão do diagnóstico como também para realizarem o tratamento de forma adequada.

Por séculos, os indivíduos portadores de epilepsia foram mantidos afastados do convívio da sociedade (MARCHETTI et al., 2005). Na Roma Antiga, essas pessoas eram evitadas, pois acreditava-se que a doença era transmitida através do contágio (MASIAS, 2000; CANTILINO; CARVALHO, 2001). Galeno (131 d.C.) afirmava que as crises convulsivas eram reguladas de acordo com o ciclo lunar, apesar de considerar suas causas imediatas como “humorais” ou tóxicas, e crises relacionadas a masturbação e sexo (CANTILINO; CARVALHO, 2001).

O principal documento no Egito Antigo que trata da neurologia, o Papiro de Smith, datado por volta de 1700 a.C, relata crises convulsivas nos trechos em que descrevem indivíduos com ferimentos na cabeça (SILVA et al., 2004). Essa primeira descrição do que parece ser um ataque epiléptico está escrito na linguagem Acadiano, língua utilizada na região da Mesopotâmia. O autor descreve um paciente com sintomas assemelhando-se a epilepsia: “o pescoço vira à esquerda, as mãos e os pés são tensos e os olhos bem abertos, e de sua boca espuma está fluindo sem que tenha qualquer consciência” (LABAT, 1951). O documento chama-se *Sakikku*, descreve uma suposta possessão demoníaca relacionada aos deuses da Lua, que pelas características da descrição sugere a ocorrência de uma crise epilética

(MAGIOKINIS; SIDIROPOULOU et al., 2010), enfatizando a natureza sobrenatural da epilepsia com cada tipo de crise, associado com o nome de um espírito ou Deus, geralmente do mal, o que explica a etimologia do nome *epilepsia*, do grego *epilambanein*, que significa tomar, capturar, possuir. O tratamento era então um assunto espiritual. Esse manuscrito registra, de forma detalhada, diferentes tipos de crises de epilepsia que são reconhecidos hoje (MOREIRA, 2004; ENGEL e PEDLEY, 2008).

Na Grécia Antiga quando alguém tinha uma crise epilética durante a realização das assembleias populares (antigos comícios) o evento era imediatamente interrompido, pois a ocorrência da crise significava um sinal de descontentamento dos deuses. Nesse contexto, a epilepsia era denominada de Mal Comicial (VALE, 2008). Na cidade de Delfos, as Pitonisas (sacerdotisas do Templo de Apolo) eram vítimas de crises convulsivas após saírem de seus Oráculos, levando Platão a chamar este mal de *Morbus Divinus*, ou seja, o Mal Divino (SEIXAS, 1922).

Na história da medicina chinesa, o primeiro documento conhecido sobre a epilepsia apareceu no livro clássico de medicina interna do Imperador Amarelo-Huang Di Ching, escrito por um grupo de médicos por volta de 770 a 221 a.C. A primeira classificação da epilepsia na medicina chinesa foi feita em 610 d.C (LAI et al., 1991).

Na Idade Média, como a epilepsia era considerada um fenômeno de fisiopatologia desconhecida, atribuíam-se a ela como causa a feitiçaria, pois pregava-se que toda doença de origem desconhecida devia ser causada pela feitiçaria. A égide da religião sobre a sociedade da época impedia que a medicina avançasse nesse campo e até então, não apresentava ainda respostas pertinentes para a doença com referência tanto a fatores causais como ao tratamento (MOREIRA, 2004). As ações sobre a epilepsia se resumiam à exclusão da sociedade e penitência espiritual através da Santa Inquisição, que perseguia e condenava a fogueira (“Nau dos Loucos”) os hereges, atingindo assim os loucos e portadores de crises epiléticas (MOREIRA, 2004). Em 1494, foi lançado o manual de caçar bruxas, *Malleus maleficarum*, escrito por dois frades dominicanos vinculados a Inquisição Católica. Constava-se que a presença de crises epiléticas era uma característica de feitiçaria, e a orientação contida neste manual levou à perseguição, tortura e a morte de mais de cem mil mulheres, concluindo-se que várias delas eram portadoras de epilepsia (MASIAS, 2005).

Por volta de 400 a.C., na Grécia antiga, Hipócrates afirmou que a epilepsia não era nem sagrada nem divina, mas um distúrbio do cérebro, com suspeita de que sua origem fosse hereditária, embora ainda se acreditasse que a doença estava relacionada a aspectos místicos (MOREIRA, 2004). Os escritos da época foram os primeiros a atribuir causas físicas para as doenças neurológicas, identificando o cérebro como local-chave para o entendimento do comportamento humano (GOMES, 1997).

Somente a partir do século XVIII, as concepções sobre a epilepsia começaram a modificar-se, ganhando conceitos diferentes dos sobrenaturais. Porém, dado o forte estigma ligado à possessão e à evidência da lua, que a sociedade da época ainda acreditava influenciar nos corpos humanos com doenças por ela produzidas, essas concepções espirituais não foram totalmente sobrepujadas (MOREIRA, 2004).

A visão da epilepsia como influências ocultas ou más abrangeu partidários até mesmo na medicina durante os tempos antigos. Conseqüentemente foram prescritos tratamentos mágicos ou religiosos, algumas práticas que persistem até hoje em parte da população leiga (MASIA, 2000). No entanto, Masias (2000), afirma que foi durante o Iluminismo que a epilepsia começou a ser considerada de forma mais física do que sobrenaturais, isso devido a ajuda de avanços da anatomia, patologia, química, farmácia e fisiologia. No renascimento, houve a tentativa de definir a epilepsia como uma manifestação de doença física em lugar de uma manifestação sobrenatural (MASIA, 2000). A evolução do conhecimento sobre o transtorno é pontificado por nomes como Hipócrates, Galeno, Arateus, Avicena, Paracelsus, Willis, Boerhaave e Tissot (GOMES, 2006).

O século XIX foi marcado por muitos avanços nas ciências biológicas. Sob a marca do positivismo, estudos no campo da filosofia e da neurofisiologia, foram consolidados, repercutindo nos estudos das patologias cerebrais, dentre elas a epilepsia (MOREIRA, 2004). Entretanto, no início do século XX acreditava-se que a epilepsia era transmitida através da respiração. Portanto, nesse período foi preconizado a vacinação contra o *Bacilo Epilepticus* (YACUBIAM, 2000).

O século XX foi marcado pela evolução nas técnicas diagnósticas com o advento do Eletroencefalograma, da Ressonância Magnética e da Tomografia Computadorizada, além de outros exames como o SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) cerebral e o PET (Positron Emission Tomography), esses

dois últimos menos difundidos no Brasil. Essas técnicas possibilitaram diagnósticos mais precisos, o que é de grande valia para que o tratamento instituído seja eficaz, controlando as crises ou até levando à cura da doença, pois, é a partir da precisão do diagnóstico que se pode nortear qual a melhor adequação na terapêutica medicamentosa a ser ministrada (MOREIRA, 2004).

Os avanços científicos ao longo dos tempos foram muitos. No entanto, outros desafios são impostos para a atenção aos pacientes epiléticos, devido que nos dias atuais os pacientes portadores de epilepsia se deparam em suas vidas com o chamado “duplo estigma”, frequente relação atribuída com a doença mental, também estigmatizada. Este estigma imposto sobre pessoas com epilepsia afeta as suas famílias, vida social, emprego, perspectivas conjugais e autoestima, o que faz com que os portadores de epilepsia comumente escondam o seu problema (MARCHETTI; CASTRO; KURCGANT et al., 2005).

3.2 EPILEPSIA – CONCEITOS GERAIS

Etimologicamente, epilepsia significa *epi* (o que está acima) e *lepsis* (abater), ou seja, abater por cima, em referência a ideia difundida na Idade Média de que qualquer alteração do comportamento se deva a influência demoníaca. Pela mesma razão, também conhecida como mal sagrado, mal hediondo, mal demoníaco, mal lunático, mal comicial (na época de Plínio, durante os comícios públicos, alguns epiléticos tinham crises convulsivas) (OLIVEIRA et al., 2009).

A definição mais amplamente aceita é a classificação internacional de síndromes epiléticas, aprovada pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsia* - ILAE) na década de 1960 e que foi revisada mais recentemente em 2014. Assim, a epilepsia é considerada uma doença cerebral definida por qualquer uma das seguintes condições: 1. Pelo menos duas crises epiléticas espontâneas (não provocadas) ocorrendo com mais de 24 horas de intervalo; 2. Uma crise não provocada e uma probabilidade de novas crises semelhantes ao risco geral de recorrência após duas crises espontâneas (cerca de 60% ou mais), ocorrendo ao logo dos próximos 10 anos; 3. Diagnóstico de síndrome epilética (FISHER et al., 2014).

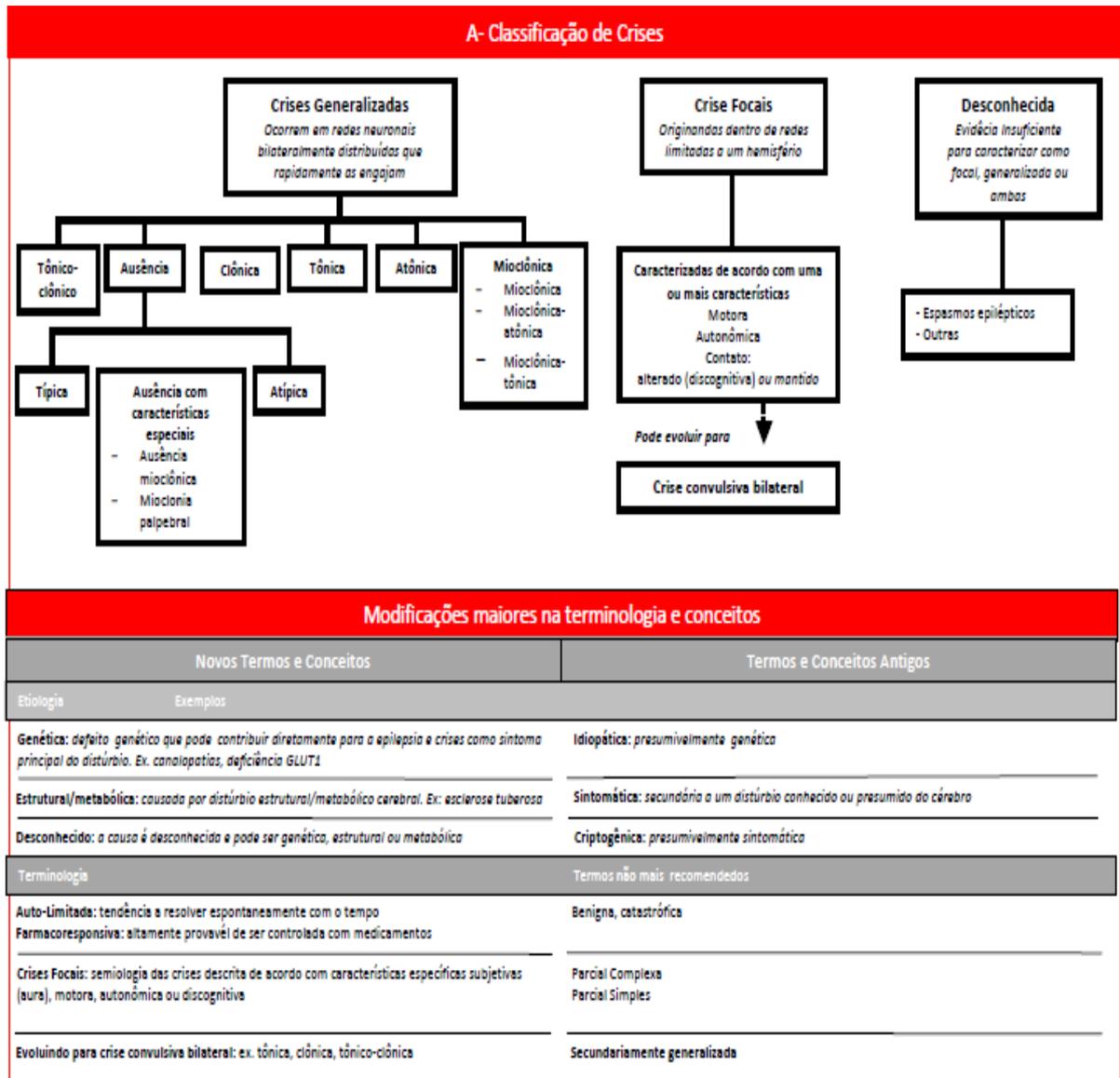
Adicionalmente ao conceito de epilepsia descrito acima, é importante mencionar que os termos crise e convulsão são muitas vezes erroneamente

considerados sinônimos de epilepsia. Eles se referem a episódios paroxísticos recorrentes de disfunções do córtex cerebral que se manifestam como alterações do comportamento estereotipado. De acordo com o grupo neuronal que dispara, as manifestações podem ser variadas, desde abalos motores dramáticos até fenômenos de experiências pouco discerníveis pelo observador (BERG et al., 2010).

O termo convulsão refere-se mais especificamente à alteração transitória do comportamento recorrente do disparo rítmico, sincrônico e desordenado de populações de neurônios cerebrais (BRUNTON, 2006). As manifestações comportamentais de uma crise convulsiva, geralmente, são determinadas pelas funções habituais do local do córtex no qual se origina a convulsão. Por exemplo, uma convulsão que envolva o córtex motor se associa a um abalo clônico da parte do corpo controlada por essa região cortical. A convulsão parcial simples está associada com a preservação da consciência, enquanto que a convulsão parcial complexa está associada com o comprometimento da consciência. A maioria destas últimas têm origem do lobo temporal. Entre as convulsões generalizadas tem-se a crise de ausência, a convulsão mioclônica e a convulsão tônico-clônica como exemplos (GOODMAN e GILMAN, 2003).

A classificação de crises epiléticas foi padronizada pela Liga Internacional contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsia* - ILAE), a partir da década de 1960 culminando com a classificação mais atual, proposta durante o 29º Congresso Internacional de Epilepsia, em agosto de 2011, pela Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE (ILAE, 2011 – Figura 1). Nesse contexto, as epilepsias podem ser classificadas a partir dos tipos de crise, sendo crises focais ou generalizadas, baseados na sua descrição e achados eletroencefalográficos. Com relação a etiologia, Berg e Scheffer (2011), faz uma divisão em três categorias: epilepsia genética, que se aplica as epilepsias que são resultados direto de um defeito genético (gene ou mecanismo identificado) ou ainda a síndromes eletroclínicas, nas quais estudos de gêmeos ou de segregação familiar mostram evidência reprodutível de base genética, como por exemplo, nas canalopatias; epilepsia estrutural/metabólica, a qual é secundária à condição estrutural ou metabólica, que eventualmente pode ter causa genética conhecida ou não; epilepsia de etiologia desconhecida inclui os casos em que, até o momento, a causa não foi identificada pelos métodos diagnósticos.

Figura 1: Diagrama resumo da Revisão terminológica para organização de crises e epilepsias da ILAE de 2010 divulgado durante o 29º Congresso da ILAE/IBE em agosto de 2011 (ILAE, 2011).



Fonte: 29º Congresso da ILAE/IBE, 2011.

3.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E COMORBIDADES DA EPILEPSIA

Há uma estimativa mundial de que, pelo menos, 65 milhões de pessoas vivem com epilepsia, tornando-a terceira doença neurológica mais comum, após somente do acidente vascular cerebral (AVC) e de doença de Alzheimer (PITÄNEN e LUKASIUK, 2009; THURMAN et al., 2011).

A incidência da epilepsia varia de acordo com idade, sexo, raça, tipo de síndrome epiléptica e condições socioeconômicas. Nos países desenvolvidos, a prevalência da epilepsia está em torno de 0,5% a 0,7% da população, e nos países em desenvolvimento, em torno de 1,5% a 2% da população (NETO & MARCHETTI, 2005). De acordo com Marchetti e Neto (2005), as taxas anuais de incidência são maiores nos países em desenvolvimento devido a vários fatores, como a maior ocorrência de neurocisticercoses, ligadas aos problemas com saneamento básico, ocorrência de infecções intracranianas, virais ou bacterianas, como também as doenças cerebro-vasculares, entre outros.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) afirmou que em 2007, quando a população brasileira era da ordem de 177.450.609 habitantes, a prevalência da epilepsia no país era de 1,7 a 1,8 milhões de pacientes com epilepsia ativa e que, pelo menos, 9 milhões de pessoas já apresentaram crise epiléptica alguma vez na vida (GALLUCCI e MARCHETTI, 2005).

De acordo com Ferreira e Silva estima-se que a mortalidade global dos indivíduos acometidos por epilepsia seja duas ou três vezes superior à da população geral. As causas para esse elevado índice de mortalidade podem ser relacionadas à epilepsia propriamente dita como, morte súbita e inexplicável, o estado epiléptico, a pneumonia aspirativa, o trauma e o afogamento acidental. Além de poder estar relacionado à doença subjacente como, neurocisticercose e tumor cerebral, ou ao tratamento (intoxicação) (FERREIRA; SILVA, 2009).

Também é importante ressaltar que a presença de transtorno mentais associados a epilepsia é um fator significativo que interfere na qualidade de vida (VIKISALO et al., 2000). Os transtornos mentais associados a epilepsia pioram a capacidade de adaptação profissional (MARCHETTI, et, al; 2003).

A prevalência de transtornos depressivos em pacientes com epilepsia é significativa. Entre 15% e 60% de indivíduos que sofrem de epilepsia, padecem também de depressão, uma incidência 17 vezes maior que na população geral e 5 a 7 vezes maior que entre aqueles que sofrem outras doenças crônicas, inclusive neurológicas. Além disso, o risco de suicídio cerca de 9 vezes maior que na população geral (PARADISO, 2001; HARDEN, 2002; KANNER, 2002; HAJSZAN et al., 2006).

Pacientes com epilepsia também apresentam uma maior prevalência de alterações comportamentais e transtornos psiquiátricos associados em relação à

população geral (SWINKELS, 2005). Apresentam também transtorno psiquiátrico mais graves, como o transtorno afetivo bipolar e a esquizofrenia, cuja sintomatologia pode ser considerada semelhante àquela de pacientes sem epilepsia (KRISHNAMOORTHY, et al 2007). Em estudos no Brasil de pacientes com epilepsia e psicoses associadas, observaram que antes do início do quadro psicótico uma parcela de 63% dos pacientes estava ocupada de forma regular com suas atividades profissionais (MARCHETTI et al., 2003).

3.4 FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES

A história das medicações anticonvulsivantes ou fármacos antiepilépticas (DAEs) possui dois marcos iniciais importantes, quando Locock em 1857, reconheceu a ação anticonvulsiva do bromo e, em 1912, Hauptmann, a do fenobarbital. Mas foi somente em 1945 que Toman e Taylor chegaram à conclusão de que, por múltiplas razões biológicas de caráter teórico ou prático, não era possível desenvolver um fármaco antiepiléptico que controlasse todas as formas de crises e que fosse útil para todos os pacientes com epilepsia. Seguiu um novo período para o desenvolvimento, novas fármacos, até os anos 1970, quando a carbamazepina, o ácido valpróico e algumas benzodiazepinas foram aprovados. Já em 1990, aproximadamente dezesseis fármacos anticonvulsivantes estavam disponíveis e atualmente, mais de vinte fármacos anticonvulsivantes encontram-se disponíveis (BIALER e WHITE, 2010).

Dentre os anticonvulsivantes disponíveis atualmente, os principais mecanismos de ação incluem potencialização da ação do GABA e inibição dos canais de sódio e de canais de cálcio (RANG et al., 2007) sugerindo que a inibição de sistemas de neurotransmissores excitatórios ou ativação dos sistema de neurotransmissores inibitórios produz ação anticonvulsivante. (LASON et al., 2011).

Contudo, deve ressaltar que não existe um único medicamento anticonvulsivante ideal para tratamento de primeira linha para todos os pacientes, e a escolha deve levar em consideração o tipo de crise e outras características, tais como o contexto, o objetivo fundamental do tratamento da epilepsia é abolir as crises com um mínimo de efeitos adversos mas somente cerca de 70% dos pacientes conseguem o controle das crises (LEE 2014). A seleção da DAE apropriada depende primariamente do tipo de crise presente, bem como das características

individuais da droga, incluindo farmacocinética e efeitos colaterais (SHNEKER e FOUNTAIN, 2003 GUERREIRO, 2006). Fatores como intervalo de dosagem e custo também são importantes, visto que a epilepsia geralmente requer tratamento por toda a vida (BEN-MENACHEM et al., 2010).

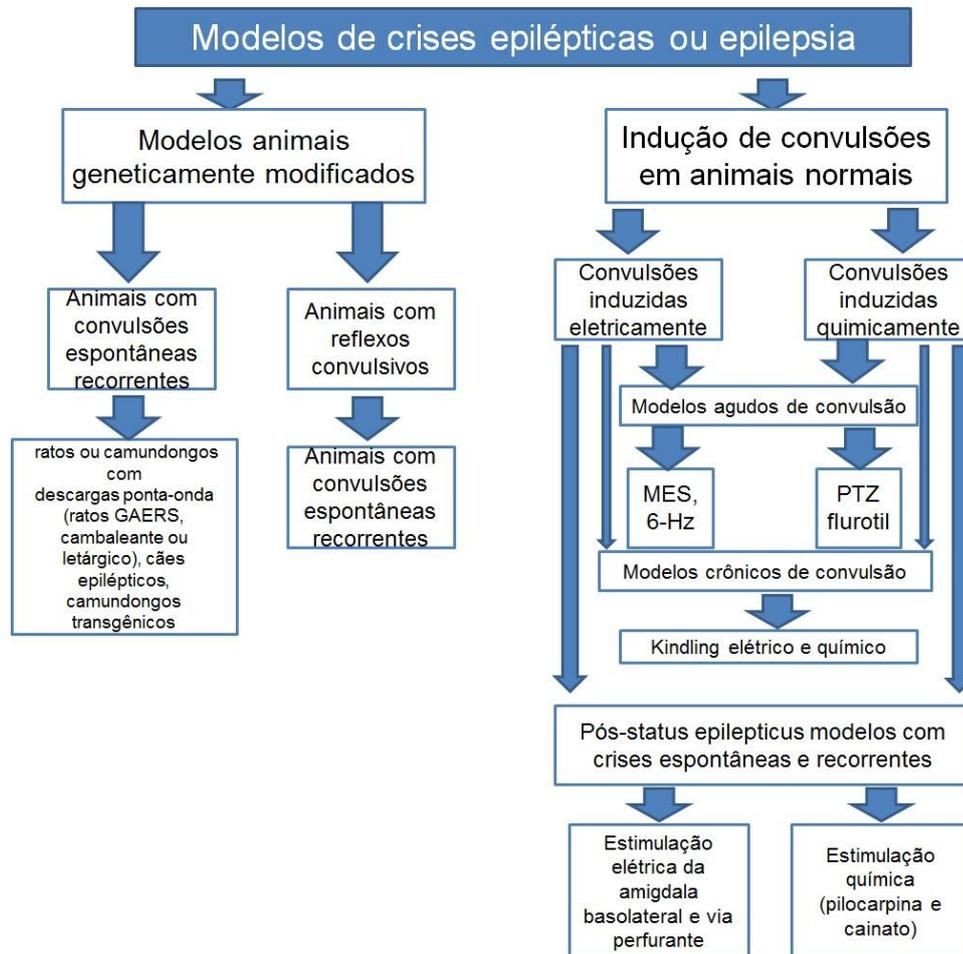
O aparecimento de efeitos adversos das DAE afeta fortemente a qualidade de vida dos pacientes. Pacientes com epilepsia, comumente reportam comprometimento de memória e aprendizado, problemas de atenção e concentração, lentidão para processar informações recebidas, diminuição da velocidade psicomotora e déficit de linguagem decorrentes do tratamento farmacológico (PERUCCA; CARTER; VAHLE; et al., 2009). Além disso, Borges, Borges, Santos et al. (2010) enfatizam o dano neurológico coexistente e as dificuldades psicossociais enfrentadas pelos pacientes, os quais não são abolidos apenas com o tratamento medicamentoso. Os fatores psicológicos resultantes desta situação promovem a exclusão social, exigindo um olhar mais amplo das políticas de saúde voltadas a essas pessoas. Nesse contexto, considerando que um grande número de pacientes com epilepsia não respondem ao tratamento medicamentoso, e os problemas associados com o uso dos anticonvulsivantes utilizados atualmente, surge a necessidade da busca por novas fármacos com potencial anticonvulsivante e melhor perfil de efeitos adversos.

3.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CRISES EPILÉPTICAS

Para elucidar e entender os mecanismos da epilepsia, bem como realizar a busca por novos agentes anticonvulsivantes, são necessários modelos experimentais com a capacidade de reproduzir ou modelar características da epilepsia, visando o entendimento da fisiopatologia, dos mecanismos de indução e manutenção das convulsões e na elucidação dos mecanismos de ação das fármacos (LÖSCHER, 2011). Os modelos animais atualmente disponíveis são bastante utilizados para estudos da fisiopatologia do processo convulsivo por reproduzirem alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas semelhantes à epilepsia em humanos (BEN-ARI; TREMBLAY; OTTERSEN, 1980).

Um esquema simplificado de classificação dos modelos animais experimentais de crises epilépticas (convulsões) e epilepsia é mostrado na figura 2.

Figura 2: Visão geral dos modelos de crises epilépticas ou de epilepsia, adaptado de LOCHER, 2011.



Fonte: LOCHER, 2011.

Dentre os modelos experimentais mais utilizados, cabe ressaltar o eletrochoque máximo (LÖSCHER, 1991) e os modelos químicos, incluindo o PTZ (VELISEK et al., 1992) e a pilocarpina (TURSKI e COLS., 1987).

O PTZ é um derivado tetrazol com atividade convulsivante consistente em várias espécies, como ratos, camundongos, gatos, cães e primatas, quando administrado por via sistêmica (FISHER, 1989; SECHI et al., 1997). Este convulsivante é empregado como modelo químico de crises convulsivas agudas, induzindo convulsões por inibir os canais de íon cloreto associados aos receptores GABA-A (LÖSCHER, 1998), e é amplamente utilizado para estudos de mecanismos de geração, manutenção e término de crises epilépticas, bem como para o desenvolvimento pré-clínico de novos compostos anticonvulsivantes (LÖSCHER E COLS., 2011). De fato, a modulação das convulsões induzidas por PTZ pode ser

particularmente relevante para o desenvolvimento de novas fármacos anticonvulsivantes, visto que a supressão das alterações eletroencefalográficas induzidas por PTZ possui alto valor preditivo para fármacos clinicamente efetivas contra crises generalizadas do tipo ausência e tônico-clônicas (LÖSCHER, 2011).

4 CARYOCAR coriaceum: UM FRUTO DA CHAPADA DO ARARIPE CEARÁ

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

4 *CARYOCAR coriaceum* (pequi): UM FRUTO DA CHAPADA DO ARARIPE CEARÁ

O bioma é um conjunto de vida vegetal e animal, especificado pelo agrupamento de tipos de vegetação e identificável em escala regional, com condições geográficas e de clima similares e uma história compartilhada de mudanças cujo resultado é uma diversidade biológica própria. A localização geográfica de cada bioma é condicionada predominantemente pelos seguintes fatores: temperatura, precipitação pluviométrica e pela umidade relativa, e em menor escala pelo tipo de componentes do solo (VIEIRA e MARTINS, 1998).

A área de cerrados é encontrada nos estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal, parte do estado da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo, sendo que Mato Grosso compõe o núcleo central do cerrado. Ocorre também em áreas disjuntas ao norte dos estados do Amapá, Amazônia, Pará e Roraima e ao sul, em pequenas áreas do Pará (RIBEIRO e WALTER, 1998; ALMEIDA et al., 1998).

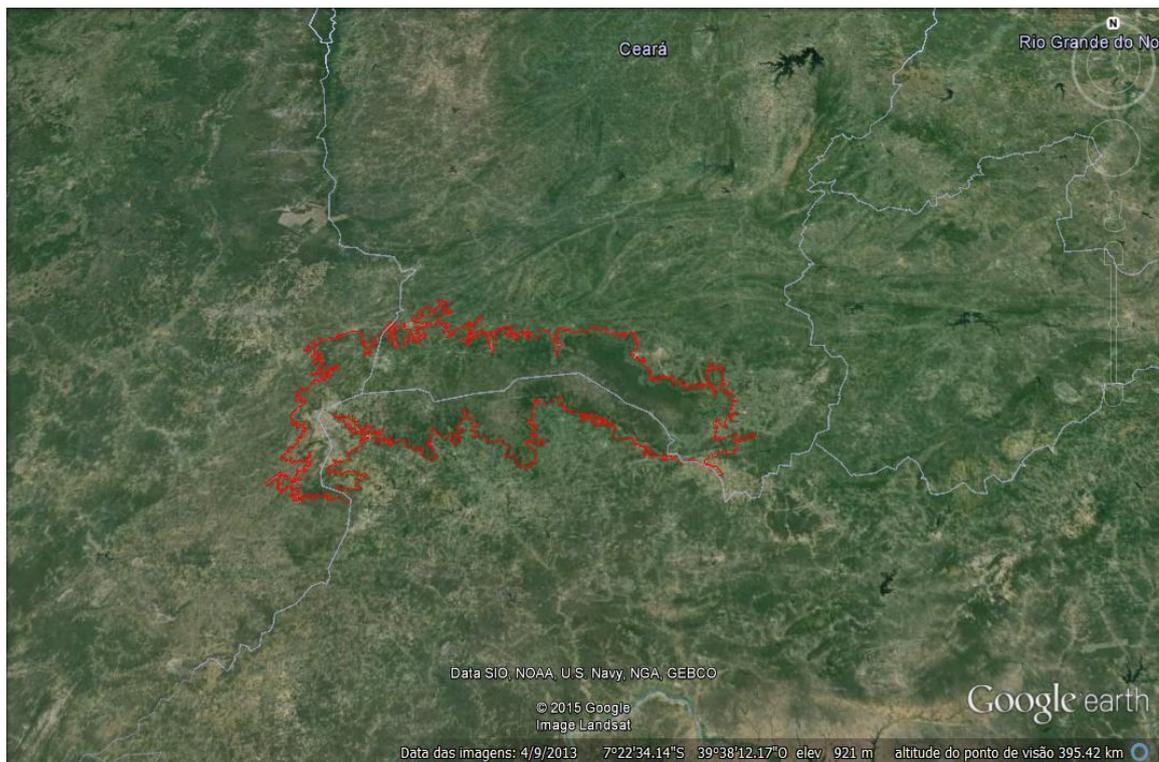
No Nordeste Brasileiro, a maior concentração dos cerrados encontra-se nos estados do Piauí e Maranhão, ocupando o sudoeste e centro-norte do Piauí e nordeste e centro-sul do Maranhão, tendo uma área estimada de aproximadamente 22 milhões de hectares, o que representa 14% da área total nordestina (CASTRO et al., 2007).

O cerrado da chapada do Araripe é uma disjunção situada a altitude de 800 a 900m, encravado no domínio semi-árido da caatinga. Devido à maior altitude e, conseqüentemente, sob maior precipitação e menor temperatura que na caatinga do entorno, esse enclave caracteriza-se como hábitat ilha (COSTA et al., 2004). Está protegido na área da Floresta Nacional do Araripe (FLONA Araripe), a única área de cerrado preservada no estado do Ceará, sendo considerada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA 1999) como de importância prioritária para a conservação e carente de investigação científica (COSTA et al., 2001).

A área da Floresta Nacional do Araripe (FLONA Araripe), correspondendo a 10.618,75 há, cerca de 27,5% da área total da FLONA-Araripe, conforme o IBAMA. (www.ibama.gov.br/recursosflorestais/araripe). A Chapada do Araripe é um planalto localizado dentro do domínio da Caatinga no nordeste brasileiro, mais precisamente entre os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí (CASTRO, 1996). Ela é uma região

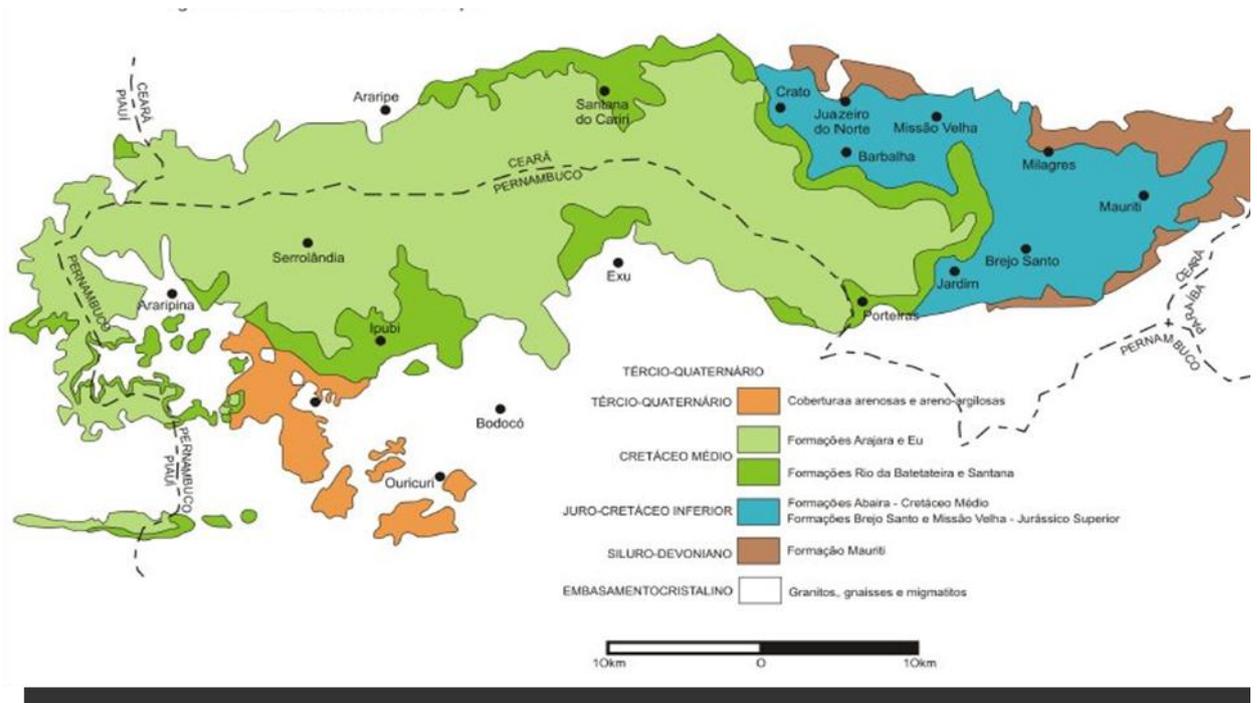
de grande ocorrência de Pequiyeiros nativos, sendo localizada nas confluências dos Estados de Pernambuco, Ceará e Piauí, abrangendo uma área de 1.050.000 hectares, (Figura 3 e 4) distribuídos em 35 municípios, onde vivem cerca de 700.000 habitantes (ACEP, 1999).

Figura 3 – Bacia Sedimentar do Araripe- Região Nordeste Brasil



Fonte : <http://www.icmbio.gov.br>, 2010

Figura 4. Bacia Sedimentar da Chapada do Araripe Ce/cidades.



Fonte.: <http://2.bp.blogspot.com>

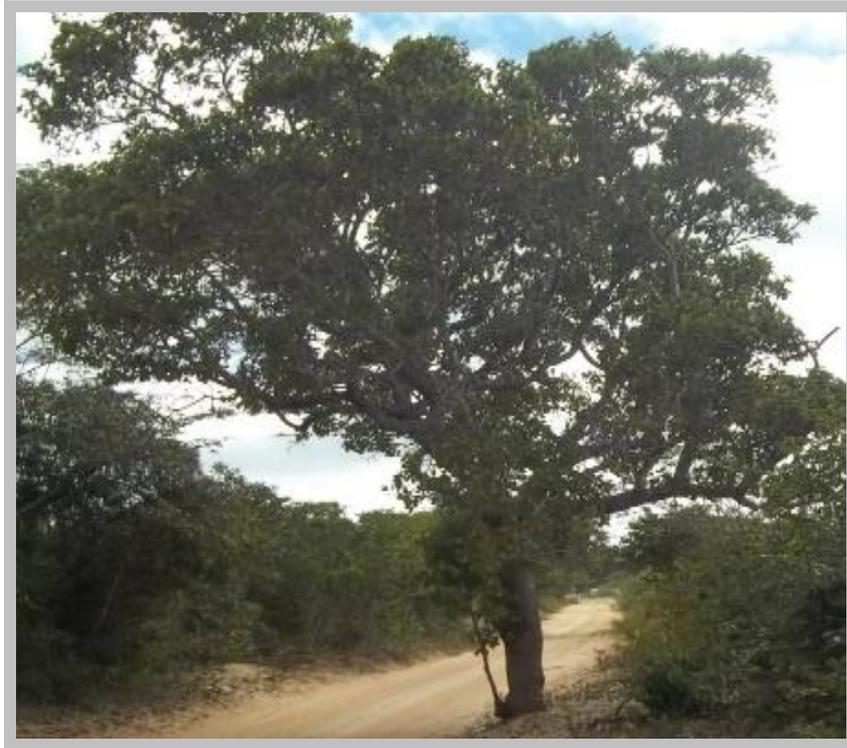
4.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DO PEQUI (*CARYOCAR coriaceum* WITTM)

Na parte mais setentrional do Nordeste Brasileiro é encontrada a espécie *Caryocar coriaceum*, que exerce importante papel sócio-econômico na Chapada do Araripe e circunvizinhanças nos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí (OLIVEIRA et al., 2008).

O gênero *Caryocar* L. compreende 16 espécies e pertence a Caryocaraceae, uma pequena família com ocorrência na América do Sul e Central. *Caryocar Coriaceum* Wittm. Que cresce naturalmente em regiões secas da região Nordeste do Brasil, na Chapada Araripe Região, Estado do Ceará (MATOS, 2007).

O Pequizeiro é uma planta arbórea, com aproximadamente 12 a 15 m de altura e com tronco tortuoso de casca áspera e rugosa, cinza escura, fendida, ramos grossos, pertencente à classe *Magnoliopsida* (Dicotyledonae), ordem *Guttiferales*, família *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar* L. (Figura 5) (FERRI, 1969). As folhas pilosas são formadas por três folíolos com as bordas recortadas. As flores são grandes e amarelas, com múltiplos estames, quatro estiletos, surgindo durante os meses de setembro a dezembro.

Figura 5. O Pequizeiro *Caryocar coriaceum* Wittm. Chapada do Araripe Ce.



Fonte: Oliveira et al., 2013

Etimologicamente, a palavra Pequi ou piqui em do tupi-guarani e significa” fruto de pele espinhosa”, fazendo uma alusão aos vários espinhos formadores de uma pele protetora sobre a semente. Espécie típica da região do cerrado encontra-se na Floresta Nacional do Araripe (FLONA) (VERA et al, 2007).

O Pequi é constituído pelo exocarpo ou pericarpo, de coloração esverdeada ou marrom-esverdeada, mesocarpo externo, polpa branca com coloração pardo-acinzentada e mesocarpo interno, que constitui a porção comestível do fruto, possuindo coloração amarelada, e separa-se facilmente do mesocarpo externo quando maduro (Figura 6) (MELO JUNIOR et al., 2004).

O fruto (Pequi) é globoso, do tipo drupóide, formado por um epicarpo (casca) verde-amarelado, que recobre de um a quatro pirênios, conhecidos como caroços; (fig.6 A) o mesocarpo oleaginoso divide-se em externo (coriáceo carnoso) e interno (parte comestível amarelo-carnoso ou polpa), (Fig 6B) envolvendo o endocarpo lenhoso com espinhos delgados e agudos, sob o qual está a amêndoa branca ou semente, carnosa e também oleaginosa (Fig 6 A). O endocarpo, que é espinhoso, protege a semente ou amêndoa, que é revestida por um tegumento fino e marrom,

sendo também uma porção comestível (fig 6 e 7A).na figura (7 B) o prato típico da região do Cariri - Ce (baião de dois) (MELO JUNIOR et al., 2004). O conjunto mesocarpo interno, endocarpo espinhoso e semente constituem o pirênio (SILVA; MEDEIROS-FILHO, 2006; MATOS, 2007). (Quadro 1)

Figura 6 – *Caryocar coriaceum* (pequi) Os frutos são drupáceos (A), já a direita destacam-se os pirênios junto a drupa, mesocarpo interno (B) os pirênios cortados transversalmente, mostrando a amêndoa (B) Os frutos do Pequi.

(A)



(B)



Fonte : (Oliveira et al., 2013).

Figura 7 – As flores são amareladas, com estames avermelhados e reunidas em cachos terminais (A); lado esquerdo da ilustração, tem suas folhas (B); (C) os frutos do Pequi (D) Prato típico da região (baião de dois) arroz com Pequi e feijão.

(A)



(B)

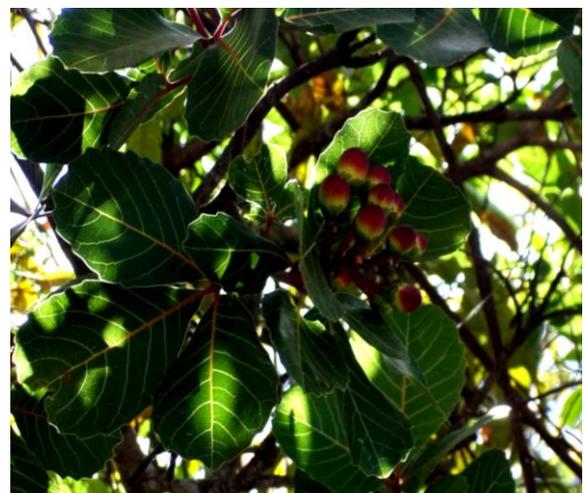


Figura 7 – As flores são amareladas, com estames avermelhados e reunidas em cachos terminais (A); lado esquerdo da ilustração, tem suas folhas (B); (C) os frutos do Pequi (D) Prato típico da região (baião de dois) arroz com Pequi e feijão.

(C)



(D)



Fonte : (Oliveira et al., 2013).

Quadro 1 – Constituição do fruto do *Caryocar coriaceum*

| Partes do Fruto | Subdivisão | Divisão |
|----------------------------|-------------------|---|
| Casca | Exocarpo | Fino e de coloração verde |
| Polpa | Mesocarpo Externo | Coriáceo e carnosos/de cor amarelo claro ou braço creme. |
| | Mesocarpo interno | Polpa comestível amarelada e carnosa |
| Pirênios Putâmes (caroços) | Endocarpo | Amêndoa, semente ou castanha envolvida por uma camada de espinhos |

Fonte : Adaptado de BRAGA, 1960; PAULA-JÚNIOR, 2004; SILVA e MEDEIROS-FILHO, 2006

Em 100 g de polpa de Pequi, do *Caryocar coriaccen* Wittm, foram encontradas proteínas (2,64%), lipídios (20,00%), fibra bruta (13,00%), carboidratos (19,60%), pectina (2,23%), tanino (0,17%), vitamina C (78,72%) e caroteno (7,46%) o que equivale a 20.000 UI de vitamina A, riboflavina (463 µg), niacina (387 µg) e minerais (Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, K e P), com valor energético de 89 calorias (MATOS, 2007; SANTOS et al., 2004). Quanto as características físicas da espécie *Caryocar coriaceum*, em geral o peso médio do fruto é de 90,48 g, o da casca em 66,33g e representando 73,31% do peso total do fruto. O peso médio da polpa é de 10,61% e

o da amêndoa 1,72%. A altura média do fruto é de 5,36 cm, e as médias dos diâmetros maior e menor são de 5,58 cm e 5,08 cm, respectivamente (OLIVEIRA, 2009).

O óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceum* é caracterizado por um teor elevado de ácidos graxos insaturados (64,9%), sendo os ácidos oléico (insaturado) e palmítico (saturado) os componentes majoritários. Outros componentes encontrados são: ácido palmitoleico (0,27%), ácido esteárico (1,73%), ácido linoléico (1,80%), ácido heptadecenóico (5,86%) e ácido 11-eicosenóico (0,37%) (SARAIVA et al., 2009).

Já os valores máximos e mínimos de sólidos solúveis do Pequi (*C. coriaceum*, Wittm) oriundos da Chapada do Araripe são 15,0 e 6,3° Brix, respectivamente com média de 9,97° Brix, e os teores médios de açúcares solúveis são de 3,33% (OLIVEIRA et al., 2010).

O *Caryocar coriaceum* (pequi) apresenta teor médio de carotenóides de 0,862 mg/100g, sendo assim, os carotenóides são os principais responsáveis pela coloração da polpa amarelada (OLIVEIRA et al., 2010). A importância dos carotenóides vai além do seu papel pigmentante, enquanto alguns são precursores da vitamina A, outros exibem atividade antioxidante, sendo considerados compostos funcionais ou bioativos. Evidências epidemiológicas demonstram que dietas ricas em carotenóides encontram-se associadas à redução do risco de incidência câncer e doenças cardiovasculares (BENDER, 2005).

4.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO *CARYOCAR coriaceum*

O Cariri produz 2,3 milhões de toneladas de Pequi por safra, de janeiro a abril. E esta produção representa uma adição de recursos na região no valor de R\$ 1,62 milhão. O Crato é o maior produtor de Pequi da região com 1.684 toneladas. A coleta do Pequi, caracteriza-se como uma atividade extrativista, sendo explorada na área da Flona do Araripe e no chamado arisco, onde está inserido o Sítio São José. Além de mais saboroso, o Pequizeiro do arisco apresenta uma maior produtividade. A safra começa mais cedo, proporcionando um melhor preço na produção (VICELMO, 2007).

Os frutos do Pequi vêm sendo explorados de forma desordenada, não havendo relatos de plantios comerciais produtivos. Durante o período de safra do Pequi, que ocorre dos meses de janeiro a março, o fruto representa uma importante fonte de renda para o agricultor que envolve toda a família na coleta, representando uma importante fonte de renda. O aproveitamento do Pequi pela população da região é feita na culinária na produção de pratos variados entre eles arroz, o baião de dois com Pequi, o feijão.

A maioria da população humana da chapada mantém seu sustento através da atividade extrativista do Pequi. Esse fruto tem grande valor econômico, sendo muito utilizado pela culinária local (FIGUEIREDO et al., 1989; GONÇALVES, 2008). Além disso, sua polpa pode servir para ração de animais. A polpa do Pequi também é rica em vitaminas E e B, por isso o fruto é muito utilizado contra gripes e resfriados. O óleo extraído da polpa também é usado para preparar sabão caseiro (BRAGA, 1960; AGRA et al., 2007).

4.3 USO DO *CARYOCAR coriaceum* NA MEDICINA POPULAR

O *Caryocar coriaceum* é bastante utilizado para tratar várias doenças na medicina popular, sendo utilizadas várias partes da sua planta, tais como; as folhas, cascas e óleo do seu fruto. Às cascas são atribuídas propriedades antifebris e diuréticas, usadas em infusões (CORREIA, 1926). Suas folhas são utilizadas no tratamento de resfriados, gripes (VIEIRA; MARTINS, 2000). O óleo do fruto é usado para tratamento de queimadura, e como afrodisíaco (VIEIRA; MARTINS, 2000), usado como bálsamo em casos de reumatismo (BRANDÃO et al., 2002). O óleo extraído da polpa do seu fruto adicionado ao mel de abelhas, e eficaz na cura de afecções bronco-pulmonares tais como: gripes, bronquites desse modo é de grande importância na farmacopéia popular (BRAGA, 1960). O óleo do Pequi também é aplicado no uso veterinário, em contusões, machucados e inchaços de animais (BRAGA, 1960; FIGUEIREDO et al., 1989). Também são atribuídas ao Pequi as propriedades afrodisíacas e antiabortivas (MIRANDA-VILELA, et al., 2008).

A utilização de plantas medicinais com a finalidade terapêutica para o tratamento cura e prevenção de diversas doenças é uma das mais antigas formas de prática da medicina popular. A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à civilização humana e, por um longo tempo,

produtos minerais, vegetais e animais foram às principais fontes de fármacos (RATES, 2001).

O valor terapêutico do Pequi atribuído à medicina popular vem sendo pesquisado e uma ampla variedade de estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos atestam sua eficácia (PRANCE; SILVA, 2006). Estudos recentes sugerem que o Pequi possui potencial para tratamento de condições inflamatórias. De fato, foi mostrado que a aplicação tópica do extrato da polpa do Pequi diminui o edema de orelha induzido por diversos agentes irritantes em camundongos (DE OLIVEIRA et al., 2010; SARAIVA et al., 2010).

No estudo de Saraiva e colaboradores (2010) o edema de orelha em camundongos (Swiss) e ratos (Wistar) foi induzido por vários agentes irritantes, cujo objetivo foi verificar o potencial antidermatológico de substâncias aplicadas por via tópicas. Com isso foi verificado que o óleo fixo do *Caryocar coriaceum* Wittm (pequi) possui tanto propriedades terapêuticas como anti-inflamatórias. Nos estudos de Oliveira e colaboradores (2010) o óleo fixo extraído da polpa do *Caryocar coriaceum* inibiu a inflamação e acelerou o processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos, sugerindo um potencial terapêutico para a afecções na pele.

Batista e colaboradores (2010), em seu estudo com o óleo fixo da polpa do Pequi em ensaios de modelos em feridas cutâneas em ratos mostraram que após a aplicação tópica do creme base com 10% de óleo do Pequi os animais tratados apresentaram redução significativa a partir do décimo quarto dia pós-operatório. Foram verificados nesse período achados histológicos característicos da etapa final do processo de cicatrização tais como: acentuada quantidade de fibroblastos, fibras colágenas e completo processo de reepitelização, enquanto que as feridas do grupo controle necessitaram de mais tempo para resolução do processo cicatricial. O uso do óleo da polpa do fruto do *Caryocar coriaceum* Wittm apresentou influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos, por promover reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas em relação ao grupo controle (BATISTA et al., 2010).

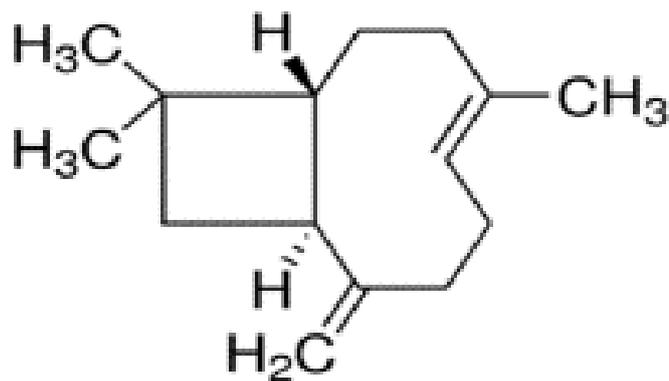
No estudo de Quirino e colaboradores (2009) demonstrou-se que o óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceum* em ratos e camundongos, administrado de forma oral e tópica possui, atividade gastroprotetora e cicatrizante em feridas cutâneas e em úlceras induzidas por etanol e ácido acetil salicílico (AAS). A atividade cicatrizante foi confirmada pela regressão da área da ferida comparada ao grupo

controle, e a atividade gastroprotetora foi visualizada pela diminuição da úlcera induzida por aspirina.

4.4 β -CARIOFILENO

O β -cariofileno é um constituinte importante em várias espécies de plantas. Pertence à classe química dos sesquiterpenos bicíclicos, e o seu percentual varia de acordo com a parte da planta em que foi retirado (ARAÚJO, LORDELLO e SALES-MAIA, 2001). Na natureza, o β -cariofileno é normalmente encontrado em conjunto com pequenas quantidades de seus isômeros (*Z*)- β -cariofileno [(*Z*)-ou- β -cariofileno isocaryophyllene] e α -humuleno (anteriormente α -cariofileno) ou em uma mistura com o seu produto de oxidação, o óxido de β -cariofileno (GERTSCH et al., 2008). O β -cariofileno (β -cariofileno) (figura 8) é um constituinte do óleo essencial da polpa do *Caryocar brasiliense*, com 0,1% do constituinte, sendo que são os mesmos constituintes da espécie *Caryocar coriaceum*.

Figura 8 – Estrutura Química do β -cariofileno



Quadro 2 – Relação de alguns dos componentes voláteis encontrados no óleo de *Caryocar Brasiliense*.

| Nº | Constituintes | % Relativa |
|----|-------------------------------------|------------|
| 1 | <i>1,2-dimetilciclohexano</i> | 0,4 |
| 2 | <i>1-octeno</i> | 0,1 |
| 3 | <i>Butanoato de etila</i> | 4,1 |
| 4 | <i>Álcool tetrahidrofurfurílico</i> | 4,3 |
| 5 | <i>2-metilpropanoato de etila</i> | 0,2 |
| 6 | <i>2-metilbutanoato de etila</i> | 0,5 |
| 7 | <i>Isovalerato de etila</i> | 1,0 |
| 8 | <i>Ácido 3-metilvalérico</i> | 2,0 |
| 9 | <i>Isovalerato de propila</i> | 0,3 |
| 10 | <i>Hexanoato de etila</i> | 52,9 |
| 11 | <i>Limoneno</i> | 0,1 |
| 12 | <i>Fenilacetaldéido</i> | 0,4 |
| 13 | <i>(E)-2-hexenoato de etila</i> | 0,4 |
| 14 | <i>Terpinoleno</i> | 0,1 |
| 15 | <i>Hexanoato de propila</i> | 0,5 |
| 16 | <i>Heptanoato de etila</i> | 0,6 |
| 17 | <i>β-cariofileno</i> | 0,1 |
| 18 | <i>Undecano</i> | 0,1 |
| 19 | <i>Butanoato de isopentila</i> | 0,1 |

Fonte : (MAIA et al., 2008)

Comercialmente, o β -cariofileno tem sido largamente utilizado em fragrâncias, cosméticos e alimentos (SKÖLD et al, 2006), e por seu amplo perfil de segurança diversos autores buscaram identificar possíveis efeitos farmacológicos do β -cariofileno. Várias atividades biológicas são atribuídas ao beta-cariofileno, tais como

anti-inflamatório (MEDEIROS et al., 2007; GERTSCH, 2008), anestésico local (GERTSCH ETAL., et al., 2008), analgésico (GHELARDINE et al., 2001; KATSUYAMA et al., 2013,) anticancerígeno (LEGAULT e PICHETTE, 2007), antibacteriano (MICHIELIN et al., 2009), antiviral (DUNKIC et al., 2011), anti-artrítica (AGARWAL, 2003), gastroproteora (TAMBE et al., 1996), ansiolítica (GALDINO et al., 2012), neuroprotetor (CHANG et al., 2006; ZHENG et al., 2013). Nesse contexto, foi demonstrado que a administração de β -cariofileno protege contra a lesão isquêmica cerebral em ratos (CHOI et al., 2013; CHANG et al., 2013). Desde que compostos neuroprotetores podem exibir atividade anticonvulsivante e vice-versa (BARZAM e MARCHESELLI, 2005) e afim de avaliar melhor as potenciais aplicações terapêuticas do β -cariofileno, no presente estudo testamos a hipótese de que este composto natural exibe efeitos anticonvulsivantes.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos, assim como resultados e a discussão que fazem parte desta dissertação são apresentados na forma de artigos científicos, intitulados “*Anticonvulsant activity of Caryocar coriaceum Wittm. fixed pulp oil against pentylenetetrazol-induced seizures*” e “*Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures*”.

Os procedimentos experimentais dos presentes artigos científicos iniciaram-se após aprovação pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Universidade Federal de Santa Maria (ANEXOS A e B).

ARTIGO 1

Atualmente submetido para publicação a revista Neurological Research.

The screenshot shows the Editorial Manager interface for Neurological Research. The user is logged in as Author (Role: Author, Username: ms.oliveira@ufam.br). The page displays a table of submissions for the author, with one submission listed. The submission title is 'Anticonvulsant activity of Caryocar coriaceum Wittm. fixed pulp oil against pentylenetetrazol-induced seizures'. The submission number is NER4119. The current status is 'Under Review', and the initial date submitted is 07 Jul 2015. The page also includes navigation links, a search bar, and a Windows taskbar at the bottom.

Editorial Manager
www.edmgr.com/ner/default.aspx

Neurological Research
HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager
Role: Author Username: ms.oliveira@ufam.br

Submissions Being Processed for Author Mauro S Oliveira, Ph.D.
Page: 1 of 1 (1 total submissions)

| Action | Manuscript Number | Title | Initial Date Submitted | Current Status |
|--------------|-------------------|--|------------------------|----------------|
| Action Links | NER4119 | Anticonvulsant activity of Caryocar coriaceum Wittm. fixed pulp oil against pentylenetetrazol-induced seizures | 07 Jul 2015 | Under Review |

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

<< Author Main Menu

Pesquisar na Web e no Windows

08:21 18/02/2016

Anticonvulsant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil
against pentylenetetrazol-induced seizures

Cleide Correia de Oliveira^{1,2}, Clarissa Vasconcelos de Oliveira³, Jéssica Grigoletto³, Leandro Rodrigo Ribeiro³, Vinícius Rafael Funck³, Letícia Meier Pereira³, Michele Rechia Figuera^{1,3}, Luiz Fernando Freire Royes^{1,3}, Ana Flávia Furian³, Irwin Rose Alencar Menezes⁴, Mauro Schneider Oliveira^{1,3,*}

¹Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Department of Nursing, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

³Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

*Corresponding author: Dr. Mauro Schneider Oliveira, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207 - CEP 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: ms.oliveira@ufsm.br

Phone: 55 55 3220 9378

Fax: 55 55 3220 8241

Abstract

Epilepsy is a common brain disease and a major worldwide public health problem. The seizures in a significant amount of patients suffering from epilepsy remain inadequately controlled by currently available pharmacological treatments. Accordingly, there is a need for the discovery of new anticonvulsant approaches with improved efficacy and a better safety profile. In this context, natural products can be a valuable source of substances with potential anticonvulsant activity. In the present study we tested the anticonvulsant potential of *Caryocar coriaceum* Wittm., a plant native from the Brazilian Cerrado biome (tropical savanna ecoregion). Adult male C57BL/6 mice were treated with increasing doses of the fixed oil obtained from the pulp of *Caryocar coriaceum* Wittm (pequi). Seizure activity was induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.), and evaluated by behavioral and electrographic methods. Administration of the oil at the dose of 100 mg/kg increased the latency for the first myoclonic jerk (208 % average increase versus vehicle-treated rats) and the first generalized tonic-clonic seizure (377% average increase versus vehicle-treated rats). Spearman analysis revealed a significant positive correlation between the doses of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil and the latency for PTZ-induced myoclonic and generalized seizures, suggesting a dose-dependent effect. The duration of generalized convulsions induced by PTZ was not altered. No significant behavioral adverse effects were detected in the open-field, rotarod, forced swim or object recognition tests. Interestingly, a significant antioxidant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil was detected in the DPPH scavenging assay. Further studies are needed to evaluate the mechanisms underlying the anticonvulsant effects of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil as well as the potential of the oil as a source of new anticonvulsant compounds.

Key words: Convulsion, PTZ; EEG; natural product; phytomedicine, antioxidant

1. Introduction

Epilepsy is a life-shortening brain disease ¹ affecting approximately 0.5-1% of the worldwide population and therefore a major worldwide public health problem ². The hallmark of epilepsy is the occurrence of recurrent epileptic seizures, eventually caused by an excessive discharge of cerebral neurons ³. By causing changes in motor functions, sensory perception and in behavior of the individual epileptic seizures largely affect the quality of life of the affected patients and their families ³. In fact, most epilepsy patients display several behavioral comorbidities, including but not limited to depression, anxiety and psychosis, and impaired cognitive performance ⁴.

Despite the introduction into the clinical practice of several new anti-epileptic drugs, seizures in 20-30 % of patients suffering from epilepsy remain inadequately controlled by currently available pharmacological treatments [1]. In fact, present clinical evidence indicates that none of the recently introduced third-generation anticonvulsant drugs display improved efficacy over classical anticonvulsant such as carbamazepine and valproate ⁴. Moreover, anticonvulsant drugs have a narrow therapeutic ratio, and therefore adverse effects such as ataxia, sedation and cognitive dysfunction are not infrequently observed at serum concentrations within the recommended range ⁵. In this context, there is an ongoing need for the discovery of new anticonvulsant approaches with improved efficacy and a better safety profile ⁴. In this context, phytomedicines can potentially play an important role in the development of new antiepileptic drugs ⁶, since it has been shown that several plant extracts and products may be useful for the treatment of convulsions or seizures ⁷.

Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) is a plant widely found in the Araripe Plateau, a middle altitude region located in the Brazilian northeastern region, within the Brazilian Cerrado biome (tropical savanna ecoregion) ⁸. The fruit of *Caryocar coriaceum* Wittm., popularly called Pequi, is highly appreciated in local cuisine because of its unique

taste and also is nutritionally relevant in face of its content of antioxidant and essential fatty acids ⁹. Interestingly, it has been demonstrated that *Caryocar coriaceum* Wittm fruit oil displays anti-inflammatory, healing, and gastroprotective activities in experimental models ¹⁰, ¹¹, suggesting its utility in several pathological conditions. In order to further evaluate the potential applications of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil we aimed the present study to test the hypothesis that it displays anticonvulsant properties.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and fixed oil preparation

The fruits of *Cariocar coriaceum* Wittm. were collected in the city of Crato, Ceará State, Brazil. Approximated GPS coordinates were as follows: 7° 14' 8" S, 39° 24' 39" W; altitude 800-900 m). A voucher specimen has been deposited at the Herbarium of the Biosciences Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (voucher #182528).

The fixed oil from *Caryocar coriaceum* Wittm. fruit pulp was obtained as described by Saraiva et al. ¹⁰, with minor modifications. The pulp with oily drupe of *Caryocar coriaceum* Wittm. was manually removed with a sharp object knife. The oil extraction from the pulp was performed continuously at 60 °C using hexane in a Soxhlet apparatus for 6 hours (hot extraction), eventually yielding a yellowish solution (oil plus hexane) and a yellow-orange precipitate. The hexane fraction was concentrated on a rotary evaporator apparatus under and controlled temperature (60 °C) in order to remove the residual hexane oil and avoid the decomposition of the oil-sensitive molecules. Average yield of extractions were 35.53 %. The oil was divided into aliquots and stored in plastic microtubes at -20 °C until use.

2.3. Animals and reagents

C57BL/6 male mice (25-40 g; 60-90 day-old) were maintained under controlled environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55 % relative humidity) with free access to food (Supra, Santa Maria, Brazil) and water. All experimental protocols were designed with two goals, a) limited suffering and b) use of fewest possible number of animals. All protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process #049/2013). All chemicals were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Pentylenetetrazol (PTZ) was dissolved in sterile 0.9 % NaCl solution containing 10 % (v/v) Tween 80. Doses and schedules for *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil administration were chosen based on pilot experiments.

2.4. Behavioral seizure evaluation

The effect of the acute systemic administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil on seizure activity induced by PTZ was investigated by administrating the oil (25, 50 or 100mg/kg, p.o.) or its vehicle (0.9 % NaCl solution containing 10 % (v/v) Tween 80, p.o.), 60 min before the injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.). Immediately after the injection of PTZ, the animals were transferred to a cubic glass arena and video monitored for 15 minutes for the appearance of seizures. The latency to myoclonic jerks and the latency to and duration of generalized tonic-clonic seizures were recorded.

2.5. Surgical procedures

Seizure activity and the effect of *Caryocar coriaceum* Wittm fixed pulp oil was

studied in a subset of animals by electroencephalographic (EEG) recordings. For the purpose of recording electrode implantation, animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, two stainless steel screw electrodes were placed over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to the multipin socket and were fixed to the skull. Meloxicam (200 mg/kg, subcutaneous) was administered immediately before and for three days after the surgical procedure.

2.6. Electroencephalography (EEG)

Six days after the surgery each animal was transferred to a Plexiglas cage (25 X 25 X 40 cm) and habituated for 20 min before EEG recordings. The mouse was then connected to a 100x headstage pre-amplifier (model #8202-DSE3) in a low-torque swivel (Pinnacle Technology Inc, Lawrence, KS, USA) and the EEG was recorded using a PowerLab 16/30 data acquisition system (AD Instruments, Castle Hill, Australia). Routinely, a 30 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After the baseline recording mice were injected with *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg, p.o.) or its vehicle 60 min before the injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.). Following PTZ injection the EEG was recorded for 15 minutes. EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 1024 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. EEG recordings were analyzed off-line using LabChart 7.2 software (AD Instruments).

2.7. Open-field test

Animals were placed in the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. Five areas of the apparatus had their borders limited by the walls of the arena and were considered as peripheral areas. The remaining five

areas that had no contact with the walls of the apparatus were considered as central areas. The number of crossed areas (crossing) as well as the number of rearing responses (animal stands on its hind legs) were recorded for 5 minutes¹². We investigated the effect of the acute systemic administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg, p.o.) on open-field performance by injecting the pulp fixed oil or its vehicle 60 min before the beginning of the test.

2.8. Object recognition test

The object recognition test was performed according to Bevins and Besheer (2006)¹³, with brief modifications. The test consisted of three sessions, namely, training (first session), short term memory evaluation (second session; 4 hours after training), and long term memory evaluation (third session; 24 hours after training). During the training session, two identical objects (transparent cylindrical plastic bottles) were equidistantly placed in the center of the same open-field arena described above, and the time spent in exploration of each object was recorded during 5 minutes. Four hours after the training (short term memory evaluation) one of the bottles was replaced for a new object (a plastic red apple), and the time spent in exploration of the each object were measured over 5 minutes. At last, 24 hours after training the plastic red apple was replaced for another new object (triangular plastic cup), and the time spent in exploration of each object was recorded during 5 minutes. The object recognition index was calculated with the following formula: Recognition index = (time spent in new object)/(time spent in the new object + time spent in the familiar object). We investigated the effect of the acute systemic administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg, p.o.) on long-term recognition memory by injecting the pulp fixed oil or its vehicle 60 min before the beginning of the test session (4 or 24 h).

2.9. Rotarod test

Fine motor coordination was assessed by using the Rotarod test as described by Wahlsten et al. (2003)¹⁴. The task consisted of one training and one testing session, carried out 24 hour apart. At training session, mice were trained on the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 rpm constant speed). Trial starts with the mouse being placed in the apparatus and ends when the mouse falls off the rod or after reaching the cut-off time of 60 s two consecutive times. The maximum number of attempts was 10. A resting time of 60 s was allowed between each trial. In the testing session mice were observed during four minutes, and the latency to the first fall was recorded. We investigated the effect of the acute systemic administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg, p.o.) on the latency to the first fall by injecting the pulp fixed oil or its vehicle 60 min before the beginning of the test session.

2.10. Forced Swim Test

The forced swim test was performed according to Sunal et al. (1994)¹⁵. Mice were placed in individual, clear polyvinyl chloride (PVC) cylinders (30 cm tall x 10 cm diameter) containing 23-25°C water (20 cm-deep to prevent the mouse's tail from touching the cylinder bottom). Water was changed between subjects. The immobility time during the 5 minutes of test was recorded. Immobility was assigned when no additional activity was observed other than that required to keep the mouse's head above water. We investigated the effect of the acute systemic administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg, p.o.) on the immobility time by injecting the pulp fixed oil or its vehicle 60 min before the beginning of the test.

2.11. DPPH assay

The antioxidant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil was evaluated

by the 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) test, using standard methodology¹⁶. The assay is based on the measurement of the scavenging capacity of antioxidants towards DPPH radical. Reaction media contained DPPH (300 μ M) and variable amounts of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil dissolved in ethanol. Every tube has a correspondent control containing an equivalent volume of ethanol and no DPPH. Absorbance readings were taken in triplicate at 517 nm after 30 min of incubation at 25°C. The DPPH solution was freshly prepared daily, stored in a flask covered with aluminum foil, and kept in the dark at 4 °C until determinations. Ascorbic acid served as the positive control. The ability to scavenge DPPH radical was calculated by the following equation: DPPH scavenging activity (%) = 100 x [(Absorbance of DPPH – Absorbance of sample) / (Absorbance of DPPH)]. IC₅₀ values were calculated using the nonlinear fit function of Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.12. Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov test was used to verify data normality and Bartlett's test was used to verify homogeneity of variances. Seizure latencies were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for post hoc analysis. Dose-response relationships were tested with the Spearman's rank correlation test. Seizure duration was analyzed by one-way ANOVA. Data from behavioral testing were analyzed by Student's t test. A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Figure 1

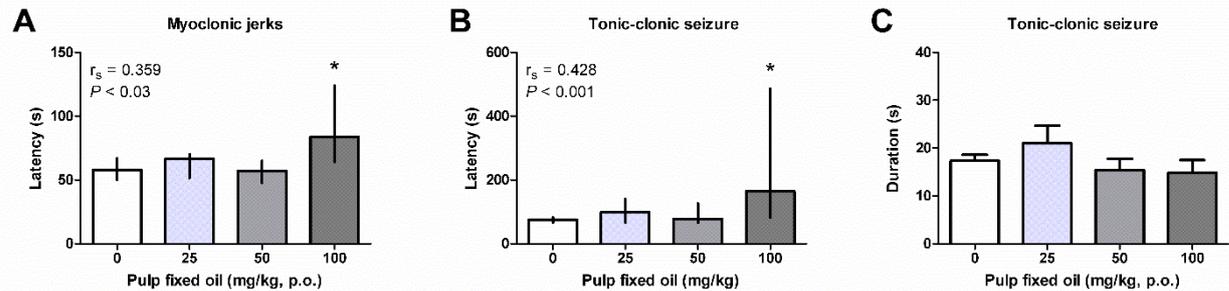


Figure 1: Effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil on seizure behavior. Latency to (A) myoclonic jerks or (B) generalized tonic-clonic seizures and (C) duration of generalized seizures induced by PTZ were measured after the oral administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil. Data are presented as median and interquartile range for $n=8-11$ each group. The Spearman correlation coefficients and respective values are also shown. The asterisk indicates a statistically significant difference from control group ($P < 0.05$).

In the first set of experiments we evaluated the effect of increasing doses (25, 50 or 100 mg/kg) of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil on the seizures induced by PTZ. Statistical analysis revealed that administration of the oil at the dose of 100 mg/kg increased the latency for the first myoclonic jerk (208 % average increase versus vehicle-treated rats) [$H(3) = 8.077$; $P < 0.05$ - Fig. 1A] and the first generalized tonic-clonic seizure (377% average increase versus vehicle-treated rats) [$H(3) = 8.813$; $P < 0.05$ - Fig. 1B]. Spearman analysis revealed a significant positive correlation between the doses of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil and the latency for PTZ-induced myoclonic ($r_s = 0.359$; $P < 0.03$) and generalized ($r_s = 0.428$; $P < 0.001$) seizures. The duration of generalized convulsions induced by PTZ was not altered by any of the doses tested [$F(3,33) = 1.157$; $P > 0.05$ - Fig. 1C].

Figure 2

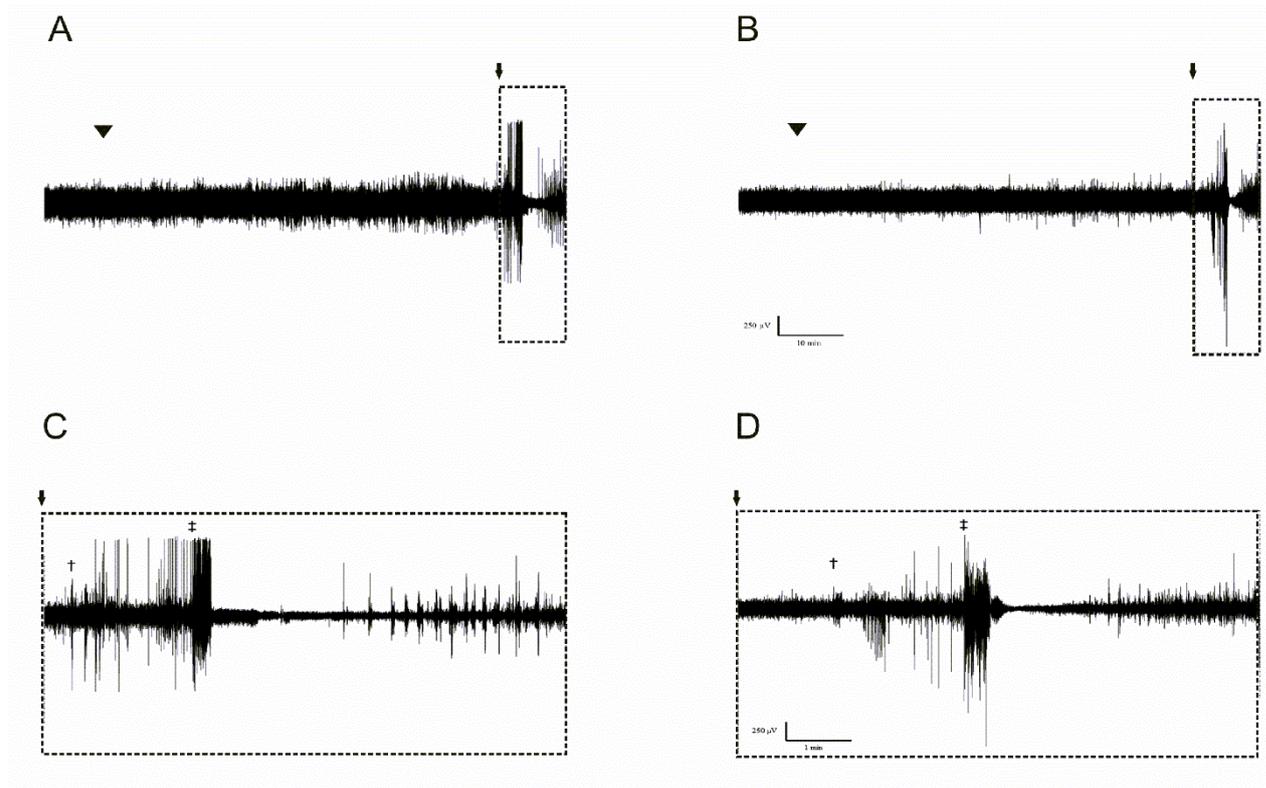


Figure 2: Representative electroencephalograms observed in cerebral cortex of mice after administration of vehicle plus PTZ (A, C) or *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg) plus PTZ (B, D). The arrowhead indicates the administration of vehicle or oil after baseline recording and the arrow indicates the administration of PTZ sixty minutes thereafter. The epochs highlighted in A and B are shown in higher magnification in C and D, respectively. The dagger (†) indicates the latency to the first myoclonic jerk whereas the double dagger (‡) indicates the latency to the first generalized seizure induced by PTZ.

Electroencephalographic experiments depicted in Figure 2A-D confirmed that *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil treatment delayed the appearance of PTZ-induced myoclonic generalized seizures, but did not alter the duration or the generalized seizure-associated wave patterns in the EEG recordings, which appeared as a combination of multispikes plus slow waves, multiple sharp waves and major seizure activity in a 2-3 Hz high-amplitude activity in all recording leads.

Figure 3

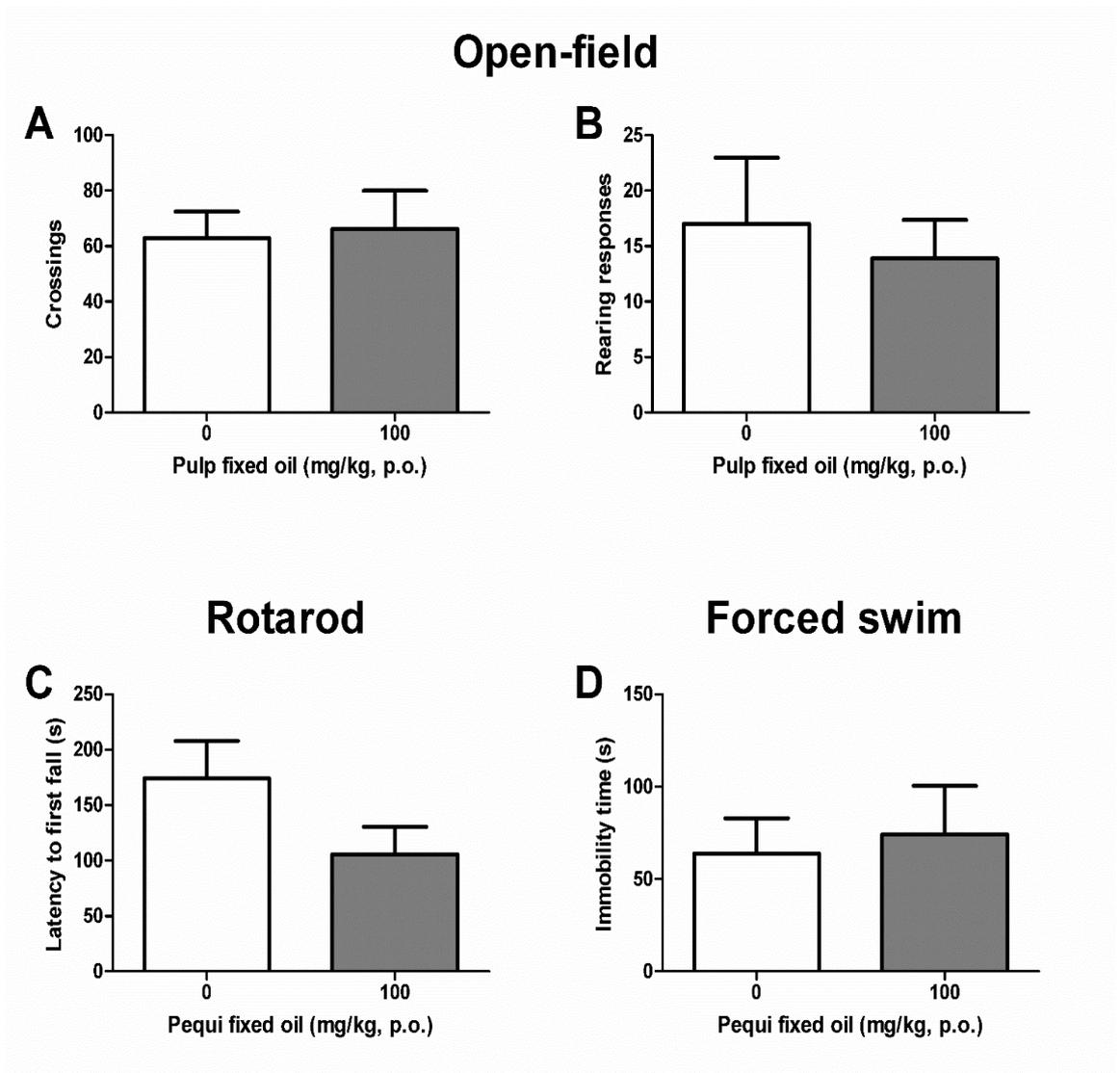


Figure 3: Effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg) on mice behavior. (A) Number of crossings in the open-field test, (B) number of rearings in the open-field test, (C) latency to the first fall of the rod and (D) immobility time in the forced swim test. Data are mean + standard error of the mean for n = 8 (open-field and rotarod tests) or n = 5 each group (forced swim test).

Figure 4

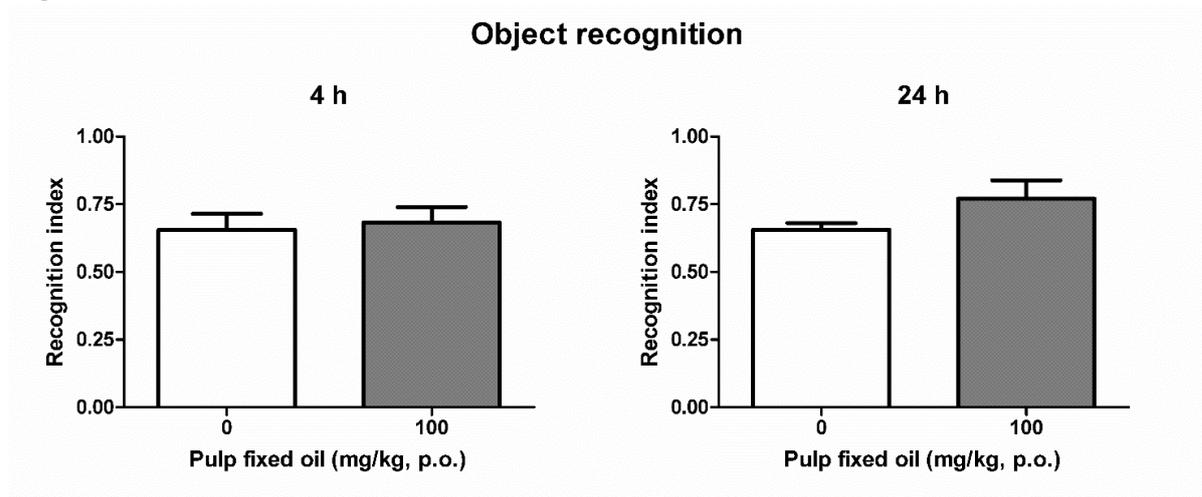


Figure 4: Effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil (100 mg/kg) on mice performance in the object recognition test. (A) Short-term memory (4 h after training) or (B) long-term memory (24 h after training). Data are mean + standard error of the mean for $n = 6$ per group.

In order to investigate whether the anticonvulsant effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil was accompanied by effects on behavior we tested independent group of mice in the open-field, rotarod, forced swim and object recognition tests. No significant differences were found in the number of crossings [$t(14) = 0.1930$; $P > 0.05$ – Fig. 3A] or rearings [$t(14) = 0.4520$; $P > 0.05$ – Fig. 3B] in the open-field test. In addition, the latency to fall of the rod was not statistically different between vehicle- and oil-treated animals [$t(1,14) = 1.631$; $P > 0.05$ – Fig. 3C]. Moreover, no significant differences were found in the immobility time in the forced swim test [$t(8) = 0.3135$; $P > 0.05$ - Fig. 3D]. Furthermore, no significant differences between vehicle- and oil-treated animals were found when recognition index was measured 4 hours after training (i.e. short-term memory) [$t(10) = 0.3245$; $P > 0.05$ – Fig. 4A] or 24 hours after training (i.e. long-term memory) [$t(10) = 1.566$; $P > 0.05$ – Fig. 4B].

Figure 5

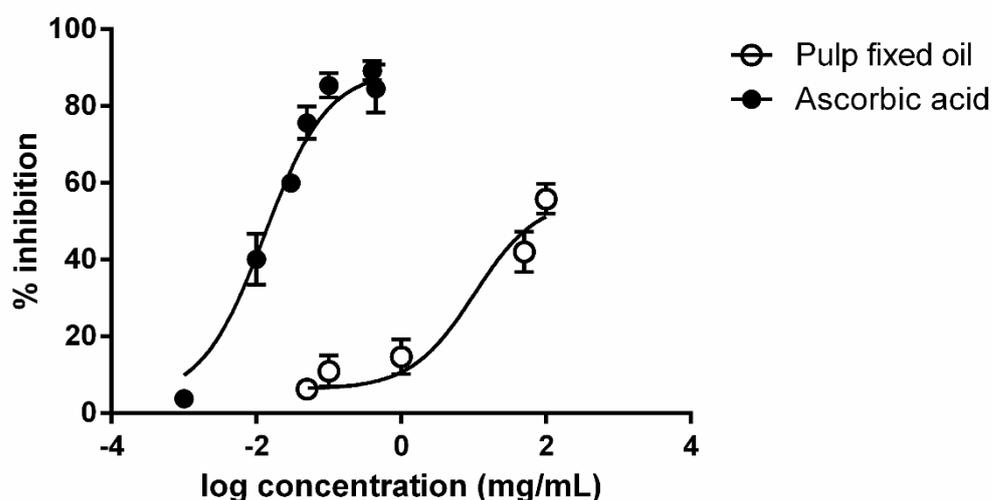


Figure 5: Concentration-response curves of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil or ascorbic acid in the DPPH scavenging test.

In the last set of experiments we investigated a potential antioxidant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil in the DPPH scavenging assay. We found that the oil caused a reduction of the stable radical DPPH, with an IC_{50} of 10.21 mg/mL (3.98 to 26.22 95 % confidence interval). The positive control ascorbic acid displayed an IC_{50} of 0.013 mg/mL (0.010 to 0.017 95 % confidence interval).

4. Discussion

Natural products and their derivatives have historically been invaluable as a source of therapeutic agents¹⁷. In fact, chemical substances derived from animals, plants and microbes have been a major source of lead compounds for the pharmaceutical industry¹⁷. For instance, about a half of small-molecule new chemical entities introduced between 1981 and 2002 were natural products or compounds derived from them¹⁷. In addition, many countries in Africa, Asia and Latin America use medicinal plants to help meet some of their primary health care needs¹⁸. In fact, medicinal plants are considered the main treatment option for up to 80 % of

population in several countries¹⁸.

In the present study we showed that oral administration of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil increases latency to the behavioral and electrographic seizures induced by PTZ, a convulsant that has been widely used in the study of mechanisms of seizure generation, spreading and termination, as well as development and screening of new compounds with anticonvulsant activity¹⁹. The occurrence of PTZ-induced myoclonic seizures in naïve animals has been classically attributed to activation of areas in the forebrain, mainly the thalamus, neocortex, and basal ganglia²⁰, whereas PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures have been considered to be the result of paroxysmal activity spreading from the forebrain to the brainstem²⁰. Therefore, the PTZ model displays substantial predictive value for discovery of new anticonvulsants to a broad range of seizure types. In fact, decrease of PTZ-induced myoclonic seizures indicates potential clinical efficacy against absence-like seizures, whereas attenuation of PTZ-induced tonic-clonic seizures suggests usefulness against many types of partial and generalized seizures^{20,21}.

The convulsant ability of PTZ largely depends on antagonism of the GABA_A receptor complex, likely through an allosteric interaction with the Cl⁻ channel which decreases the GABA-mediated inhibitory currents²². In this context, the anticonvulsant effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil might be mediated through activation of GABAergic system. However, in the present study the oil did not cause behavioral changes which should be expected after administration of compounds with GABA-like properties. For instance, anticonvulsant GABA_A receptor activators, such as benzodiazepines and barbiturates, also display sedative and anxiolytic properties²³. Altogether, our present results may indicate that other mechanisms than GABAergic modulation are involved in the anticonvulsant effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil. Notwithstanding, it is also important to note that no effects on spontaneous or forced motor performance or on object recognition memory were

detected, which is important in light of the typical adverse effects of classic anticonvulsants ⁵.

Regarding the potential mechanisms underlying the anticonvulsant effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil, antioxidant actions may play a role, in the present study we found that the oil was effective in the DPPH test, which indicates antioxidant activity. Accordingly, anticonvulsant effects have been described for a broad range of antioxidant substances including ascorbic acid, α -tocopherol, N-acetylcysteine, resveratrol and curcumin ²⁴. In addition to antioxidant, anti-inflammatory effects may contribute, since compelling evidence indicates that anti-inflammatory compounds also display anticonvulsant activity ²⁵, and anti-inflammatory activity has been described for the *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil. In fact, oral administration of the oil significantly reduced the gastric lesions induced by ethanol and aspirin in rats ¹¹, and topical application of the oil reduced the ear edema and migration of inflammatory cells (polymorphonuclear neutrophils) in the dermis of animals exposed to croton oil or arachidonic acid ¹¹.

In summary, the present study showed a significant anticonvulsant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil against PTZ-induced seizures in mice. No adverse effects on motor functions were detected in the open-field, rotarod or forced swim tests. Further studies are needed to evaluate the mechanisms underlying the anticonvulsant effects of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil as well as the potential of the oil as a source of new anticonvulsant compounds.

References

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475-482
2. Schmidt D and Sillanpaa M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2012; 25: 159-163

3. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-472
4. Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 757-776
5. Perucca E and Meador KJ. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand Suppl* 2005; 181: 30-35
6. Nsour WM, Lau CB and Wong IC. Review on phytotherapy in epilepsy. *Seizure* 2000; 9: 96-107
7. Sucher NJ and Carles MC. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2015
8. Costa IR, Araujo FS and Lima-Verde LW. Flora and autecology's aspects of a disjunction cerrado at Araripe plateau, Northeastern Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 2004; 18: 759-770
9. Oliveira MEB, Guerra NB, Maia AHN, et al. Chemical and physical-chemical characteristics in pequi from the Chapada do Araripe, Ceará, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2010; 32: 114-125
10. Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J Ethnopharmacol* 2011; 136: 504-510
11. Quirino GS, Leite GO, Rebelo LM, et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. *Phytochemistry Letters* 2009; 2: 179-183
12. Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, et al. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 2004; 24: 2328-2334
13. Bevins RA and Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-

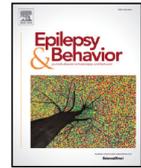
- matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 2006; 1: 1306-1311
14. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, et al. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol* 2003; 54: 283-311
 15. Sunal R, Gumusel B and Kayaalp SO. Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test". *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 891-896
 16. Kedare SB and Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48: 412-422
 17. Koehn FE and Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 206-220
 18. Organization WH. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva: WHO Press, 2013
 19. White HS, Smith-Yockman M, Srivastava A, et al. Therapeutic Assays for the Identification and Characterization of Antiepileptic and Antiepileptogenic Drugs. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA and Moshé SL, eds. *Models of Seizures and Epilepsy*, Amsterdam, Elsevier, 2006: pp. 539-549.
 20. Velíšková J. Behavioral Characterization of Seizures in Rats. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA and Moshé SL, eds. *Models of Seizures and Epilepsy*, Amsterdam, Elsevier, 2006: pp. 601-611.
 21. Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; 20: 359-368
 22. Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, et al. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 986-995
 23. Johnston GA. GABA(A) receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des* 2005; 11:

1867-1885

24. Martinc B, Grabnar I and Vovk T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. *Curr Neuropharmacol* 2014; 12: 527-550
25. Mello CF and Oliveira MS. Commentary on Kaushik et al.: Prostaglandin D2 is crucial for seizure suppression and postictal sleep. Novel evidence supporting a role for prostanoid receptors in seizure control. *Exp Neurol* 2014; 257: 157-161

5.2 ARTIGO 2

Publicado na revista *Epilepsy e Behavior*.



Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures



Cleide Correia de Oliveira^{a,b}, Clarissa Vasconcelos de Oliveira^c, Jéssica Grigoletto^c, Leandro Rodrigo Ribeiro^c, Vinícius Rafael Funck^c, Ana Cláudia Beck Grauncke^c, Thaíze Lopes de Souza^c, Naieli Schiefelbein Souto^d, Ana Flávia Furian^{c,d}, Irwin Rose Alencar Menezes^e, Mauro Schneider Oliveira^{a,c,*}

^a Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Department of Nursing, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

^c Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Graduate Program in Food and Science Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^e Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2015

Revised 22 December 2015

Accepted 23 December 2015

Available online xxxx

Keywords:

Convulsion

PTZ

EEG

Natural product

Phytomedicine

Cannabinoids

ABSTRACT

Increasing evidence suggests that plant-derived extracts and their isolated components are useful for treatment of seizures and, hence, constitute a valuable source of new antiepileptic drugs with improved efficacy and better adverse effect profile. β -Caryophyllene is a natural bicyclic sesquiterpene that occurs in a wide range of plant species and displays a number of biological actions, including neuroprotective activity. In the present study, we tested the hypothesis that β -caryophyllene displays anticonvulsant effects. In addition, we investigated the effect of β -caryophyllene on behavioral parameters and on seizure-induced oxidative stress. Adult C57BL/6 mice received increasing doses of β -caryophyllene (0, 10, 30, or 100 mg/kg). After 60 min, we measured the latencies to myoclonic and generalized seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ, 60 mg/kg). We found that β -caryophyllene increased the latency to myoclonic jerks induced by PTZ. This result was confirmed by electroencephalographic analysis. In a separate set of experiments, we found that mice treated with an anticonvulsant dose of β -caryophyllene (100 mg/kg) displayed an improved recognition index in the object recognition test. This effect was not accompanied by behavioral changes in the open-field, rotarod, or forced swim tests. Administration of an anticonvulsant dose of β -caryophyllene (100 mg/kg) did not prevent PTZ-induced oxidative stress (i.e., increase in the levels of thiobarbituric acid-reactive substances or the decrease in nonprotein thiols content). Altogether, the present data suggest that β -caryophyllene displays anticonvulsant activity against seizures induced by PTZ in mice. Since no adverse effects were observed in the same dose range of the anticonvulsant effect, β -caryophyllene should be further evaluated in future development of new anticonvulsant drugs.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a common neurological disease, which affects [1] and has been considered a major worldwide public health problem [2]. Recurrent epileptic seizures and behavioral comorbidities such as depression, anxiety, psychosis, and cognitive deficits largely affect the quality of life of the patients with epilepsy and their families [3]. There is the further complication that seizures in a significant percentage of patients remain inadequately controlled by currently available pharmacological treatments [4]. In addition, most anticonvulsant drugs display

adverse effects such as ataxia, sedation, and cognitive dysfunction at serum concentrations within the therapeutic range for epileptic seizures [5]. Accordingly, discovery of a new anticonvulsant with better efficacy and improved safety profile is of fundamental importance [4]. In this context, several plant extracts and products may be useful for the treatment of convulsions or seizures, and therefore, natural products constitute a promising source of new antiepileptic drugs [6].

β -Caryophyllene is a natural bicyclic sesquiterpene that is a constituent of many plants [7]. Several biological activities have been reported for β -caryophyllene, including anti-inflammatory [7], anti-alcoholism [8], antinociceptive [9], anxiolytic, and antidepressant [10] properties. Interestingly, recent accumulating evidence indicates that β -caryophyllene is neuroprotective in several experimental paradigms [11–14]. For instance, administration of β -caryophyllene protects against cerebral ischemic injury in rats [11,14] and reduces astrogliosis and microglial activation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [12]. Since neuroprotective compounds may display anticonvulsant activity

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, no. 1000, Prédio 21, sala 5207, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9378; fax: +55 55 3220 8241.

E-mail address: ms.oliveira@ufsm.br (M.S. Oliveira).

and vice versa [15], and in order to further evaluate the potential therapeutic applications of β -caryophyllene, our present study aimed to test the hypothesis that this natural compound displays anticonvulsant effects. In addition, we investigated the effect of β -caryophyllene on selected behavioral parameters and on seizure-induced oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Animals and reagents

Adult C57BL/6 mice (25–35 g, 60–90 day-old) of both genders were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light–dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to water and food (Purotrato, Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols aimed to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (process 016/2014). Pentylentetrazol (PTZ) and β -caryophyllene were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All other chemicals were reagent grade and purchased from local suppliers.

2.2. Behavioral seizure evaluation

Animals were individually placed in glass boxes and injected with increasing doses of β -caryophyllene (10, 30, or 100 mg/kg; i.p.) or its vehicle (0.9% NaCl containing 0.05% Tween 80). Sixty minutes thereafter, PTZ (60 mg/kg, i.p.) was injected, and the animals were observed for 15 min. During this time, we recorded the latency to myoclonic jerks, latency to generalized seizure, and the duration of the first generalized seizure. All solutions were administered at 10 mL solution per kg of body weight. Doses and schedules for drug injections were selected based on the literature [11,14] and on pilot experiments.

2.3. Electroencephalographic (EEG) recordings

Seizure activity and the effect of β -caryophyllene were evaluated in a subset of animals ($n = 3$ – 4) by EEG recordings. For recording electrode implantation, animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, two stainless steel screw electrodes were placed over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to the multipin socket and were fixed to the skull. Meloxicam (200 mg/kg, s.c.) and metanzole (100 mg/kg, s.c.) were administered immediately before and for three days after the surgical procedure.

Six days after the surgery, each animal was transferred to a Plexiglas cage ($25 \times 25 \times 40$ cm) and habituated for 20 min before EEG recordings. The mouse was then connected to a $100\times$ headstage pre-amplifier (model #8202-DSE3) in a low-torque swivel (Pinnacle Technology Inc., Lawrence, KS, USA), and the EEG was recorded using a PowerLab 16/30 data acquisition system running LabChart 7.2 software (AD Instruments, Castle Hill, Australia). Routinely, a 30-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After the baseline recording, mice were injected with β -caryophyllene (100 mg/kg) or vehicle, 60 min before the injection of PTZ. Following convulsant injection, the EEG signals were recorded for 15 min. Electroencephalographic signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 1024 Hz), and stored in a PC for off-line analysis.

2.4. Behavioral tests

In order to investigate the effects of an anticonvulsant dose of β -caryophyllene (100 mg/kg) on exploratory behavior and motor skills of the mice, we evaluated performance in the open-field, object recognition, rotarod, and forced swim tests. Independent groups of mice were used in each test, and each animal was used only once.

2.4.1. Open-field test

Animals were placed in the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. Five areas of the apparatus had their borders limited by the walls of the arena and were considered as peripheral areas. The remaining five areas that had no contact with the walls of the apparatus were considered as central areas. β -Caryophyllene (100 mg/kg) or its vehicle were injected 60 min before the beginning of the test, and the number of crossed areas (crossings) as well as the number of rearing responses (animal stands on its hind legs) were recorded for 5 min.

2.4.2. Object recognition test

The object recognition test consisted of three sessions, namely, habituation #1 (first training session), habituation #2 (second training session, 4 h after training), and memory evaluation (test session, 24 h after habituation #1). During the first training session, two identical objects (transparent cylindrical plastic bottles) were equidistantly placed in the center of the same open-field arena described above, and the time spent in exploration of each object was recorded for 10 min. Four hours thereafter (habituation #2), one of the bottles was replaced for a new object (plastic red apple), and the time spent in exploration of each object was measured for 10 min. Finally, 24 h after training, the plastic red apple was replaced with another new object (triangular plastic cup), and the time spent in exploration of each object was recorded for 10 min (test session). Any subjects that failed to complete a minimum of 10-second exploration time in the test trial (three vehicle-treated and three β -caryophyllene-treated animals) were excluded from the analysis. The object recognition index was calculated with the following formula: recognition index = (time spent in new object) / (time spent in the new object + time spent in the familiar object). β -Caryophyllene (100 mg/kg) or its vehicle were injected 60 min before the beginning of the test session.

2.4.3. Rotarod test

Fine motor coordination was assessed by using the rotarod test. The task consisted of one training session and one testing session, carried out 24 h apart. Trial starts with the mouse being placed in the apparatus (3.7 cm rod diameter, 8 rpm constant speed) and ends when the mouse falls off the rod or after reaching the cutoff time of 60 s two consecutive times. During the training session, the maximum number of attempts was 10. A resting time of 60 s was allowed between each trial. In the test session, mice were observed for 4 min, and the latency to the first fall was recorded. β -Caryophyllene (100 mg/kg) or its vehicle were injected 60 min before the beginning of the test session.

2.4.4. Forced swim test

Mice were placed in individual, clear polyvinyl chloride (PVC) cylinders (30 cm tall \times 10 cm diameter) containing 23–25 °C water (20 cm deep to prevent the mouse's tail from touching the cylinder bottom). Water was changed between subjects. The immobility time during the 5 min of test was recorded. Immobility was assigned when no additional activity was observed other than that required to keep the mouse's head above water. β -Caryophyllene (100 mg/kg) or its vehicle were injected 60 min before the beginning of the test session.

2.5. Neurochemical assays

In order to investigate whether an anticonvulsant dose of β -caryophyllene (100 mg/kg) would protect against seizure-induced oxidative stress, we measured thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and nonprotein thiols (NPSH) in an independent group of mice treated with β -caryophyllene and PTZ. The experimental design consisted of four groups: vehicle + NaCl 0.9%, vehicle + PTZ, β -caryophyllene + NaCl 0.9%, and β -caryophyllene + PTZ. β -Caryophyllene or its vehicle were injected 60 min before the injection of PTZ or NaCl 0.9%, and after 15 min of behavioral seizure evaluation, the cerebral cortex and hippocampus of the animals were homogenized in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4).

2.5.1. TBARS content

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, according to the method described by Boeira et al. [16]. Thiobarbituric acid-reactive substance content was measured in a medium containing 100 μ L of tissue homogenate, 15 μ L of 8.1% SDS, 60 μ L of acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), and 115 μ L of 0.81% thiobarbituric acid. The mixture was heated at 95 $^{\circ}$ C for 120 min in a water bath. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm. The results were calculated as nmol MDA/mg of protein.

2.5.2. NPSH content

Nonprotein thiol levels were determined according to the method described by Boeira et al. [16]. Homogenates were precipitated with TCA (10%) and subsequently centrifuged at 3000 \times g at 4 $^{\circ}$ C for 10 min. After the centrifugation, the supernatant fraction (100 μ L) was added

to a reaction medium containing potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4) and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 10 mM). The NPSH levels were measured spectrophotometrically at 412 nm. The results were calculated using a standard curve constructed with reduced glutathione (GSH) and expressed as nmol NPSH/mg of protein.

2.6. Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov test was used to verify data normality, and Bartlett's test was used to verify homogeneity of variances. Seizure latencies were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by post hoc analyses with the Mann-Whitney test with sequential Holm-Bonferroni correction. Dose-response relationships were tested with the Spearman's rank correlation test. Seizure duration was analyzed by one-way ANOVA. Data from behavioral testing were analyzed by Student's *t*-test. The TBARS and NPSH contents were analyzed by a two-way ANOVA. A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Fig. 1 shows the effect of increasing doses of β -caryophyllene on the seizures induced by PTZ. Statistical analysis revealed that the dose of 100 mg/kg increased the latency for the first myoclonic jerk (167% average increase versus vehicle-treated mice) [$H(4) = 8.069$, $P < 0.05$ – Fig. 1A]. Spearman's analysis revealed a significant positive correlation between the doses of β -caryophyllene and the latency to PTZ-induced myoclonic seizures ($r_s = 0.4237$, $P < 0.005$). Onset latency [$H(4) = 1.542$, $P > 0.05$ – Fig. 1B] and duration [$F(3,41) = 0.5221$, $P > 0.05$ – Fig. 1C] of the first PTZ-induced generalized tonic-clonic seizure did not significantly change. Mortality rate was zero since no mouse died

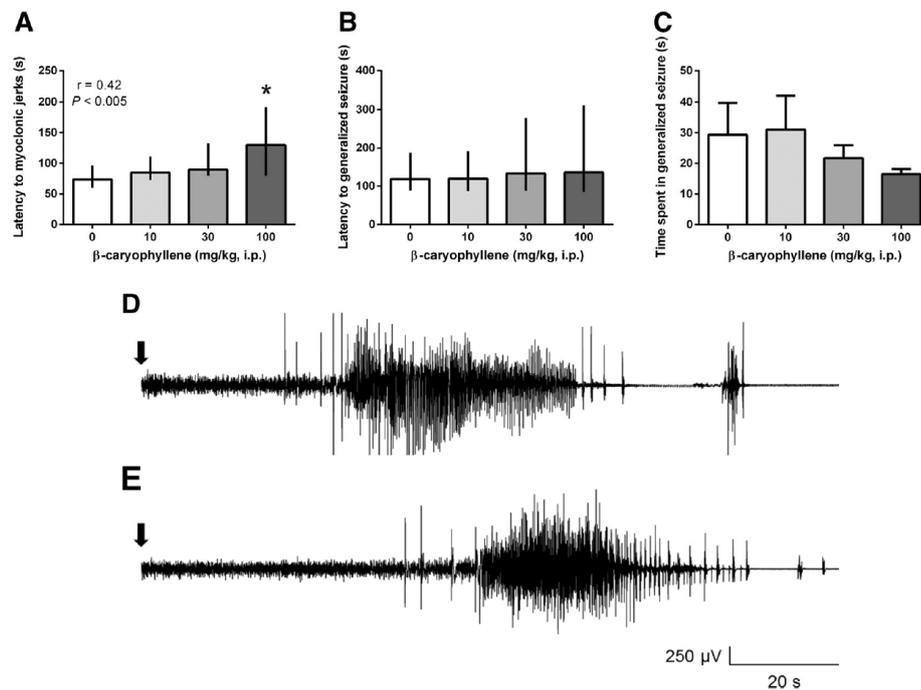


Fig. 1. Effect of β -caryophyllene on seizure behavior. Latency to (A) myoclonic jerks or (B) generalized tonic-clonic seizures and (C) duration of generalized seizures induced by PTZ were measured after the intraperitoneal administration of β -caryophyllene. Data are presented as median and interquartile range for $n = 8$ –14 each group. The Spearman's correlation coefficient and its respective *P* appear as the inset in A. The asterisk indicates a statistically significant difference from control group ($P < 0.05$). Representative electroencephalograms observed in the cerebral cortex of mice after administration of (D) vehicle plus PTZ or (E) β -caryophyllene (100 mg/kg) plus PTZ are also shown. The arrow indicates the administration of PTZ.

Table 1

Effect of β -caryophyllene (100 mg/kg) on selected behavioral parameters. Independent groups of mice ($n = 9$ per group) were used in each test. Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analyses were performed with two-tailed unpaired Student's t .

| Behavioral parameter | Treatment | |
|--------------------------|-------------------|------------------------|
| | Vehicle | β -Caryophyllene |
| Crossings | 70.56 \pm 5.85 | 59.00 \pm 7.14 |
| Rearing responses | 7.00 \pm 1.87 | 6.67 \pm 2.16 |
| Time spent in center (%) | 9.83 \pm 1.46 | 6.17 \pm 1.37 |
| Latency to fall (s) | 194.4 \pm 30.13 | 149.1 \pm 27.34 |
| Immobility time (s) | 79.67 \pm 19.63 | 50.78 \pm 13.38 |

during the post-PTZ 15-min evaluation period. Electroencephalographic recordings confirmed and extended the data related to the effect of the β -caryophyllene on the seizures induced by PTZ (Fig. 1D–E). Treatment with β -caryophyllene (100 mg/kg) delayed the appearance on the EEG of PTZ-induced myoclonic jerks but did not alter the duration or the generalized seizure-associated wave patterns in the EEG recordings, which appeared as a combination of multispikes plus slow waves, multiple sharp waves, and major seizure activity.

In order to investigate whether effects on behavior accompanied the anticonvulsant effect of β -caryophyllene, we tested an independent group of mice in the open-field, rotarod, forced swim, and object recognition tests. No significant differences were found in the number of crossings [$t(16) = 1.252$, $P > 0.05$ – Table 1], rearings [$t(16) = 0.1164$, $P > 0.05$ – Table 1], or time spent in the center [$t(16) = 1.823$, $P > 0.05$ – Table 1] in the open-field test. In addition, the latency to fall off the rod was not statistically different between vehicle-treated and β -caryophyllene-treated animals [$t(16) = 1.114$, $P > 0.05$ – Table 1]. Moreover, no significant differences were found in the immobility time in the forced swim test [$t(16) = 1.216$, $P > 0.05$ – Table 1]. Interestingly, a significant difference between vehicle-treated and β -caryophyllene-treated animals was found in the object recognition test. Animals treated with β -caryophyllene displayed higher values of object recognition index than their vehicle-treated counterparts [$t(14) = 4.204$, $P < 0.05$ – Fig. 2A]. The total time spent in object exploration during the test trial was not significantly different between β -caryophyllene-treated and vehicle-treated animals ($t(14) = 0.5874$, $P > 0.05$ – Fig. 2B).

In the last set of experiments, we investigated the effect of β -caryophyllene on seizure-elicited oxidative stress. Seizures induced by PTZ increased TBARS levels in the cerebral cortex [$F(1,24) = 4.45$, $P < 0.05$ – Fig. 3A] but not in the hippocampus [$F(1,24) = 0.0981$, $P > 0.05$ – Fig. 3B]. On the other hand, NPSH content was unaltered in the cerebral cortex [$F(1,24) = 0.2889$, $P > 0.05$ – Fig. 3C] but decreased in the hippocampus [$F(1,24) = 7.186$, $P < 0.05$ – Fig. 3D] after PTZ-induced seizures. Treatment with β -caryophyllene did not significantly alter these seizure-induced neurochemical changes.

4. Discussion

Increasing evidence suggests that β -caryophyllene displays neuroprotective actions. For instance, β -caryophyllene significantly attenuated morphological deterioration and lactate dehydrogenase release in mixed rat cortical neurons/glia cultures submitted to oxygen–glucose deprivation [11]. Moreover, incubation of C6 glioma cells with β -caryophyllene prevented the cytotoxicity induced by the excitatory amino acid glutamate [17]. Importantly, these in vitro findings are corroborated by results obtained from experiments in intact animals. In fact, administration of β -caryophyllene decreased cerebral infarct size and edema [11,14] and prevented the decline of neurological deficit scoring [14] after middle cerebral artery occlusion in rats. In addition, β -caryophyllene prevented cognitive impairment, β -amyloid burden, astrogliosis, and microglial activation in the APP/PS1 transgenic mice model of Alzheimer's disease [12].

Despite these compelling lines of evidence that β -caryophyllene is neuroprotective, to the best of our knowledge, only one study has investigated the effect of this natural product on seizures [13]. In the study by Liu et al. [13], mice received a 2-day treatment with β -caryophyllene (30 or 60 mg/kg, i.p.) before a single systemic dose of kainate. Animals pretreated with β -caryophyllene exhibited lower seizure scores when compared with the vehicle–kainate group, suggesting that treatment with β -caryophyllene attenuates the seizure activity induced by administration of this excitotoxin [13]. Taking into consideration our present results, systemic administration of β -caryophyllene increased latency to the myoclonic seizures induced by PTZ, a convulsant that has been widely used in the study of mechanisms of seizure generation, spreading, and termination, as well as development and screening of new compounds with anticonvulsant activity [18]. Importantly, EEG experiments confirmed the results from behavioral seizure analysis, demonstrating that the β -caryophyllene-induced delay of seizure onset also occurs at the electrophysiological level. Altogether, these results suggest that β -caryophyllene is anticonvulsant in seizure models with substantial predictive value for discovery of new anticonvulsants [18]. In this context, future studies shall evaluate the anticonvulsant potential of β -caryophyllene in other seizure models. Moreover, other treatment schedules (e.g., chronic administration) should be tested, since repeated administration may change anticonvulsant efficacy [19]. In fact, the efficacy of some clinically useful anticonvulsants, including primidone, valproate, and vigabatrin, may increase during prolonged treatment [19].

The present results are particularly interesting in light of the recognized low toxicity of β -caryophyllene. In fact, the acute administration of doses up to 5 g/kg in mice did not cause mortality or signs of toxicity [20], and the LD50 in rats or rabbits exceed 5 g/kg [21]. Moreover, β -caryophyllene was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* strains or in an unscheduled DNA synthesis assay at concentrations up to 150 mg/plate and 10 mg/mL [22]. In this context, it is important to

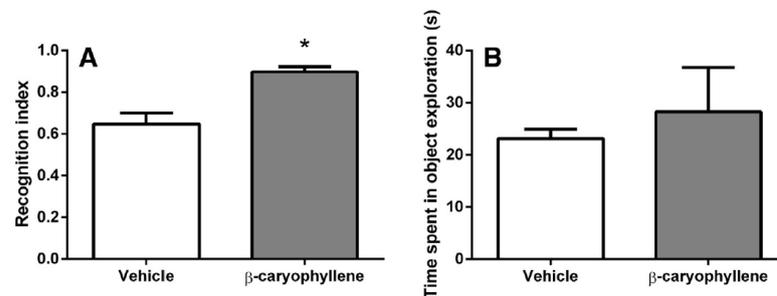


Fig. 2. Effect of β -caryophyllene (100 mg/kg) on mice performance in the object recognition test. (A) Recognition index and (B) total time spent in object exploration during test trial. β -Caryophyllene (100 mg/kg) or its vehicle were injected 60 min before the beginning of the test session. Data are mean \pm standard error of the mean for $n = 8$ per group. The asterisk indicates a statistically significant difference from control group ($P < 0.05$).

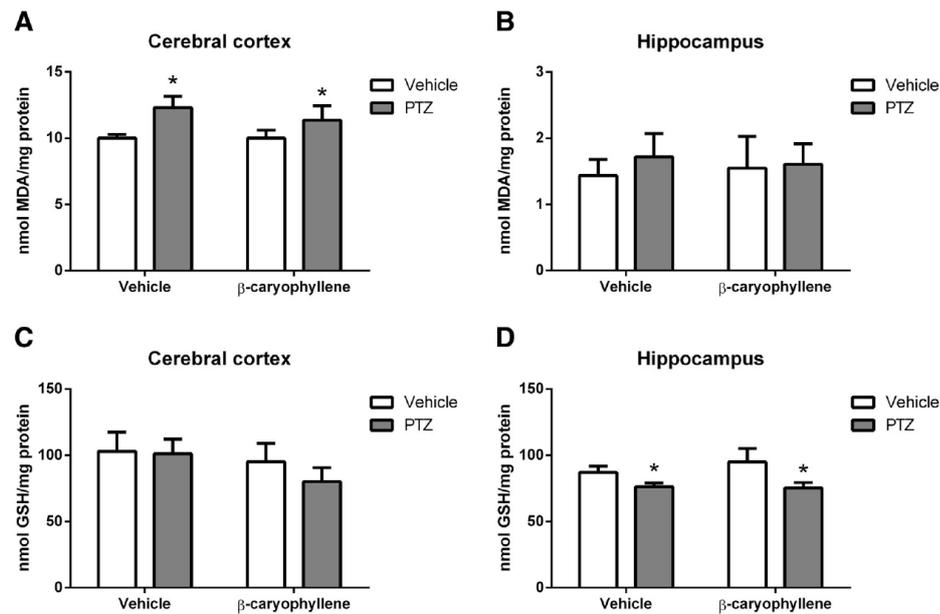


Fig. 3. Lack of effect of β -caryophyllene (100 mg/kg) on seizure-induced oxidative stress. TBARS content in the (A) cerebral cortex and (B) hippocampus and NPSH content in the (C) cerebral cortex and (D) hippocampus. Data are mean + standard error of the mean for $n = 6-8$ each group. The asterisk indicates a statistically significant difference from control group ($P < 0.05$).

note that the presently reported anticonvulsant effect of a single dose of β -caryophyllene was not accompanied by adverse effects related to spontaneous (open-field exploration) or forced (swimming test) locomotor activity and on motor coordination performance (rotarod), further suggesting the low toxicity of this natural product.

Interestingly, we found that animals treated with β -caryophyllene displayed higher values of object recognition index than their vehicle-treated counterparts. Since the schedule for β -caryophyllene administration in this set of experiments was planned to match that used in the anticonvulsant test (i.e., injection of the compound 60 min before PTZ), β -caryophyllene was administered 60 min before the beginning of the test session (24 h after habituation). Regarding this point, this finding may be suggestive of improved memory recall ability after administration of β -caryophyllene. Notwithstanding, it should be noted that the object recognition test has become a widely used model for the investigation into learning and memory alterations, but results from this test may also reflect changes in behavioral parameters of attention, anxiety, and preference for novelty [23]. Therefore, additional studies are needed to investigate the potential clinical implications of these findings as well as its underlying mechanisms.

We also found that administration of an anticonvulsant dose of β -caryophyllene did not protect against seizure-induced increase in TBARS content and decrease in NPSH levels, suggesting that β -caryophyllene did not affect PTZ-induced oxidative stress. In this context, Liu et al. [13] reported that a two-day pretreatment with β -caryophyllene attenuated the kainic acid-induced increase in TBARS levels and decrease of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities. Although these findings appear somewhat conflicting with our present results, in the study by Liu et al. [13], the protective effect of β -caryophyllene against seizure-induced oxidative stress accompanied a significant decrease of seizure severity (lower seizure scores of β -caryophyllene-treated animals). Conversely, in the present study, β -caryophyllene did not have an effect on the duration of generalized seizures, suggesting that PTZ-induced seizure

severity was not altered. In this context, since it has been demonstrated that kainic acid-induced seizure scores correlate positively with MDA or protein carbonyl contents and negatively with glutathione peroxidase activity or reduced/oxidized glutathione ratio [24], it is possible that improvement of seizure-induced oxidative stress depends on a concomitant decrease of seizure severity. Alternatively, important methodological differences between the present study and that by Liu et al. [13] should be noted, including the convulsant (kainic acid versus PTZ) and the schedule of β -caryophyllene administration (one versus two injections).

5. Conclusion

β -Caryophyllene displayed anticonvulsant activity against seizures induced by PTZ and improved recognition index in the object recognition test. No adverse effects on motor functions were detected in the open-field, rotarod, or forced swim tests. More studies are needed to evaluate the mechanisms underlying the anticonvulsant effects of β -caryophyllene as well as its potential as a safer, better tolerated, new anticonvulsant compound.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to C.C.O., C.V.O., V.R.F., L.R.R. and N.S.S.), CNPq/Pibic (to A.C.B.G.) and Fapergs/Probic (to J.G. and T.L.S.). A.F.F., I.R.A.M. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. The authors thank Dr. Luiz Fernando Freire Royes and Michele Rechia Figuera for kindly providing the EEG laboratory facilities.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:475–82.
- [2] Schmidt D, Sillanpaa M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2012;25:159–63.
- [3] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005;46:470–2.
- [4] Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:757–76.
- [5] Perucca E, Meador KJ. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* 2005; 181:30–5 (Suppl.).
- [6] Sucher NJ, Carles MC. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2015;52(Pt B):308–18.
- [7] Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9099–104.
- [8] Al Mansouri S, Ojha S, Al Maamari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Bahi A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;124:260–8.
- [9] Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K, Nakamura H, et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. *Eur J Pain* 2013;17:664–75.
- [10] Bahi A, Al Mansouri S, Al Memari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Ojha S. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol Behav* 2014;135:119–24.
- [11] Choi IY, Ju C, Anthony Jalin AM, Lee Da I, Prather PL, Kim WK. Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. *Am J Pathol* 2013;182:928–39.
- [12] Cheng Y, Dong Z, Liu S. β -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. *Pharmacology* 2014;94:1–12.
- [13] Liu H, Song Z, Liao D, Zhang T, Liu F, Zhuang K, et al. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. *Neurochem Res* 2015;40:118–23.
- [14] Chang HJ, Kim JM, Lee JC, Kim WK, Chun HS. Protective effect of β -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. *J Med Food* 2013;16: 471–80.
- [15] Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1053: 137–47.
- [16] Boeira SP, Filho CB, Del'Fabbro L, Royes LF, Jessé CR, Oliveira MS, et al. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. *Toxicol* 2012;60:358–66.
- [17] Assis LC, Straliootto MR, Engel D, Hort MA, Dutra RC, de Bem AF. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. *Neuroscience* 2014;279:220–31.
- [18] White HS, Smith-Yockman M, Srivastava A, Wilcox KS. Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL, editors. *Models of seizures and epilepsy*. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 539–49.
- [19] Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011;20:359–68.
- [20] Molina-Jasso D, Alvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E. Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. *Biol Pharm Bull* 2009;32:520–2.
- [21] Opdyke DL. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet Toxicol* 1973;11: 1011–81.
- [22] Heck JD, Vollmuth TA, Cifone MA, Jagannath DR, Myhr B, Curren RD. An evaluation of food flavoring ingredients in a genetic toxicity screening battery. *Toxicologist* 1989; 9:257.
- [23] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 2012;13:93–110.
- [24] Shin EJ, Ko KH, Kim WK, Chae JS, Yen TP, Kim HJ, et al. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. *Neurochem Int* 2008;52:1134–47.

6 DISCUSSÃO

A epilepsia tem sido considerada um problema sério de saúde pública em todo o mundo (GOMES, 1997; NETO e MARCHETT, 2005), sendo umas das doenças neurológicas mais frequentes (BANERJEE, 2009), superada apenas pelo acidente vascular cerebral (AVC) e doença de Alzheimer (THURMAN et al., 2011).

Estudos com modelos animais têm sido significantes para a elucidação e compreensão dos mecanismos envolvidos na epileptogênese e são indispensáveis para o desenvolvimento de novos fármacos (BIALER, 2010). Sabe-se que 25-40% dos pacientes com epilepsia permanecem resistentes a terapia medicamentosa e continuam apresentando convulsões (SCHMIDT e SILLANPAA, 2012), e assim a pesquisa de novos fármacos para o tratamento da epilepsia é de suma importância.

No início de 1990 tivemos o desenvolvimento de várias DAE, e ficou evidenciado que tanto a eficácia como a tolerabilidade do tratamento medicamentoso da epilepsia não melhorou substancialmente (LÖSCHER e SCHMIDT, 2011). Os efeitos adversos ocorrem em dosagens terapêuticas, levando a um impacto na qualidade de vida e contribuindo para o insucesso do tratamento, chegando a 40% dos pacientes (PERUCA, 2005). Por causar alterações motoras, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER, 2005) o tratamento se torna difícil especialmente para os pacientes que estudam e trabalham (PERUCA, 2005). Além disso, as crises contínuas apresentam um impacto considerável na qualidade de vida dos pacientes, com isso aumentam os riscos de lesões, podendo influenciar também na memória, na função cognitiva, no trabalho e na vida social e econômica (SCHMIDT e SILLANPAA, 2012). Nesse contexto, novas DAEs são necessárias, e fármacos com diferentes mecanismos de ação podem permitir combinações sinérgicas e apresentar menos efeitos adversos (LEE, 2014).

Considerando a perspectiva histórica do uso de plantas para tratamento de doenças, é possível observar que os produtos naturais assumem papel relevante para a descoberta de novas fármacos (NEWMAN et al., 2003). Nas últimas décadas, os produtos naturais continuam sendo utilizados e, estima-se que, cerca de 25% a 30% de todas as fármacos avaliadas como agentes terapêuticos são derivados deles (VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008). De fato, as plantas medicinais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma

direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, como por exemplo a produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros) (CALIXTO, 2005).

Cerca de metade de pequenas moléculas químicas introduzidos entre 1981 e 2002 foram oriundas de produtos naturais ou compostos derivados deles (KOEHN, 2005). Na verdade, as plantas medicinais são consideradas a principal opção de tratamento para até 80% da população em vários países (WHO, 2011). No entanto, com o advento das tecnologias modernas e a química biológica nos últimos anos os cientistas conseguiram detalhar de forma exata os efeitos dos compostos naturais sobre o corpo humano, com a promessa do desenvolvimento de novos medicamentos e terapias contra várias doenças (JI, 2009).

Neste contexto, o nosso estudo teve como proposta avaliar o potencial anticonvulsivante do OFCC e do do β -cariofileno contra a convulsões induzidas pelo PTZ em camundongos.

Nossos resultados evidenciaram que a administração oral do OFCC na dose de 100 mg/kg aumentou a latência para as crises mioclônicas e a latência para a primeira crise tônico-clônica generalizada. Além disso, encontramos uma correlação positiva significativa entre as doses do OFCC e a latência para as convulsões mioclônicas e tônico-clônicas induzidas por PTZ, sugerindo um efeito dose-dependente. Entretanto, a duração das convulsões generalizadas induzidas por PTZ não foi alterada.

O PTZ é um modelo que tem sido bastante utilizado pelo alto valor preditivo para descoberta de fármacos clinicamente efetivos contra crises generalizadas do tipo ausência e tônico-clônicas (DICHTER, 2007). Além disso, o PTZ é uma das principais substâncias indutoras de convulsão utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes (LÖSCHER e SCHMIDT, 2002). A administração de PTZ também considerado um modelo importante no estudo de mecanismos envolvidos na geração e manutenção de crises epiléticas.

O PTZ é um antagonista do receptor GABA_A (LOSCHER, 2000) cuja capacidade de provocar convulsões inicia com a diminuição da ação pós-sináptica do GABA e subsequente ativação de diversos mecanismos sinápticos mediados por três receptores principais: os ionotrópicos para glutamato (NMDA - N-metil-D-

aspartato, AMPA - ácido alfa-amino-3-hidróxido-5-metil-4 isoxazole propiônico e cainato) (DHIR et al., 2005; LUKOMSKAYA et al., 2007).

Considerando os efeitos anticonvulsivantes obtidos com o OFCC no modelo de convulsões induzidas pelo PTZ, continuamos os estudos avaliando diversos parâmetros comportamentais para uma melhor caracterização do perfil psicofarmacológico do óleo. Os nossos resultados mostraram que a dose de 100 mg/kg do OFCC não alterou nenhum dos parâmetros avaliados sobre a performance motora espontânea ou forçada ou sobre a memória de reconhecimento de objeto. No campo aberto também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quanto ao número de cruzamentos. Diante do exposto, é importante observar que não foram detectados efeitos sobre o desempenho motor espontâneo ou forçado, o que é importante à luz dos efeitos adversos típicos dos anticonvulsivantes clássicos (PERUCCA, 2005).

Considerando o mecanismo de ação do PTZ, via receptores GABAérgicos, poderíamos sugerir que o efeito anticonvulsivo do OFCC pode ser mediado através da ativação do sistema GABAérgico. No entanto, no presente estudo, o OFCC não causou alterações comportamentais que são esperadas após a administração de compostos com propriedades tipo-GABA. Por exemplo, os ativadores do receptor do GABA_A clássicos, tais como os benzodiazepínicos e barbitúricos, são sedativos e exibem propriedades ansiolíticas (JOHNSTON, 2005) em doses que são eficazes contra as crises induzidas por PTZ. Esta modulação alostérica do GABA_A receptores acredita-se que representam as principais ações farmacológicas das benzodiazepinas, incluindo a sua actividade anti-convulsiva (ROGAWSKI, 2002).

De fato, drogas que bloqueiam os receptores GABA_A são convulsivantes muito potentes, como é o caso do PTZ e da picrotoxina (agentes promotores da crise). Enquanto que uma variedade de fármacos anticonvulsivantes tendem a refrear a excitabilidade neuronal ao prolongando as ações inibitórias do GABA, como por exemplo, os barbitúricos e benzodiazepinas, outras diminuem a tendência de certos neurônios dispararem potenciais de ação de alta frequência como, por exemplo, a fenitoína e carbamazepina (BEAR et al., 2010).

Em relação aos possíveis mecanismos subjacentes ao efeito anticonvulsivante do OFCC, podemos sugerir a participação de compostos antioxidantes presentes no óleo do Pequi. Verificamos que o óleo foi eficaz no teste DPPH, o que indica atividade antioxidante. Outras substâncias antioxidantes já

foram descritas na literatura como anticonvulsivantes, como ácido ascórbico, α -tocoferol, N-acetilcisteína, o resveratrol e a curcumina (MARTINC, 2014). Além das propriedades antioxidantes, não podemos descartar que o óleo também apresenta efeitos anti-inflamatórios (QUIRINO et al., 2009) que também podem contribuir para a atividade anticonvulsiva, uma vez que estudos indicam que os compostos anti-inflamatórios também exibem atividade anticonvulsiva (MELLO 2014).

O composto isolado do óleo essencial do *caryocar coriaceum* o β -cariofileno (BC), presente na polpa do Pequi, exibe efeitos anticonvulsivantes. O BC é um sesquiterpeno bicíclico, volátil, encontrado em grandes quantidades nos óleos essenciais de diversas especiarias e alimentos vegetais, como orégano (*Origanum vulgare L.*), canela (*Cinnamomum spp.*) e pimenta preta (*Piper nigrum L.*) (MOCKUTE et al., 2001; ORAV et al., 2004). Diversas evidências recentes têm sugerido que o β -cariofileno exibe ações neuroprotetoras. Por exemplo, no estudo de Choi et al. (2013) o β -cariofileno atenuou significativamente a deterioração morfológica e liberação de lactato desidrogenase em culturas mistas de neurônios corticais e glia submetidas a privação de glicose e oxigênio. Em outro estudo, a incubação de células de glioma C6 com β -cariofileno impediu a citotoxicidade induzida pelo aminoácido excitatório glutamato (ASSIS et al., 2014). É importante ressaltar que esses dados in vitro são corroborados pelos resultados obtidos a partir de experimentos em animais intactos. Por exemplo, a administração de β -cariofileno diminuiu o tamanho do enfarte e edema cerebral (CHANG et al., 2013; CHOI et al., 2013) e preveniu os déficits neurológicos (CHANG et al., 2013) após a oclusão da artéria cerebral média em ratos. Além disso, a administração de BC preveniu a disfunção cognitiva, e reduziu os níveis de β -amilóide e a astrogliose e ativação da microglia em um modelo animals transgênico da doença de Alzheimer (CHENG et al., 2014).

Apesar destas evidências convincentes de que o BC é neuroprotetor, até o presente momento apenas um estudo investigou o efeito deste produto natural sobre as crises epiléticas (LIU et al, 2015). No estudo de Liu et al (2015) o tratamento de dois dias com BC (30 ou 60 mg/kg ip) diminuiu a gravidade das crises convulsivas em ratos, sugerindo que o tratamento com o BC é capaz de atenuar a atividade convulsiva induzida por ácido caínico. Além disso, ficou evidenciado no estudo a capacidade do BC de exercer efeitos anti-inflamatórios cerebrais, atenuando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral α e

interleucina-1 β (LIU et al., 2015). Assim, mais estudos são necessários para determinar os mecanismos envolvidos nos efeitos anticonvulsivantes do BC. Um dos possíveis alvos a ser investigado em futuros estudos é o receptor canabinoide CB2, que é ativado pelo β -cariofileno (GERTSCH, 2008). Com a descoberta e clonagem dos receptores CB1 e CB2, muitos estudos tem demonstrado o papel fisiológico e também patológico dos componentes do sistema endocabinoide (ECS) (NIEHAUS et al, 2007; PIOMELLI, 2014), incluindo no tratamento de convulsões e epilepsia (MAGLÓCZKY et al., 2010; PERTWEE, 2012; HOFMANN e FRAZIER, 2013).

Ficou demonstrado no estudo de Bento et al (2011), que o BCP poderia constituir uma molécula segura para o desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias, com potencial terapêutico para o uso de doenças inflamatórias intestinais em humanos como, tais como ulcerativa colite e doença de Crohn.

A administração de BC aumentou a latência para as convulsões mioclônicas induzidas por PTZ, e estes dados foram confirmados com o registro eletroencefalográfico. Estes resultados adicionam informações a literatura sobre o potencial anticonvulsivante do BC e são especialmente interessantes tendo em vista a baixa toxicidade deste composto natural. De fato, estudos anteriores mostraram que a administração aguda de doses de até 5 g/kg em ratos não causou mortalidade ou sinais de toxicidade (MOLINA et al, 2009) e a LD₅₀ em ratos ou coelhos foi superior a 5 g/kg (OPDYKE, 1973).

Neste contexto, sugerem que o efeito anticonvulsivante do BC não acompanham efeitos adversos sobre a exploração espontânea (campo aberto) ou nado forçado, bem como na atividade locomotora e sobre o desempenho da coordenação motora (rotarod) sugerindo a baixa toxicidade. Um dado interessante obtido no segundo manuscrito foi que os animais tratados com BC exibiram valores mais elevados de índice de reconhecimento de objeto que os animais tratados com o veículo. Este dado pode ser sugestivo de uma melhor capacidade de evocação da memória após a administração de BC, e seria particularmente importante considerando que ocorreu na mesma dose e tempo de administração que a ação anticonvulsivante.

7 CONCLUSÃO

Conclusões parciais

- 1 - O OFCC apresentou atividade antioxidante no teste de neutralização do radical DPPH.
- 2 - O OFCC e o β -cariofileno exibiram atividade anticonvulsivante no modelo experimental de crises epiléticas agudas induzidas por PTZ em camundongos.
- 3 - A administração de uma dose anticonvulsivante do OFCC ou de β -cariofileno não alterou o desempenho dos camundongos nos testes de campo aberto, rotarod e nado forçado. Além disso o β -cariofileno, mas não o OFCC, aumentou o índice de reconhecimento de objetos.
- 4 - A administração de BC não protegeu do estresse oxidativo após as crises epiléticas agudas induzidas por PTZ em camundongos.

Conclusão final

Tanto o óleo da polpa de *Caryocar coriaceum Wittm* quanto o β -cariofileno apresentaram atividade anticonvulsivante. Estes dados podem contribuir para o futuro desenvolvimento de estratégias anticonvulsivantes. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos subjacentes aos efeitos anticonvulsivantes.

REFERÊNCIAS

ACEP. **Tecnologias agrícolas e de conservação ambiental para o topo da Chapada do Araripe**. Fortaleza: FINEP-BNB, 1999

AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. Phytochemical investigation and evaluation of antiinflammatory and anti-arthritic activities of essential oil of *Strobilanthus ixiocephala* Benth. **Indian journal of experimental biology**. 2003 Aug;41(8):890-4. PubMed PMID: 15248491.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA, FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p

ARAÚJO, A. J.; LORDELLO, A. L. L.; SALES-MAIA, B. H. L. N.; Análise Comparativa dos Óleos Essenciais de Folhas e Galhos de *Ocotea puberula* (LAURACEAE). **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, p. 81-84, 2001

ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C, DE BEM, A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, 2014; 279: 220-31.

BANERJEE, P. N.; FILIPPI, D. ALLEN, HAUSER, W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. **Epilepsy Research**. 2009;85(1):31-45.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociência – Desvendando o Sistema Nervoso**. 3. ed. Artmed, Porto Alegre, 593. 2010.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. Sistemática de angiospermas do Brasil. Vol. 1. Rio de Janeiro: **Livros Técnicos e Científicos**; São Paulo: EDUSP, 1978, 225p.

BATISTA, J. S. SILVA, A. E. RODRIGUES, C. M. F. COSTA, K. M. F. M., OLIVEIRA, A. F. PAIVA, E. S. NUNES, F. V. A. OLINDA, R. G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de Pequi (*caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em RATOS **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 77, n. 3, p. 441-447, jul./set., 2010.

BAZAN, N. G.; MARCHESELLI, V. L.; COLE-EDWARDS, K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2005;1053: 137-147.

BEN-ARI, Y. et al. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 515-528, 1980.

BENDER, D. A. As vitminas, In: GIBNEY, M. J.; VORSTER, H. H.; KOK, F. J. (Ed.). **Introdução à nutrição humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 8, p. 114-161.

BEN-MENACHEM, E.; CHADWICK, D. W.; MOSHÉ, S. L.; PELLOCK, J. M.; PERUCC, E.; PEDLEY, T. A. **General treatment considerations. epilepsy: a comprehensive textbook**, por Jerome Engel, Timothy A. Pedley, Jean Aicardi, Marc A Dichter, Solomon Moshé. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2. ed., 2007.

BENTO, A. F.; MARCON, R.; DUTRA, R. C.; CLAUDINO, R. F.; COLA, M.; LEITE D. F.; CALIXTO, J. B. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. **The American Journal of Pathology**. 2011 Mar;178(3):1153-1166. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.052

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**. 2011 52(6): 1058-1062.

BERG, A. T.; BERKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J. H.; VAN EMDE BOAS W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T. A.; MATHERN, G. W.; MOSHE, S. L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I. E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**. 2010 51(4):676- 685.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 68-82, 2010.

BORGES, K. K.; BORGES, M. A.; SANTOS, F. H. dos; SANTOS, A. B.; SOUZA, E. A. P. de. Fatores que influenciam a qualidade de vida de pessoas com epilepsia. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v. 5, n. 2, 2010.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Imprensa Oficial, Fortaleza, Brazil, 1960.540 pp.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: **EPAMIG**, 2002. 528p.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. (Ed.). Goodman & Gilman's. **Manual of pharmacology and therapeutics**. New York: McGraw Hill, 2006.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnofarmacol**. 2005 100: 131-134

CANTILINO, A.; CARVALHO, J. A. Psicoses relacionadas à epilepsia: um estudo teórico. **Revista Neurobiologia**. 64 (3-4): 109-16, 2001.

CASTRO, A. A. J. F.; CASTRO, N. M. C. F.; COSTA, J. M. da; FARIAS, R. R. S. de; MENDES, M. R. A.; ALBINO, R. S.; BARROS, J. S.; OLIVEIRAS, M. E. A. Cerrados

marginais donordeste e ecótonos associados. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.1, p. 273-275, 2007

CASTRO, A. A. J. F. Cerrados do Brasil e do Nordeste: considerações sobre os fatores ecológicos atuantes, ocupação, conservação e fitodiversidade. **Revista Econômica do Nordeste**, 1996 27(2):183-205.

CHANG, H. J.; KIM, J. M.; LEE, J. C.; KIM, W. K.; CHUN, H. S. Protective effect of β -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. **Journal Medicinal Food**. 2013;16: 471-80

CHENG, Y, DONG Z, LIU, S. β -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. **Pharmacology**. 2014;94: 1-12.

CHOI, I. Y, J. U; C, ANTHONY. JALIN, A. M; LEE, D. I, PRATHER, P. L, KIM, W. K. Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. **The American Journal Pathology**. 2013;182: 928-39.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, 1926. v. 1., 747p.

COSTA, A. A. & ARAÚJO, G. M. Comparação da vegetação arbórea de cerrado e de cerrado na Reserva do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**. 152001. 63-72.

COSTA, I. R.; ARAÚJO, F. S. & LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos autoecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 18: 2004 759-770.

DE OLIVEIRA, M. E. B., GUERRA, N. B., MAIA, A. D. N., ALVES, R. E., MATOS, N. M. D., SAMPAIO, F. G. M., LOPES, M. M. T., 2010. Chemical and physical-chemical characteristics in Pequi from the chapada do Araripe, Ceara, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 32, 114-125

DICHTER, M. A. Innovative clinical trial designs for future antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 48 Suppl. 1, p. 26-30, 2007. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2007.00996.x

DUNKIC, V.; BEZIC. N.; VUKO, E. Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. **Natural product communications**. 2011 Sep;6(9):1385-8. PubMed PMID: 21941920.

ENGEL, J. JR.; PEDLEY, T. A. Introduction: What is Epilepsy. In: Engel, J.; Pedley, T. A.; Aicardi, J.; Dichter, M. A.; Moshé, S. L. (Eds). **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**, 2nd Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 01-07, 2008.

FERREIRA, I. de L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por epilepsia no Brasil, 1980-2003. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 1, p. 89-94, 2009.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil: espécies do cerrado**. São Paulo: EDUSP, 1969. p. 72-73.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, E. A. T. Propriedades físico-químicas e composição dos ácidos graxos da fração lipídica da polpa e amêndoa do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm). **Revista de Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v. 20, n.1/2, p. 135-139 Jun./dez. 1989.

FISCHER, R. S.; BOAS, W. V. E. DE; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. JR. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, 46:470-472.2005

FISHER, R. S. Animal Model of Epilepsies. **Brain Research Review**. v. 14, p. 245-78, 1989.

FISHER, R. S. Animal Model of Epilepsies. *Brain Research Review*. v.14, seizures models of mice and rats. **Epilepsia**, v. 46, n. 6, p. 811-818, 2005

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, H.; ELGER, E. C.; ENGEL, J. JR; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; HESDORFFER, D. C.; MIKE, G.; LEE, B. I.; MATHERN, W. G.; MATHERN, W. G.; MOSH, S. L.; PERUCCA, E.; CHEFFER, I. E. S; TORBJØRN, T.; WATANABE, M.; WIEBE; S. A practical clinical definition of epilepsy **Epilepsia**, 55(4):475–482, 2014 doi: 10.1111/epi.12550

FISHER, R. S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, 2005; 46: 470-472.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V.; FLORENTINO, I. F; LINO, R.;C.; FAJEMIROYE, J. O.; CHAIBUB, B. A.; DE PAULA, J. R.; DE LIMA, T. C.; COSTA, E. A. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol.Psychiatry** 2012 38, 276-284.

GASTAUT, H. Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. **Epilepsia**, 1969;10:Suppl:14-21

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**105,9099-9104. 2008b.

GERTSCH, J. Anti-inflammatory cannabinoids in diet: towards a better understanding of CB(2) receptor action. **Commun. Integrative. Biology**. 1:26-28; 2008.9.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G., BARTOLINI, A., 2001. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Farmaco**, 56,387-389.2001.

GOMES M. M. Frequência populacional de epilepsia. **Revista Brasileira de Neurologia**. 1997;33(1):3-7.

GOMES, M. M. Crises epilépticas em pacientes de um hospital universitário: participação etiológica das doenças cerebrovasculares [tese]. Rio de Janeiro (RJ): **Faculdade de Medicina da Universidade Gama Filho**, 1994.

GOMES, M. M. História da Epilepsia: Um Ponto de Vista Epistêmico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, 12. ed., v. 3, p. 161-167, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-26492006000500009>

GOMES, M. M. Marcos históricos da neurologia. Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997). Aspectos históricos da epilepsia. **Revista Brasileira de Neurologia**. 1996;32(5):169-76.

GONÇALVES, C. U. Os Piquizeiros da Chapada do Araripe. **Revista de Geografia**. Recife: UFPE – DCG/NAPA, v. 25, n. 1, jan/abr. 2008

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro : McGraw-Hill, c 2003 10. ed.

GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações Gerais. In: **Epilepsia**. 3. ed. São Paulo. Lemos Editorial, p. 1-10, 2000.

GUERREIRO, C. A. M. História do Surgimento e Desenvolvimento das Fármacos Antiepilépticas. **Journal of Epilepsy Clin Neurophysiol** 2006; 12(1 suppl. 1):18-21.

GILLIAM, F. Optimizing Health Outcomes. In: **Active Epilepsy Neurology**, 58 (Suppl 5):S9-S20, 2002.

GALLUCCI, J. N.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à Epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, 32. ed., v. 3, p. 170-182, 2005.

HAJSZAN, T.; MACLUSKY, N. J. Neurologic links between epilepsy and depression in women is hippocampal neuroplasticity the key/**Neurology**. 2006; 66:S13-S22.

HAUSER, W. A.; KURLAND, L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota 1935 through 1967. **Epilepsia** 1975;16:1-66.

ILAE. International League Against epilepsy. www.ilae.org
<http://community.ilae.org/home/>

JI, H-F, LI, X-J, ZHANG, H-Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia/**EMBO Reports**. 2009;10(3):194-200. doi:10.1038/embor.2009.12.

JOHNSTON, G. A. GABA(A) receptor channel pharmacology. **Current Pharmaceutical Desing** 2005; 11: 1867-1885

KANNER, A. M.; BALABANOV, A. Depression and epilepsy. How closely related are they **Neurology**. 2002; 58:S27-S39.

KATSUYAMA, S.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KOMATSU, T.; NAGAOKA, K. NAKAMURA, H.; BAGETTA, G.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain**, 2013;17: 664-75.

KRISHNAMOORTHY, E. S.; TRIMBLE, M. R., BLUMER, D. The classification of neuropsychiatric disorders in epilepsy: a proposal by the ILAE commission on psychobiology of epilepsy. **Epilepsy Behavior**, 2007; 10:349-53

LABAT, R. Traité akkadien de diagnostics et pronostics médicaux. Paris/ Leiden: **Académie Internationale d'Histoire des Sciences/Brill**; 1951. p. 80-81,

LAI, CH-WAN, LAI, Y-H. History of Epilepsy in Chinese Traditional Medicine. **Epilepsia**, 1991; 32: 299-302

LASON, W.; DUDRA-JASTRZEBSKA, M.; REJDAK, K, et al. Basic mechanism of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamics interactions: an update. **Pharmacology Reports**. 2011; 63 :271-292. [PubMed]

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating Effect of Beta- Caryophyllene on Anticancer Activity of Alpha-Humulene, Isocaryophyllene and Paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n.. 12, 2007, p. 1643-1647. doi:10.1211/jpp.59.12.0005.

LEE, S. K. Old versus New: Why do we need new antiepileptic durg? **Journal of Epilepsy Research**. ISSN2233-6267

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T.; LIU, F.; ZHUANG, K.; LUO, K.; YANG, L. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical Ressearch**. 2015;40: 118-23.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, p. 359-68, 2011.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. **Epilepsia**. 2011 Apr;52(4):657-78.

LÖSCHERM, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, 2000 50:105-123.

LÖSCHER, W.; HÖNACK, D. Responses to NMDA receptor antagonists altered by epileptogenesis. **Trends Pharmacol Sci**, 1991 12:52.

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

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res**, 1988 2:145-181.

LUKOMSKAYA, N. Y.; LAVRENT'EVA, V. V.; STARSHINOVA, L. A; ZABKHO, E. P; GORBUNOVA, L. V.; TIKHONOVA, T. B.; GMIRO, V. E.; MAGAZANIK, L. G. Effects of inotropic glutamate receptors channel blockers on the development of pentylenetetrazol kindling in mice. **Neuroscience & Behavioral Physiology**, 37:75-81. 2007.

MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. **Epilepsy & Behavior**, v. 17, p. 103-108, 2010.

MARCHETTI, R. L.; MARQUES, A. F. H, Kurcgant D, Azevedo Júnior D, Marie SKN, Arruda PCV. Clinical aspects of epileptic psychosis in Brazil. **Epilepsy & Behavior** 4 2003; 133-141.

MARCHETTI, R. L. et al. Transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista. Psiquiátrica. Clínica.**, v. 32, n. 3, p. 170-182, 2005.

MARCHETTI, R. L.; NETO, GALLUCCI, J. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à Epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, 32. ed., v. 3, p. 170-182, 2005.

MARCHETTI, R. L.; CASTRO, A. P. W. de; KURCGANT, D.; CREMONESE, E.; NETO, J. G. Transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista. Psiquiátrica. Clínica.**, v. 32, n. 3, p. 170-182, 2005.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. **Curr Neuropharmacol**, 2014;12: 527-50.

MASIA, S. L.; DEVINSKY, O. Epilepsy and behavior: A brief history. **Epilepsy Behavior**. 2000;1(1):27-36.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MEDEIROS, R.; FERNANDES, E. S.; PASSO, G. F., CUNHA, F. M. PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal Pharmacology**. 2007 Aug 27;569(3):228-36. Epub 2007 May 22.

MELLO, C. F., OLIVEIRA, M. S. Commentary on Kaushik et al.: Prostaglandin D2 is crucial for seizure suppression and postictal sleep. Novel evidence supporting a role for prostanoid receptors in seizure control. **Experimental Neurology**, 2014;257: 157-161.

MELO JÚNIOR, A. F. de; CARVALHO, D. de; PÓVOA, J. S. R. BEARZOTI, E. Estruturagenética de populações naturais de Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**. n. 66, p. 56-65, dês. 2004.

MARCHETTI, R. L.; NETO, GALLUCCI, J. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à Epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, 32. ed., v. 3, p. 170-182, 2005.

MICHIELIN, E. M.; SALVADOR, A. A., RIEHL, C. A.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F.; FERREIRA, S. R. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource. Technology**. v. 100, p. 6615-6623, 2009.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 956-963, 2008.

MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district Lithuania **Phytochemistry** 2001; 57:65-69.

MOLINA-JASSO, D.; ALVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. 2009;32: 520-522.

MOREIRA, S. R. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. **Mental**, v. 3, p. 107-122, 2004.

MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; RYVLIN, P.; TOMSON, T.; LANCET. Epilepsy: new advances. **The Lancet** 2015. Mar 7;385(9971):884-98. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60456-6. Epub 2014 Sep 24.

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista Brasileira Psiquiatria** . 2005; 27(4):323-8 *Neurology*. 2006; 66:S13-S22.

NEUWAN, J. D.; CRAGG, J. M.; SANDER, K. H. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. In: **Journal Natural**. 2003 62(7) pp 1022-1032.

NIEHAUS, J. L.; LIU, Y.; WALLIS, K. T.; EGERTOVA, M.; BHARTUR, S. G., MUKHOPADHYAY, S. et al., 2007. CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. **Molecular. Pharmacology**. 72 (6), 1557-1566.

OLIVEIRA, I. G.; CARTAXO, S. L.; SILVA, M. A. P. Plantas medicinais utilizadas na farmacopéia popular em Crato, Juazeiro e barbalha(Ceará, Brasil). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.1, 2007.

OLIVEIRA, C. M. C de ;AZOUBEL, S. de A. S.; Bastos,B. Manifestações Psiquiátricas da Epilepsia Psychiatric Manifestations of Epilepsy. **Neurobiologia**, 72 jan./mar., 2009.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; MAIA, A. H. N.; ALVES, R. E.; XAVIER, D. S.; MATOS, M. S. Caracterização física de frutos do Pequi nativos da chapada do Araripe-CE. **Revista Brasileira. Fruticultura**. v. 3, n. 4, 2009.

OLIVEIRA, M. E. B; GUERRA, N. B.; BARROS, L. M.; ALVES, R. E. Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 32p. (Documentos, n.113).

OLIVEIRA, M. E.; GUERRA, N. B.; MAIA, A. de H. N; ALVES, R. E.; MATOS, N. M. dos S.; SAMPAIO, F. G. M.; LOPES, M. M. T. Características químicas e físico-químicas de Pequís da Chapada do Araripe, Ceará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, (online), 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452010005000030&script=sci_arttext>. Acesso em: 02 Abril, 2010.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE.2011. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acessado em: maio de 2012.

OPDYKE, D. L. Monographs on fragrance raw materials. **Food Cosmet Toxicol**. 1973;11: 1011-1081.

ORAV, A.; STULOVA, I.; KAILAS, T.; MÜÜRISSEP, P. M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. **Journal Agricultural and food chemistry Food Chem**, 2006. 52:2582–2586.

PAULA JÚNIOR, W. Atividades biológicas in vitro de extratos hidroetanólicos de folhas e do mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense* **Cambess**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PARADISO, S.; HERMANN, B. P.; BLUMER, D.; DAVIES, K.; ROBINSON, R. G. Impact of depressed mood on neuropsychological status in temporal lobe epilepsy. **Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2001;70:180-185

PERUCCA, E.; MEADOR, K. J. Adverse effects of antiepileptic drugs. **Acta Neurologica Scandinavica Supplementum**. 2005;181: 30-35.

PINTO, C. A; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, U. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 2002 Mar-Abr; 25(1 supl.):45-61

- PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Caryocaraceae. **Rodriguésia**, v. 57, n. 2, p. 155-157, 2006.
- PIOMELLI, D.; BELTRAMO, M.; GLASNAPP, S.; LIN, S. Y.; GOUTOPOULOS, A.; XIE, X.Q. et al., 1999. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 (10), 5802_5807.
- PITKÄNEN, A. et al. Models of Seizure and Epilepsy. USA: **Elsevier**, 2006.
- QUIRINO, G. S. et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**. v. 2, p. 179-183, 2009.
- RANG H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 56, 2007.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 2001; 39: 603-61
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As matas de galeria no contexto do bioma Cerrado. In: _____. RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Eds.). Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2001. 899p.
- ROGAWSKI, M. A.; REDDY, D. S. Neurosteroids: Neurosteroids: endogenous modulators of seizure susceptibility. In: RHO, J. M.; SANKAR, R.; CAVAZOS, J. (Ed.) **Epilepsy: Scientific Foundations of Clinical Practice**. New York: Marcel Dekker; In: New York: Marcel.
- SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**. 2003;16 (2):165-70.
- SANDER, J. W. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. **Epilepsy**. 1993. Nov-Dec;34(6):1007–1016.
- SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Pequi (Caryocar brasiliense Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, 64. 2004.
- SARAIVA, R. A.; et al. Ação antiedematogênica do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. In: IV **Reunião Regional da FeSBE**, Goiânia, Goiás, Brasil, 2009.
- SCHMIDT, D.; SILLANPAA, M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. **Curret Opinion in Neurology**. 2012;25:159–163.
- SCOTT, R. A.; LHATOO, S. D.; SANDER, J. W. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? **Bull World Health Organ**. 2001; 79(4):344-51.

SECHI, G.; ROSATI, G.; DEIANA, G. A.; PETRUZZI, V.; DERIU, F.; CORREDDU, P.; RIU, P. L. D. CO-variation of free amino acids in brain interstitial fluid during pentylentetrazole-induced convulsive status epilepticus. **Brain Research**, v. 764, p. 230-36, 1997

SEIXAS, H. C, do R. Os crimes dos epiléticos. Porto: UP, 1922. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina do Porto, **Universidade do Porto**, 1922.

SILVA, A. V.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. Multiciência: **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, 2004.

SILVA, M. A. P.; MEDEIROS FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v. 37, n. 3, p. 320-325, 2006.

SINGH, G.; PRABHAKAR. S. The effects of antimicrobial and antiepileptic treatment on the outcome of epilepsy associated with central nervous system (CNS) infections. **Epilepsy**. 2008.49 S6:42-46.

SWINKELS, W. A. M.; KUYK, J.; VAN DYCK, R.; SPINHOVEN, P. H. Psychiatric comorbidity in epilepsy. **Epilepsy Behavior**. 2005; 7:37-50.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A. T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. **Food Chem Toxicol**. 2006; 44:538-545.

THURMAN, D. J.; BEGHI, E. et al. "Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy." **Epilepsy**. (52 Suppl) 2011; 7: 2-26.

TURSKI, W. A. et al. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res**, v. 434, n. 3, p. 281-305, 1987

VALE, F. M. **Ética e o erro mitigado pelo método científico**: Considerações sobre a investigação em Farmacologia. Mestrado de Bioética. Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa. 2008

VELISEK, L.; KUBOVA, H.; POHL, M.; STANKOVA, L.; MARES, P. E.; SCHICKEROVA, R. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn Schmiedebergs* **Archive of Pharmacology**, v. 346, p. 588-591, 1992.

VERA, R. et al, Caracterização física e química de frutos do Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 2, p. 93-99, jun. 2007.

VICELMO, A. Crato lidera na safra do Pequi. Diário do Nordeste. Caderno Regional. Diário do Nordeste. **Diário do Nordeste On-line**. Disponível em diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=494574. Matéria em 11.12.2007. Acesso em 13 de maio de 2014.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado. Uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no cerrado. In: **INTERNATIONAL SAVANA SIMPOSIUM**, Brasília, 1998. p. 169-171.

WHO, 2012, Fact sheet N°999 October 2012 . Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentr/factsheets/fs199/en/>. Acessado em: 19 mai. 2014.

www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/2110-Apa-da-chapada-do-araripe.html.

YACUBIAN, E. Epilepsia da antiguidade ao segundo milênio: saindo das sombras. São Paulo: **Lemos Editorial**; 2000.

ZHENG; X.; SUN, T.; WANG, X. Activation of type 2 cannabinoid receptors (CB2R) promotes fatty acid oxidation through the SIRT1/PGC-1 α pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. journal: 2013 Volume 436, Issue 3, Pages 377–381.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação do potencial anticonvulsivante do *Caryocar coriaceum* Wittm".

Número do Parecer: 049/2013

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve ser enviado à CEUA o relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 24/10/2013.

Santa Maria, 12 de novembro de 2013.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação do potencial anticonvulsivante do Beta-cariofileno."

Número do Parecer: 016/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 11/06/2014

Santa Maria, 11 de junho de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM