



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Hugo Fernandes Oliveira Pires

**O monoterpeno hidroxicitronelal como potencial agente antiepiléptico e
neuroprotetor: um estudo *in silico* e *in vivo***

João Pessoa – PB

2025

Hugo Fernandes Oliveira Pires

O monoterpeno hidroxicitronelal como potencial agente antiepiléptico e neuroprotetor: um estudo *in silico* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori.

João Pessoa – PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P667m Pires, Hugo Fernandes Oliveira.

O monoterpeno hidroxicitronelal como potencial agente antiepiléptico e neuroprotetor : um estudo in sílico e in vivo / Hugo Fernandes Oliveira Pires. - João Pessoa, 2025.
103 f. : il.

Orientação: Mirian Graciela da Silva Stiebbe
Salvadori.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Citronelal. 3. Epilepsia - Convulsão. 4. Monoterpeno hidroxicitronelal. I. Salvadori, Mirian Graciela da Silva Stiebbe. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

Hugo Fernandes Oliveira Pires

O monoterpeno hidroxicitronelal como potencial agente antiepiléptico e neuroprotetor: um estudo *in silico* e *in vivo*

Aprovado em: 26 de junho de 2025.

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 MIRIAN GRACIELA DA SILVA STIEBBE SALVADOR
Data: 20/07/2025 22:39:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori (Orientadora)

PPgPNSB/UFPB

Documento assinado digitalmente
 RICARDO DIAS DE CASTRO
Data: 22/07/2025 13:14:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Supervisor/Presidente)

PPgPNSB/UFPB

Documento assinado digitalmente
 GICIANE CARVALHO VIEIRA
Data: 19/07/2025 21:31:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira (Avaliador Externo)

PPgNeC/UFPB

Documento assinado digitalmente
 MARGARETH DE FATIMA FORMIGA MELO DINIZ
Data: 21/07/2025 17:17:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Avaliador Interno)

PPgPNSB/UFPB

João Pessoa – PB

2025

*“Aquele que tem um porquê para viver,
pode suportar quase qualquer como.”*

*- Friedrich Nietzsche
(1844-1900)*

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **minha família**, a minha base, por sempre me apoiar, incentivar e ser meu porto seguro nos momentos difíceis,

À **Beatriz Doyle**, minha companheira de vida, por permanecer ao meu lado durante todos esses anos, sempre me dando todo o suporte e incentivo necessário para continuar. Por todo amor e carinho e por me ajudar a vencer as batalhas diárias e lutar comigo para juntos alcançarmos os nossos sonhos. Muito obrigado!

Aos meus pais, **José Pires e Ruzilania Fernandes**, por todo amor, carinho e dedicação. Por terem abdicado de muito para que eu recebesse uma educação de qualidade. Por acreditarem nos meus sonhos e investirem neles diariamente, deixando o sertão da Paraíba e voltando à João Pessoa para me ajudar durante toda a minha formação. Muito obrigado!

À minha irmã, **Hyanka Fernandes**, que sempre me apoia. Você vai chegar muito longe!

Aos meus amigos **Arthur Lins e Roberta Pimenta**, por sempre se fazerem presentes nas nossas vidas e por serem tão solícitos. Pela parceria nos experimentos, na pesquisa e na vida. Muito obrigado!

Aos meus amigos **Anne Caroline e Cleyton Gomes**, pela parceria dentro e fora do campus da UFPB. Obrigado!

À equipe maravilhosa que me auxilia em todos os experimentos, **Arthur, Maria Clara, Roberta e Luíza** que, faça chuva ou faça sol e não importando o dia da semana, sempre se dispõem a me ajudar. Sem vocês, eu não teria conseguido!

Ao meu amigo **Pablo Rayff**, pela parceria que pretendo levar para o resto da vida, no âmbito pessoal, profissional e científico. Muito obrigado!

Ao **Laboratório de Psicofarmacologia** e a todos os demais amigos que a rotina de laboratório me deu ao longo desses anos, por todas as experiências e conhecimentos passados e por toda a ajuda nos experimentos: **Álefe Monteiro, Aline Matilde, Mayara Oliveira, Humberto Hugo, Renaly Ivyna e Maria Caroline**.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Mirian Salvadori**, referência na área de Psicofarmacologia, por toda a paciência e dedicação ao meu trabalho e por todos os ensinamentos passados. Foram fundamentais para que eu pudesse construir este trabalho. Muito obrigado!

Aos membros da banca avaliadora, **Profa. Dra. Giciane Vieira e Dra. Profa. Margareth Diniz**, referências na área da Farmácia, por todas as contribuições para a versão final deste trabalho. Aos professores **Dr. Diogo Fonsêca, Dr. Sócrates Golzio e Dr. Ricardo Castro**, pela disponibilidade e colaboração. Muito obrigado!

Aos colaboradores, **Profa. Dra. Adriana Golzio, Prof. Dr. Adriano Alves e Alan Ferreira**, pela amizade, apoio e pelas valiosas contribuições através de análises que agregaram muito valor a esta pesquisa. Obrigado!

À **coordenação** e à **secretaria** do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por todo o suporte administrativo.

À **Fundação Paraibana de Apoio à Pesquisa (FAPESQ)**, por todo o suporte financeiro durante a vigência do mestrado.

À **Universidade Federal da Paraíba (UFPB)**, por toda a infraestrutura e apoio administrativo.

PIRES, H. F. O. **O monoterpeno hidroxicitronelal como potencial agente antiepiléptico e neuroprotetor: um estudo *in silico* e *in vivo***. Dissertação – PPgPNSB/CCS/UFPB, 2025.

RESUMO

A epilepsia é uma doença cerebral crônica que afeta cerca de 70 milhões de pessoas globalmente, sendo caracterizada por crises epiléticas recorrentes e espontâneas. O tratamento atual foca na redução da frequência e da intensidade das crises, mas não promove a cura. Ademais, devido à toxicidade e à alta taxa de refratariedade aos medicamentos disponíveis, há uma necessidade urgente de novas drogas eficazes e com melhores perfis de segurança. Na literatura, os monoterpenos já possuem evidências preliminares de ação antiepiléptica. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxicitronelal por meio de metodologias *in silico* e *in vivo*. Para isso, foram realizados estudos de *docking* molecular a fim de se verificar a sua possível interação química com importantes alvos envolvidos com a epilepsia. Além disso, a toxicidade oral aguda do composto e a sua DL₅₀ foram avaliadas por meio do protocolo n.º 423 da OECD com camundongos *Swiss* albinos machos (25-30 g). Na sequência, para avaliarmos os possíveis efeitos antiepiléptico e neuroprotetor do composto, os roedores foram submetidos ao modelo agudo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol e ao modelo de abrasamento químico (*kindling*). Como resultados, o estudo *in silico* mostrou que o hidroxicitronelal pode interagir com importantes alvos farmacológicos da epilepsia, como o receptor GABAA, os canais NMDA, Nav 1.6, Cav 1,2 e a proteína SV2A. Com o estudo *in vivo*, foi possível observar que o composto possui baixa toxicidade quando administrado de forma aguda e por via oral e que possui efeito antiepiléptico e neuroprotetor nas doses de 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg/kg, tendo sido a dose de 100 mg/kg escolhida como a melhor dose dentro das condições experimentais avaliadas e a dose de 6,25 mg/kg como o ponto de perda do efeito antiepiléptico. Além disso, foi capaz de aumentar os níveis de glutatona reduzida nos hipocampus dos animais. No *kindling*, o composto foi capaz de retardar a epileptogênese, aumentando as latências para a primeira crise e para a morte. No exame histológico, foi possível verificar a proteção dos neurônios e a redução de nódulos gliais, em relação ao controle. Portanto, com base neste trabalho, o hidroxicitronelal surge como um importante candidato a fármaco antiepiléptico, porém, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar o seu possível mecanismo de ação farmacológico.

Palavras-chave: Citronelal. Convulsão. Epilepsia. Hidroxicitronelal. Monoterpeno. Neuroprotetor.

PIRES, H. F. O. **Monoterpene Hydroxycitronellal as a Potential Antiepileptic and Neuroprotective Agent: An In Silico and In Vivo Study.** Dissertação – PPgPNSB/CCS/UFPB, 2025.

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic brain disorder that affects approximately 70 million people worldwide and is characterized by recurrent and spontaneous epileptic seizures. Current treatment focuses on reducing the frequency and intensity of seizures but does not provide a cure. Furthermore, due to the toxicity and high rate of refractoriness to the available medications, there is an urgent need for new drugs that are both effective and possess better safety profiles. In the literature, monoterpenes already show preliminary evidence of antiepileptic activity. Thus, the aim of this work is to evaluate the antiepileptic and neuroprotective effects of hydroxycitronellal through in silico and in vivo methodologies. To this end, molecular docking studies were conducted to assess its potential chemical interaction with key targets involved in epilepsy. Additionally, the compound's acute oral toxicity and its LD50 were evaluated using OECD protocol no. 423 in male Swiss albino mice (25–30 g). Subsequently, to assess the possible antiepileptic and neuroprotective effects of the compound, the rodents were subjected to an acute seizure model induced by pentylenetetrazole and to the chemical kindling model. As for the results, the in silico study showed that hydroxycitronellal may interact with important pharmacological targets related to epilepsy, such as the GABAA receptor, the channels NMDA, Nav 1.6 and Cav 1.2, and the SV2A protein. The in vivo study demonstrated that the compound is not toxic when administered acutely and orally and that it exhibits antiepileptic and neuroprotective effects at doses of 200, 100, 50, 25, and 12.5 mg.kg⁻¹. Among these, the 100 mg.kg⁻¹ dose was identified as the most effective under the experimental conditions evaluated, while the 6.25 mg.kg⁻¹ dose was determined as the threshold for loss of antiepileptic effect. Furthermore, the compound was able to increase the levels of reduced glutathione in the hippocampus of the animals. In the kindling model, the compound delayed epileptogenesis, increasing the latency to the first seizure and to death. Histological analysis revealed neuronal protection and a reduction in glial nodules compared to the control group. Therefore, based on this study, hydroxycitronellal emerges as a promising antiepileptic drug candidate; however, further studies are necessary to elucidate its potential pharmacological mechanism of action.

Keywords: Citronellal. Seizure. Epilepsy. Hydroxycitronellal. Monoterpene. Neuroprotective.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos fisiopatológicos relevantes na epileptogênese.....	21
Figura 2. Representação da correlação entre os fenômenos de excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e neuroinflamação na epilepsia.....	26
Figura 3. Síntese do Hidroxicitronelal (HC) a partir do Citronelal.....	40
Figura 4. Design experimental para as metodologias <i>in silico</i> e <i>in vivo</i>	43
Figura 5. Modelo agudo de Crises Epilépticas induzidas por PTZ.....	48
Figura 6. Design experimental do modelo subcrônico de abrasamento químico (<i>kindling</i>).....	50
Figura 7. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o receptor GABA _A em diferentes posições em comparação com os padrões positivos.....	54
Figura 8. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o Canal de Potássio (KCNQ2) em comparação com a retigabina.....	57
Figura 9. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o Canal de Cálcio (Cav 1.2) em comparação com a Gabapentina.....	58
Figura 10. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o Canal de Sódio (Nav 1.6) em comparação com a Fenitoína.....	60
Figura 11. Interações moleculares 2D e 3D do HC com os receptores AMPA e NMDA em comparação com o Perampamel e o Felbamato, respectivamente.....	62
Figura 12. Interações moleculares 2D e 3D do HC com a SV2A em comparação com o Levetiracetam.....	64
Figura 13. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o receptor GAT-1 em comparação com a Tiagabina.....	65
Figura 14. Cortes histológicos do parênquima e do estroma do córtex cerebral dos camundongos submetidos ao modelo de abrasamento químico.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolução ponderal dos grupos durante o protocolo da OECD.....	67
Gráfico 2. Efeito do HC sobre a Latência para o Primeiro Espasmo Mioclônico.....	69
Gráfico 3. Efeito do HC sobre a Latência para a Primeira Crise Tônico-Clônica Generalizada (LCTCG).....	70
Gráfico 4. Efeito do HC sobre a Duração das Crises (DC).....	71
Gráfico 5. Efeito do HC sobre a Latência para Morte (LM).....	72
Gráfico 6. Concentração de nitrito ($\mu\text{g/g}$) nos hipocampos.....	73
Gráfico 7. Concentração de GSH ($\mu\text{g/g}$) nos hipocampos.....	73
Gráfico 8. Latência para a crise tônico-clônica generalizada no <i>kindling</i>	74
Gráfico 9. Estágio Médio de Convulsão Atingido no <i>Kindling</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Proteínas-alvo coletadas no <i>Protein Data Bank</i> (PDB).....	44
Tabela 2.	Valores de <i>score</i> e <i>consensus</i> para as simulações <i>in silico</i> de interação entre o HC e possíveis alvos.....	52
Tabela 3.	Pesos dos animais por dia de experimento no protocolo da OECD.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais classes de fármacos antiepilépticos disponíveis no mercado....	29
Quadro 2. Interações químicas com resíduos de aminoácido do receptor GABA _A	54
Quadro 3. Interações químicas com resíduos de aminoácido do canal KCNQ2.....	56
Quadro 4. Interações químicas com resíduos de aminoácido do canal Cav1.2.....	58
Quadro 5. Interações químicas com resíduos de aminoácido do canal Nav1.6.....	59
Quadro 6. Interações químicas com resíduos de aminoácido dos receptores AMPA e NMDA.....	61
Quadro 7. Interações químicas com resíduos de aminoácido da SV2A.	63
Quadro 8. Interações químicas com resíduos de aminoácido do GAT-1.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa: aminoácido

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

ADMET: Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

AMPA: Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BDZ: Benzodiazepínicos

CACNA1H: Gene do Canal de Cálcio Tipo T, Subunidade Alfa-1H

Cav 1.2: Canal de cálcio dependente de voltagem 1.2

DAE: Drogas antiepiléticas

DC: Duração das Crises

EAI: Epilepsia de Ausência na Infância

EAM: Eletrochoque Auricular Máximo

EEG: Eletroencefalograma

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

EMJ: Epilepsia Mioclônica Juvenil

ERN: Espécie Reativa de Nitrogênio

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GABAA: Receptor GABA tipo A

GAT1: Transportador de GABA Tipo 1

GLUT1: Transportador de Glicose Tipo 1

GSH: Glutathiona Reduzida

HC: Hidroxicitronelal

i.p.: Via intraperitoneal

ILAE: Liga Internacional Contra a Epilepsia

KCNQ2: Gene do canal de potássio dependente de voltagem Tipo Q2

Kv 2.7: Canal de potássio dependente de voltagem 2.7

LCTCG: Latência para a Primeira Crise Epilética Tônico-Clônica Generalizada

LM: Latência para Morte

LPE: Latência para o Primeiro Espasmo Mioclônico

NA: Neurônios alterados

Nav 1.6: Canal de sódio dependente de voltagem 1.6

NC: Não convulsionou

NDA: Novas drogas antiepiléticas

NG: Nódulos gliais

NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato

OE: Óleo essencial

OECD: Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico

PTZ: Pentilenotetrazol

SCN1A: Gene do Canal de Sódio Tipo 1A

SD: Síndrome de Dravet

SLG: Síndrome de Lennox-Gastaut

SNC: Sistema Nervoso Central

SV2A: Proteína Vesicular Sináptica tipo 2A

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

v.o.: Via oral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1.	Epilepsia e crises epiléticas	20
2.2.	Classificação da epilepsia	22
2.3.	Aspectos fisiopatológicos da epilepsia	24
2.4.	Farmacoterapia das epilepsias	28
2.4.1.	Epilepsias refratárias	31
2.5.	Pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antiepiléticas	31
2.5.1.	Métodos experimentais para avaliação de novas drogas antiepiléticas	32
2.5.1.1.	Predição in silico de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas	34
2.5.1.2.	Modelos in vivo	36
2.6.	Os monoterpenos e o potencial farmacológico do hidroxicitronelal	38
3.	OBJETIVO	42
3.1.	Objetivo geral	42
3.2.	Objetivos específicos	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1.	Estudo in silico	43
4.1.1.	<i>Docking</i> molecular	43
4.2.	Estudo in vivo	45
4.2.1.	Animais e aspectos éticos	45
4.2.2.	Drogas e tratamentos	46
4.2.3.	Investigação da toxicidade oral aguda e estimativa da DL ₅₀	46
4.2.4.	Modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol	47
4.2.4.1.	Determinação da curva dose-resposta no modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol	47
4.2.5.	Análises neuroquímicas: quantificação de componentes do sistema antioxidante	48
4.2.5.1.	Glutathione reduzida (GSH)	49
4.2.5.2.	Determinação de nitrito	49
4.2.6.	Modelo do abrasamento químico (<i>kindling</i> químico)	49
4.2.7.	Análise histológica dos encéfalos de animais submetidos ao <i>kindling</i>	51
4.2.8.	Tratamento estatístico dos dados	51
5.	RESULTADOS	52
5.1.	Estudo in silico	52
5.1.1.	<i>Docking</i> molecular	52

5.1.1.1.	Participação da via GABAérgica	53
5.1.1.2.	Participação do canal de potássio (Kv 2.7 – KCNQ2)	56
5.1.1.3.	Participação do canal de cálcio (Cav 1.2).....	57
5.1.1.4.	Participação do canal de sódio (Nav 1.6)	59
5.1.1.5.	Participação da via glutamatérgica.....	60
5.1.1.6.	Participação da Proteína Vesicular Sináptica 2A (SV2A).....	63
5.1.1.7.	Participação do Transportador de GABA do tipo 1 (GAT-1)	64
5.2.	Estudo <i>in vivo</i>	66
5.2.1.	Toxicidade oral aguda (OECD nº 423).....	66
5.2.2.	Efeitos antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxicitronelal no modelo agudo de crises epilépticas induzidas por pentilenotetrazol	68
5.2.2.1.	Efeito do HC sobre a Latência para o Primeiro Espasmo Mioclônico (LPE)	68
5.2.2.2.	Efeito do HC sobre a Latência para a Primeira Crise Tônico-Clônica Generalizada (LCTCG)	69
5.2.2.3.	Efeito do HC sobre a Duração das Crises (DC)	70
5.2.2.4.	Efeito do HC sobre a Latência para morte (LM)	71
5.2.3.	Análises neuroquímicas	72
5.2.4.	Modelo do abrasamento químico por PTZ (<i>kindling</i>)	74
5.2.4.1.	Análises histológicas do encéfalo dos animais submetidos ao kindling	75
6.	DISCUSSÃO	77
7.	CONCLUSÕES	86
8.	PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO I. Certificado de aprovação do projeto pela CEUA/UFPB	98
	ANEXO II. Parâmetros comportamentais, autonômicos e tóxicos avaliados ..	99
	ANEXO III. Fluxograma do Protocolo n.º 423 da OECD para Toxicidade Oral Aguda em camundongos	100
	ANEXO IV. Tabela de observação com Escala de Racine Modificada para os experimentos	101
	ANEXO V: Contribuições científicas durante o mestrado (2023-2025)	102

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença crônica que afeta uma parcela de aproximadamente 70 milhões de pessoas mundialmente, diminuindo drasticamente a qualidade de vida dos indivíduos. Esta doença pode ser ocasionada por um conjunto de fatores que culminam em uma hiperexcitabilidade neuronal e caracterizada, primariamente, por uma predisposição para gerar crises epiléticas recorrentes e espontâneas (Milligan, 2021; Belete *et al.*, 2023; Pong *et al.*, 2023).

As crises epiléticas são eventos transitórios de atividade neuronal desordenada e exacerbada, podendo ser classificadas em focais, generalizadas ou não determinadas/classificadas de acordo com a sua origem no cérebro. Estas crises podem ser provenientes de diversos fatores que vão desde infecções a nível de Sistema Nervoso Central (SNC) e febre intensa até predisposições genéticas e condições idiopáticas e variam em termos de intensidade e agravamento de outras condições preexistentes (Yuskaitis *et al.*, 2021; Pong *et al.*, 2023).

Existem diversos fármacos disponíveis no mercado para a terapia antiepilética, incluindo diferentes classes farmacológicas divididas em quatro gerações que variam em relação à aplicação e ao perfil de segurança. Grande parte das drogas antiepiléticas (DAE) são muito tóxicas e apresentam uma quantidade significativa de efeitos colaterais e danos que dificultam a terapia e a adesão terapêutica dos pacientes (Falco-Walter, 2020; Belete *et al.*, 2023).

Ademais, uma grande parcela de mais de 30% dos indivíduos acometidos com epilepsia é refratária aos medicamentos disponíveis, o que piora consideravelmente a qualidade de vida e o prognóstico da doença. Estes indivíduos passam a fazer uso de esquemas politerapêuticos a fim de minimizar a intensidade ou a frequência de aparecimento das crises epiléticas. A politerapia, por sua vez, nem sempre é capaz de resolver o problema das crises, mas promove um maior risco ao paciente e o maior aparecimento de efeitos colaterais graves (Gulcin, 2020; Fonseca *et al.*, 2024).

Neste contexto, a pesquisa por novas drogas antiepiléticas (NDA) é um esforço mundial, a fim de solucionar o problema do risco associado às terapias, bem como o problema da refratariedade que acomete grande parcela dos indivíduos que possuem epilepsia. Plantas medicinais possuem diversos compostos bioativos de

interesse para o estudo do potencial antiepiléptico. Diversos compostos já vêm apresentando potencial anticonvulsivante e neuroprotetor relevante, dentre os quais os monoterpenos se destacam, o que representa um importante passo na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas (Milligan, 2021; Yuskaitis *et al.*, 2021).

O monoterpeno hidroxicitronelal (HC), assim como o seu precursor, o citronelal que está presente na Citronela (*Cymbopogon winterianus*) e que é responsável pelo odor de limão acentuado, possui ação sobre o SNC (Stoeckelhuber *et al.*, 2017; Api *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2021) e vem sendo estudado quanto ao seu potencial psicofarmacológico. O HC promove efeito ansiolítico através da sua ação por via GABAérgica, como comprovado pelo estudo de Andrade *et al.* (2021). Na literatura, o citronelal, seu precursor, já apresenta efeito antiepiléptico *in vivo*, o que também parece ser modulado pelas vias GABAérgica e via dos canais de sódio dependentes de voltagem.

Dessa forma, tendo em vista a sua ação sobre o sistema nervoso central e o efeito observado no seu precursor químico, o HC é um importante candidato para investigações do seu potencial antiepiléptico e neuroprotetor. Assim como ocorre com outras classes de fármacos ansiolíticos que possuem efeito antiepiléptico, como os benzodiazepínicos e os barbitúricos – que agem por via GABAérgica, é possível que o HC também promova este efeito em camundongos submetidos à uma prévia administração oral. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito antiepiléptico e neuroprotetor do HC por meio da utilização de modelos animais de crises epilépticas e de ferramentas computacionais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epilepsia e crises epilépticas

A epilepsia é uma das doenças crônicas mais antigas conhecidas, com registros que datam de aproximadamente 400 a.C. Ao longo da história, as crises epilépticas foram frequentemente interpretadas como maldições divinas ou sinais de possessão, sendo associadas à magia e à bruxaria. Apesar dos avanços na compreensão médica, o estigma social ainda afeta muitos pacientes (Milligan, 2021). Atualmente, já se sabe que é uma condição crônica do sistema nervoso central, caracterizada pela predisposição ao desenvolvimento de crises epilépticas recorrentes e imprevisíveis, que são resultado de uma atividade neuronal anormal e excessiva (Tran *et al.*, 2020).

Clinicamente, essas crises epilépticas podem variar desde breves lapsos de atenção até convulsões severas com contrações musculares intensas. Elas são classificadas de acordo com seu início em: focais, generalizadas ou desconhecidas (Pong *et al.*, 2023). As crises focais ocorrem quando a atividade neuronal anormal se limita a uma região do cérebro, podendo preservar a consciência ou prejudicar, mas não a eliminam completamente (Fonseca *et al.*, 2024).

As crises generalizadas envolvem ativação simultânea de ambos os hemisférios cerebrais desde o início, geralmente levando à perda de consciência, sendo frequentemente chamada de “grande mal” (Tran *et al.*, 2020). As crises generalizadas são divididas em “motoras” ou “não motoras” (como nas crises de ausência) (Milligan, 2021). Além disso, existem crises de origem desconhecida, nas quais o início da atividade anormal não pode ser determinado (Fonseca *et al.*, 2024).

Os distúrbios epilépticos são entre as condições neurológicas crônicas mais comuns, afetando cerca de 1% da população mundial, o que equivale a mais de 70 milhões de pessoas (Thijs *et al.*, 2019; Gulci, 2020). Aproximadamente 80% desses indivíduos vivem em países de baixa e média renda, nos quais cerca de 140 a cada 100.000 pessoas são diagnosticadas anualmente com epilepsia. A taxa de mortalidade global anual é estimada entre 1 e 8 por 100.000 habitantes, com uma taxa de 1,1 na América Latina, que é superior à dos Estados Unidos e Canadá, onde essa taxa é de 0,4 (Gulci, 2020; Falco-Walter, 2020; Guedes *et al.*, 2022).

No Brasil, há poucos estudos sobre a prevalência da epilepsia, mas estimativas internacionais sugerem que cerca de mais de 2 milhões de brasileiros apresentam epilepsia. A maior prevalência em países de baixa e média renda pode ser atribuída a fatores como o risco elevado de infecções por doenças endêmicas (como malária e neurocisticercose), lesões cerebrais decorrentes de acidentes e partos complicados, além da limitada disponibilidade de programas de saúde preventiva (Guedes *et al.*, 2022; Fonseca *et al.*, 2024).

As principais etiologias da epilepsia são classificadas em seis categorias: (1) alterações estruturais devido a lesões cerebrais de causas pré-natais, perinatais ou acidentais; (2) fatores genéticos, como canalopatias ou anomalias congênitas; (3) infecções a nível de Sistema Nervoso Central (SNC), como meningite ou neurocisticercose; (4) distúrbios metabólicos, como a deficiência cerebral de ácido fólico; (5) doenças autoimunes; e (6) idiopáticas, cuja etiologia ainda não é clara (Tran *et al.*, 2020; Milligan, 2021). Dessa forma, alguns principais fatores que contribuem para a epileptogênese estão representados na figura 1.

Figura 1. Aspectos fisiopatológicos relevantes na epileptogênese.

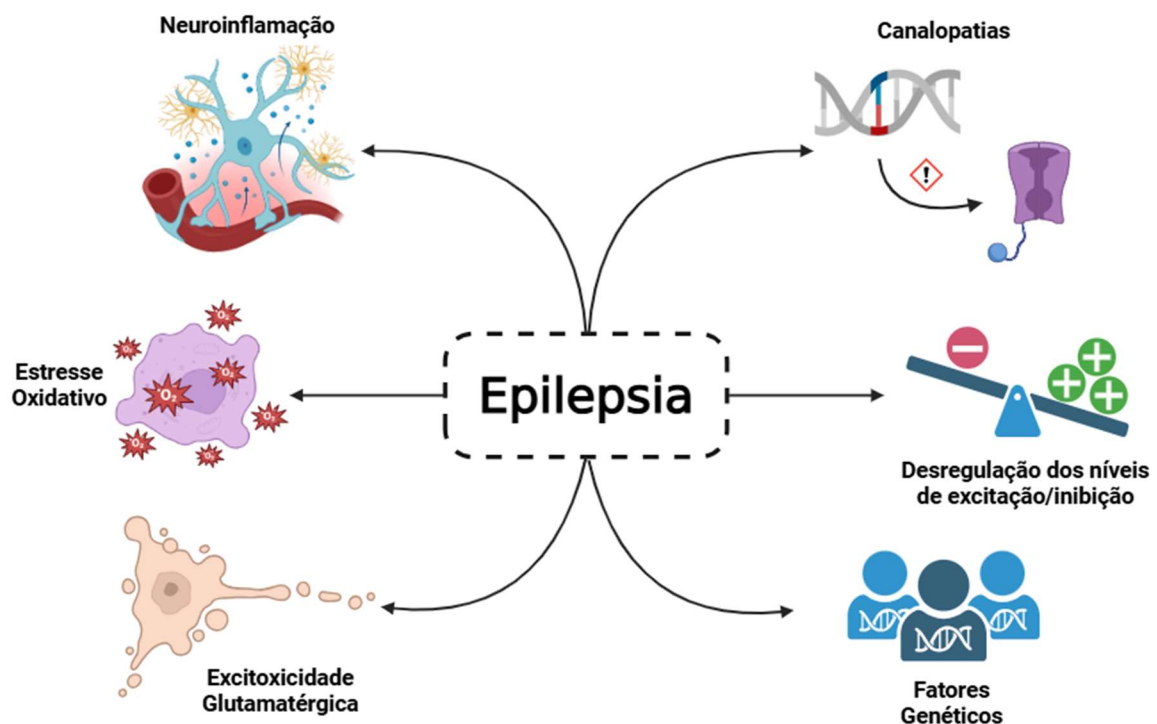


Imagem: feito com o Biorender.com.

Fonte: autor (2025).

2.2. Classificação da epilepsia

A epilepsia pode se apresentar de diferentes formas, variando em vários aspectos, como fisiopatologia, sintomatologia e farmacoterapia. Nesse sentido, a *International League Against Epilepsy* (ILAE) periodicamente publica atualizações a respeito da classificação e das subclassificações da epilepsia, bem como os avanços no conhecimento a respeito da fisiopatologia, do diagnóstico, do manejo clínico e do tratamento (Specchio *et al.*, 2022).

Primeiramente, a epilepsia do lobo temporal (ELT) surge como a forma mais comum de epilepsia focal em adultos jovens e frequentemente está associada à esclerose mesial temporal, caracterizando-se por perda neuronal seletiva, gliose e reorganização sináptica anormal (Binding *et al.*, 2022). É uma forma de epilepsia que envolve a geração de crises epiléticas a partir de estruturas do lobo temporal, especialmente as regiões mesiais, como o hipocampo, amígdala e giro para-hipocampal (Henning *et al.*, 2023).

As manifestações clínicas da ELT incluem auras psíquicas, alterações de consciência, automatismos motores (como mastigar ou esfregar as mãos) e frequentemente ocorre progressão para crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas. Os aspectos fisiopatológicos da ELT são bem similares às outras formas de apresentação da doença, envolvendo, principalmente, um desequilíbrio entre neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA), além de processos de excitotoxicidade, neuroinflamação e estresse oxidativo, que perpetuam a hiperexcitabilidade neuronal (Abarrategui *et al.*, 2021; Neumann; Britsch, 2024).

Outra forma de apresentação da epilepsia é a epilepsia de ausência na infância (EAI) que, por sua vez, envolve crises generalizadas não convulsivas, caracterizadas por breves períodos de perda de consciência, conhecidas como “crises de ausência” (geralmente de 5 a 20 segundos), com olhar fixo, cessação da atividade motora e possível piscar repetitivo (Specchio *et al.*, 2022). Normalmente, o indivíduo retoma a atividade imediatamente após a crise, sem confusão pós-ictal. Acomete principalmente crianças entre 4 e 10 anos e é considerada uma epilepsia generalizada idiopática, de provável origem genética, com bom prognóstico e resposta favorável a fármacos como etossuximida ou ácido valproico (Aud’hui *et al.*, 2021).

Ademais, existe a epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), a qual envolve crises mioclônicas, que consistem em abalos musculares súbitos, rápidos e bilaterais, geralmente nas mãos e nos braços, frequentemente ao acordar. Esses abalos podem ser acompanhados ou seguidos por crises tônico-clônicas generalizadas. Normalmente, a EMJ acomete adolescentes entre 12 e 18 anos e tem componente um importante genético. É uma epilepsia generalizada idiopática e tende a persistir ao longo da vida, mas que responde bem ao tratamento com valproato, lamotrigina ou levetiracetam. A privação de sono, estresse e consumo de álcool são gatilhos frequentes. A fisiopatologia envolve alterações nos canais iônicos e na inibição GABAérgica, além de disfunções na rede corticotalâmica (Liu; Tai; Wang, 2021; Pietrafusa *et al.*, 2021).

Outras duas formas graves de epilepsia são a Síndrome de West e a Síndrome de Lennox-Gastaut (SLG). A Síndrome de West tem início precoce (nos primeiros meses de vida, especialmente entre 3 e 7 meses) e é caracterizada por um padrão de EEG chamado hipsarritmia (atividade elétrica caótica e desorganizada) e pela regressão ou estagnação do desenvolvimento neuropsicomotor da criança. Os espasmos da síndrome consistem em contrações súbitas de flexão ou extensão do tronco e membros, ocorrendo em séries. As causas são variadas, podendo incluir malformações cerebrais, esclerose tuberosa, hipóxia neonatal, infecções congênitas e mutações genéticas. O tratamento da Síndrome de West pode envolver vigabatrina, corticosteroides ou Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) (Pavone *et al.*, 2020).

A síndrome de Lennox-Gastaut (SLG), por sua vez, envolve múltiplos tipos de crises epiléticas (tônicas, atônicas, ausências atípicas, entre outras), geralmente associadas a um atraso cognitivo e um EEG característico com atividade lenta (ponta-onda <2,5 Hz). É uma epilepsia generalizada de difícil controle, frequentemente refratária ao tratamento medicamentoso convencional que também se inicia na infância (entre 2 e 7 anos de idade) e que pode ter causas sintomáticas (malformações, lesões perinatais, infecções do SNC) ou ser criptogênica (Strzelczyk; Schubert-Bast, 2021).

A SLG representa uma das formas mais graves de epilepsia na infância, com impactos significativos no desenvolvimento motor e cognitivo do indivíduo. O tratamento envolve uma politerapia extensa (valproato, clobazam, lamotrigina,

rufinamida) e, em alguns casos, dieta cetogênica ou estimulação do nervo vago (Lattanzi *et al.*, 2021; Nelson; Knupp, 2023).

Além de todas essas formas mais comuns de epilepsia, existem algumas condições raras, como a epilepsia relacionada à mutação no gene SCN1A, a exemplo da síndrome de Dravet (SD). Essa síndrome é uma encefalopatia epiléptica de início precoce, que surge no primeiro ano de vida da criança, com crises febris prolongadas e que evolui para múltiplos tipos de crises, como mioclonias, crises tônico-clônicas e crises atônicas (Wirrell *et al.*, 2022).

A SD tem origem genética, com mutações no gene SCN1A, que codifica a subunidade alfa dos canais de Na_v1.1 neuronais, e é caracterizada por apresentar alta taxa de refratariedade ao tratamento antiepiléptico, um retardo no desenvolvimento e um maior risco de morte súbita. O tratamento é complexo e deve evitar fármacos que bloqueiem canais de sódio, utilizando alternativas como valproato, clobazam (He *et al.*, 2022). Recentemente, diversos estudos vêm sendo realizados com canabidiol (CBD) e apresentam resultados promissores (Lattanzi *et al.*, 2021; Wirrell *et al.*, 2022).

Por fim, outro exemplo de epilepsia rara é a epilepsia dependente de piridoxina, causada por uma anomalia metabólica que afeta o metabolismo da vitamina B6, a qual é essencial para a síntese de GABA. Essa forma de epilepsia se manifesta com crises neonatais que são refratárias a antiepiléticos convencionais, mas responsivas à administração de piridoxina (vitamina B6) (Coughlin *et al.*, 2020). Outras epilepsias metabólicas raras com menor incidência incluem aquelas associadas a anomalias mitocondriais, deficiência de GLUT1 (transportador de glicose) ou acidemias orgânicas (Coughlin *et al.*, 2020; Specchio *et al.*, 2022).

Fica evidente, portanto, que a detecção precoce da síndrome epiléptica específica é essencial, pois o atraso no tratamento adequado pode levar a sequelas neurológicas permanentes. Cada síndrome epiléptica apresenta fisiopatologia própria e a necessidade de uma abordagem terapêutica específica, muitas vezes que vão além dos anticonvulsivantes tradicionais e que apresentam alta taxa de refratariedade às terapias convencionais.

2.3. Aspectos fisiopatológicos da epilepsia

A fisiopatologia da epilepsia envolve uma complexa interação entre alterações anatômicas, moleculares e celulares, que culminam na geração e propagação de

crises epilépticas. O aspecto anatômico na epilepsia é bastante relevante. As principais alterações morfológicas estão localizadas em regiões como o hipocampo, os gânglios da base, o tálamo e o córtex cerebral (Fonsêca *et al.*, 2024; Devinsky *et al.*, 2024).

Entre essas alterações, destaca-se a esclerose mesial temporal, particularmente associada à Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), com a perda seletiva de neurônios piramidais nos subcampos CA1 e CA3 do hipocampo, além de gliose reativa, um processo de proliferação e hipertrofia dos astrócitos em resposta a dano neuronal. Essas perdas neuronais desequilibram os circuitos inibitórios e excitatórios da região, promovendo a reorganização sináptica e a hiperexcitabilidade (Abarrategui *et al.*, 2021; Vezzani *et al.*, 2022).

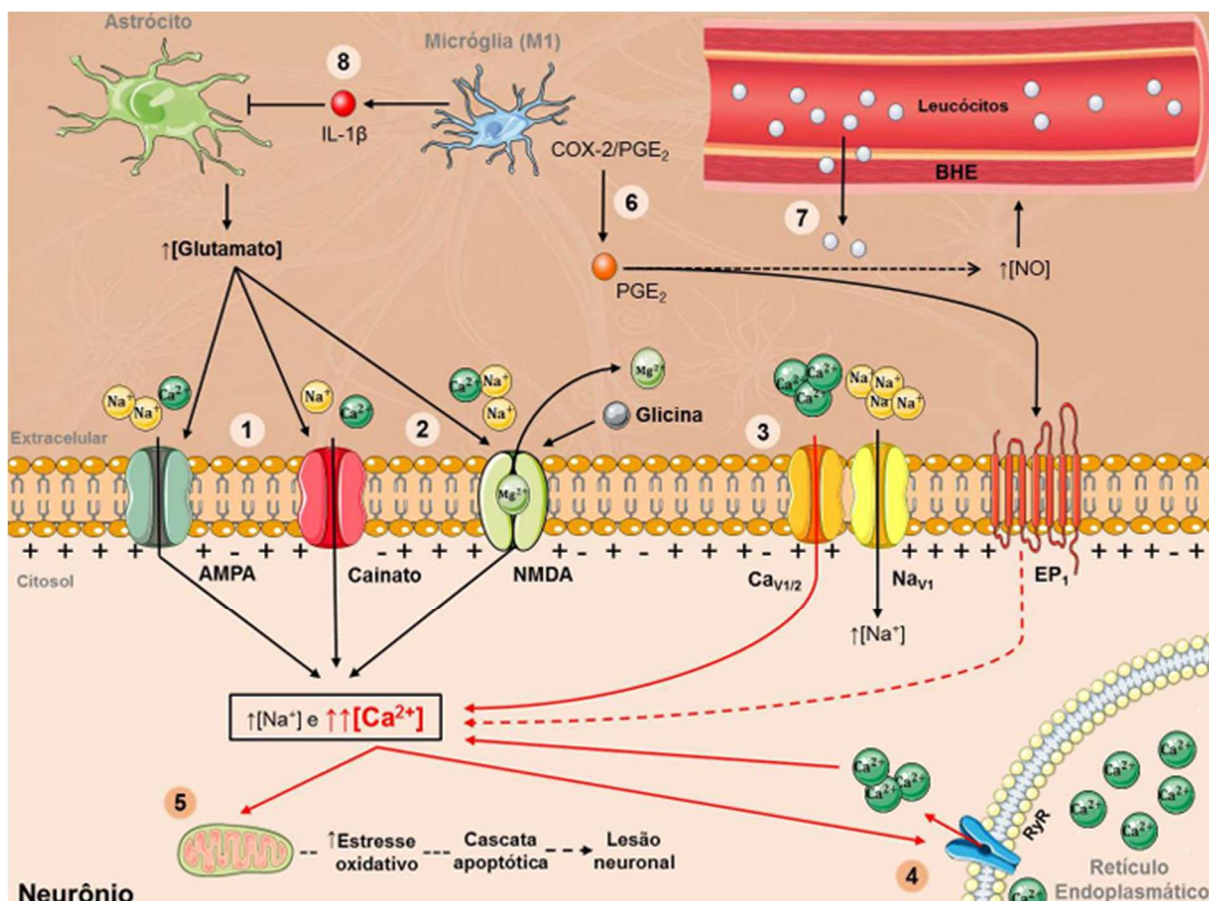
Outro aspecto anatômico relevante é a brotamento axonal das fibras musgosas, que são axônios dos neurônios granulares do giro denteado. Em condições patológicas, como em cérebros epilépticos, essas fibras passam a formar sinapses recíprocas com outros neurônios granulares, criando circuitos reverberantes que favorecem a propagação de atividade epiléptica. Além disso, alterações na neurogênese adulta, comuns em regiões como o giro denteado, podem gerar neurônios com conexões aberrantes ou disfuncionais, bem como malformações corticais do desenvolvimento, como heterotopias neuronais e displasias corticais, podem estar entre as causas anatômicas frequentes da epileptogênese, especialmente na infância (Falco-Walter, 2020; Adachi; Ito, 2022).

No âmbito molecular, de forma geral, há uma interação de processos que culminam em uma hiperexcitação neuronal desordenada. Dentre esses processos, destacam-se a excitotoxicidade glutamatérgica, o estresse oxidativo e a neuroinflamação, que formam uma tríade interconectada, contribuindo para a progressão e a manutenção da epilepsia (Tran *et al.*, 2020; Soltani Khaboushan; Yazdanpanah; Rezaei, 2022; Belete *et al.*, 2023).

O glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, desempenha um papel crucial nesse contexto. Em condições normais, sua liberação e recaptura são cuidadosamente reguladas, garantindo um equilíbrio entre excitabilidade e inibição neuronal. No entanto, na epilepsia, essa regulação se torna comprometida (Fonseca *et al.*, 2024). A superexposição dos neurônios ao glutamato resulta em excitotoxicidade, um fenômeno que se caracteriza pela ativação excessiva

de receptores glutamatérgicos, especialmente os receptores do tipo NMDA (figura 2) (Monteiro *et al.*, 2024).

Figura 2. Representação da correlação entre os fenômenos de excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e neuroinflamação na epilepsia.



Descrição da imagem: A pré-despolarização desencadeada pelo glutamato (1) irá contribuir para a ativação dos receptores NMDA (2), os quais promoverão o aumento do influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} e a despolarização das membranas neuronais, ativando os canais de Na_v1 e $\text{Ca}_v1/2$ (3) o que promoverá um influxo maior desses íons. A alta concentração de Ca^{2+} citosólico ativará os receptores de rianodina (RyR), presentes no retículo endoplasmático, e promoverá a liberação de mais Ca^{2+} (4), contribuindo para desencadear o aumento do estresse oxidativo e ativação da cascata apoptótica na mitocôndria, resultando em morte neuronal (5), promovendo o desenvolvimento de um processo neuroinflamatório pela ativação da micróglia M1. A M1 ativada irá promover o aumento na expressão e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como NO, via COX-2/PGE2 e IL-1 β . A ativação da via COX-2/PGE2 (6) irá facilitar as crises epilépticas, através da ativação dos receptores EP1 que irão promover indiretamente o aumento da concentração de Ca^{2+} , aumentando o estresse oxidativo e a hiperexcitabilidade através do aumento da exocitose de glutamato. A PGE2 também irá favorecer indiretamente a expressão de NO que mediará reações como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade da BHE, permitindo a migração de células inflamatórias periféricas para o parênquima cerebral (7). A alta expressão de IL-1 β pela M1 mediará diretamente a perda dos transportadores de glutamato (8) (descrição adaptada de Monteiro, 2021 e Monteiro *et al.*, 2024).

Fonte: Monteiro *et al.* (2024).

A ativação descontrolada desses receptores provoca um influxo maciço de íons cálcio no interior das células, o que ativa cascatas de sinalização que levam à morte celular e à neurodegeneração. Essa excitotoxicidade não apenas desencadeia a morte neuronal, mas também altera a estrutura e a função das redes neuronais, favorecendo o aparecimento de circuitos anômalos que perpetuam a hiperexcitabilidade (Tran *et al.*, 2020; Falco-Walter, 2020).

Esse aumento da excitabilidade neuronal está intimamente relacionado ao estresse oxidativo, um estado em que há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo. Na epilepsia, a excitotoxicidade glutamatérgica intensifica a produção de EROs, que são moléculas altamente reativas capazes de danificar lipídios, proteínas e DNA celular. O estresse oxidativo, portanto, não apenas compromete a integridade celular, mas também agrava a excitotoxicidade, uma vez que a lesão celular resultante pode aumentar a permeabilidade da membrana, facilitando a entrada adicional de íons e exacerbando a atividade excitatória (Milligan, 2021; Guo *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022; Soltani-Khaboushan; Yazdanpanah; Rezaei, 2022; Monteiro *et al.*, 2024).

Paralelamente, o aumento descontrolado do estresse oxidativo desencadeia processos inflamatórios no sistema nervoso central, resultando em neuroinflamação. Células gliais, como astrócitos e micróglia, são ativadas em resposta ao estresse e à morte neuronal. Essa ativação leva à liberação de mediadores inflamatórios, como interleucinas e fatores de necrose tumoral (TNF), que podem acentuar a excitabilidade neuronal (Vezzani *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2022).

A neuroinflamação, por sua vez, altera a expressão de canais iônicos e receptores nas membranas neuronais, modificando a dinâmica excitatória e inibitória e, assim, criando um ambiente propício à ocorrência de crises. Além disso, a inflamação crônica pode promover uma reestruturação sináptica que favorece a formação de redes neuronais anormais, estabelecendo um ciclo vicioso que perpetua a condição epiléptica (Tran *et al.*, 2020; Soltani-Khaboushan; Yazdanpanah; Rezaei, 2022; Vezzani *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022; Tewari *et al.*, 2023; Socala *et al.*, 2024).

Além disso, ocorre um desequilíbrio entre os sistemas de neurotransmissores excitatórios e inibitórios. O sistema glutamatérgico, mediado principalmente pelos receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, frequentemente encontra-se hiperativo na epilepsia, promovendo despolarizações prolongadas e influxo excessivo de cálcio, o

que contribui para a excitotoxicidade e morte neuronal citados anteriormente. Em contrapartida, o sistema GABAérgico, que atua como a principal via inibitória do SNC, pode estar com a sua atividade reduzida devido à perda de interneurônios GABAérgicos, à disfunção dos receptores GABA_A ou à modulação deficiente do transporte de íons necessários à sua ação inibitória (Chen *et al.*, 2022; Binder; Steinhäuser, 2021).

Outros mecanismos moleculares importantes incluem a plasticidade sináptica anormal, com aumento da formação de sinapses excitatórias e redução de sinapses inibitórias, alterações na expressão de moléculas de adesão sináptica e de fatores neurotróficos, como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), que pode exacerbar a excitabilidade neuronal e promover mudanças estruturais persistentes (Binder; Steinhäuser, 2021; Soltani Khaboushan; Yazdanpanah; Rezaei, 2022; Vezzani *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2022).

Além destes aspectos, há ainda alterações na expressão e função de canais iônicos - as canalopatias, essenciais para a geração e condução do potencial de ação. Os principais exemplos de disfunções em canais iônicos são: disfunções nos canais de sódio (por exemplo, SCN1A), potássio (como KCNQ2/3) e cálcio (como CACNA1H) podem resultar em despolarização prolongada e aumento da excitabilidade neuronal. Mutação em canais de cloro também compromete a ação inibitória do GABA, já que o efluxo de Cl⁻ é fundamental para a hiperpolarização pós-sináptica (Menezes *et al.*, 2020; Indelicato; Boesch, 2023; Gribkoff; Winquist, 2023; Ng *et al.*, 2024).

Essas alterações anatômicas e moleculares convergem para um estado de hiperexcitabilidade e hipersincronia neuronal, que sustenta a ocorrência das crises epiléticas e dificulta o retorno do tecido cerebral a um estado de equilíbrio funcional, o que contribui para o aumento da frequência e da gravidade das crises epiléticas (Socala *et al.*, 2024).

2.4. Farmacoterapia das epilepsias

As drogas antiepiléticas (DAE) são medicamentos projetados para prevenir e amenizar a gravidade das crises epiléticas, sendo amplamente utilizadas no manejo das epilepsias, reduzindo a quantidade e a intensidade das crises quando utilizados de forma crônica. Os DAE reduzem a transmissão neuronal anormal e exacerbada em pacientes com distúrbios epiléticos. As DAE, além da principal

aplicação no controle das crises epilépticas, estão entre os psicotrópicos mais prescritos no mundo para outras indicações, como nos transtornos de ansiedade, distúrbios psicóticos, profilaxia de enxaquecas e alívio da dor neuropática (Elkommos; Mula, 2022; Pong *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2024).

A farmacoterapia das epilepsias é essencial para o manejo da condição, envolvendo diversos antiepilépticos que atuam em diferentes mecanismos, como mostra o quadro 1. Porém, apesar de existirem diversas classes dispostas em quatro gerações de fármacos antiepilépticos, poucos são de primeira escolha, devido ao seu perfil de segurança (Fonseca *et al.*, 2024).

Quadro 1. Principais classes de fármacos antiepilépticos disponíveis no mercado.

Classe Farmacológica	Principal representante	Mecanismo de Ação principal	Principais Indicações Terapêuticas
Bloqueadores dos canais de sódio voltagem-dependentes	Fenitoína	Inibe canais de sódio voltagem-dependentes, estabilizando membranas neuronais	Epilepsia focal e generalizada tônico-clônica, <i>status epilepticus</i> *
Inibidores dos canais de cálcio tipo T	Etossuximida	Inibe canais de cálcio tipo T no tálamo	Crises de ausência
Barbitúricos (moduladores positivos do receptor GABA _A)	Fenobarbital	Prolonga a abertura dos canais de cloro via receptor GABA _A	Epilepsia generalizada, crises febris, <i>status epilepticus</i> *
Inibidores da recaptação de GABA	Tiagabina	Inibe a recaptação de GABA, aumentando sua disponibilidade sináptica	Epilepsia focal
Inibidores da GABA transaminase	Vigabatrina	Inibe irreversivelmente a GABA transaminase, aumentando GABA	Epilepsia refratária, espasmos infantis
Moduladores múltiplos (GABA, canais iônicos)	Ácido valproico	Aumenta GABA, inibe canais de sódio e cálcio	Crises generalizadas, ausências, mioclonias, transtorno bipolar
Ligantes da subunidade α2δ dos canais de cálcio	Gabapentina	Liga-se à subunidade α2δ dos canais de cálcio, reduzindo liberação de neurotransmissores	Epilepsia focal, dor neuropática
Moduladores do glutamato e canais de sódio	Lamotrigina	Inibe canais de sódio e liberação de glutamato	Epilepsia focal e generalizada, transtorno bipolar

Continua:

Continuação:

Ligantes da proteína vesicular SV2A	Levetiracetam	Liga-se à proteína SV2A, modulando liberação de neurotransmissores	Epilepsia focal, mioclônica, generalizada tônico-clônica
Antagonistas do receptor AMPA	Perampanel	Antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos AMPA	Epilepsia focal e generalizada tônico-clônica
Moduladores de múltiplos alvos	Topiramato	Bloqueia canais de sódio, inibe AMPA/kainato, potencializa GABA	Epilepsia, prevenção de enxaqueca, transtornos do humor (off-label)
Benzodiazepínicos (moduladores positivos do GABA _A)	Diazepam	Aumenta a frequência de abertura dos canais de cloro via receptor GABA _A	Crises agudas, status epilepticus, ansiedade, espasmos infantis

Legenda: * **status epilepticus** refere-se a um estado de crise epiléptica que dura mais de 5 minutos ou várias crises seguidas sem a pessoa recuperar a consciência entre elas, representando uma emergência médica grave que exige tratamento imediato (Coppler; Elmer, 2023).

Fonte: autoria própria (2025); adaptado de Elkommos; Mula, 2022 e Pong *et al.*, 2023.

Os fármacos benzodiazepínicos (BDZ), como diazepam, lorazepam e clonazepam, são amplamente utilizadas por sua capacidade de aumentar a atividade do GABA, o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Elas se ligam aos receptores GABA_A, promovendo a abertura dos canais de cloreto, o que resulta em uma maior entrada de íons cloro nas células neuronais, sendo, portanto, moduladores alostéricos dos receptores GABA_A. Isso provoca uma hiperpolarização da membrana, tornando os neurônios menos excitáveis e, portanto, reduzindo a probabilidade de descargas epileptiformes (Bayat *et al.*, 2021; Bartolini *et al.*, 2022; Fonseca *et al.*, 2024).

Os barbitúricos, como fenobarbital, também atuam no sistema GABAérgico, mas têm um perfil de ação mais amplo e podem aumentar o tempo que os canais GABA_A permanecem abertos, além de agir em outros sistemas inibitórios. Embora sejam eficazes, os barbitúricos apresentam um maior risco de efeitos colaterais, como sedação excessiva, depressão respiratória e indução de enzimas hepáticas, que podem reduzir a eficácia de outros medicamentos. Esse risco elevado, aliado à possibilidade de dependência, torna os barbitúricos menos favoráveis em comparação às benzodiazepinas em muitas situações clínicas (Falco-Walter, 2020).

Anticonvulsivantes mais recentes, como lamotrigina, levetiracetam e topiramato, têm mecanismos de ação variados. A lamotrigina, por exemplo, inibe canais de sódio dependentes de voltagem, estabilizando a membrana neuronal, enquanto o levetiracetam atua na modulação de proteínas vesiculares, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. O topiramato combina várias ações, incluindo a inibição de canais de sódio e a modulação do GABA, o que também contribui para sua eficácia (Guedes *et al.*, 2022). Dessa forma, a terapia antiepiléptica atual se resume ao controle das crises epilépticas, uma vez que procura reduzir a hiperexcitabilidade neuronal, mas não cura a doença.

2.4.1. Epilepsias refratárias

Quando o paciente apresenta uma boa resposta ao tratamento, o controle das crises possibilita uma melhor qualidade de vida. Entretanto, em aproximadamente 30 % dos indivíduos que possuem epilepsia apresentam refratariedade às terapias com as principais DAE disponíveis (Guedes *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2024). Nestes casos, o paciente passa a receber associações terapêuticas com outras classes, o controle das crises é dificultado e, conseqüentemente, a qualidade de vida diminui (Löscher *et al.*, 2020).

Dessa forma, o cuidado multiprofissional é essencial nas epilepsias refratárias para garantir uma análise integral do paciente e uma farmacoterapia mais eficaz (Bartolini *et al.*, 2022). Os mecanismos de resistência às DAEs são bastante estudados, mas a busca por novas drogas capazes de solucionar este problema é essencial.

2.5. Pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas

Considerando os riscos associados à terapia com drogas antiepilépticas, a toxicidade das drogas e a quantidade de efeitos colaterais associados, a busca por Novas Drogas Antiepilépticas (NDA) é um esforço mundial (Tewari *et al.*, 2023). Além disso, como as epilepsias refratárias representam uma parcela de aproximadamente 30 % dos casos, a qualidade de vida dos pacientes é baixa, o que também faz com que seja necessário que novas drogas sejam desenvolvidas (Löscher *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2021; Guedes *et al.*, 2022). Neste contexto, pesquisas avaliando o

potencial antiepiléptico e neuroprotetor com produtos naturais, sintéticos e semissintéticos são realizadas ao redor do mundo (Bartolini *et al.*, 2022).

Um dos caminhos promissores nessa pesquisa envolve o uso de plantas medicinais, uma prática milenar e rica de constituintes químicos bioativos. Muitas culturas tradicionais têm empregado ervas para o tratamento de distúrbios neurológicos, como a epilepsia, e a ciência moderna vem validando essas práticas. A *Cannabis sativa*, por exemplo, tem mostrado potencial em estudos clínicos para auxiliar no controle das crises epiléticas, especialmente em formas resistentes à terapia convencional. Outro exemplo é o *Ginkgo biloba*, que tem sido investigado por suas propriedades neuroprotetoras (Singh *et al.*, 2019).

Entretanto, a pesquisa nessa área enfrenta desafios, como a padronização dos extratos vegetais, a identificação dos princípios ativos responsáveis pelos efeitos terapêuticos e a realização de estudos clínicos rigorosos que garantam a eficácia e a segurança dos tratamentos à base de plantas. A combinação de rigor científico com o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais pode abrir novas perspectivas no tratamento da epilepsia, oferecendo alternativas valiosas para pacientes que não respondem aos medicamentos atualmente disponíveis. Essa abordagem integrativa pode contribuir para um avanço significativo na farmacoterapia antiepiléptica. (Wang *et al.*, 2019).

2.5.1. Métodos experimentais para avaliação de novas drogas antiepilépticas

Com o crescente interesse da indústria na pesquisa por novas biomoléculas com potencial farmacológico, diversos modelos experimentais são desenvolvidos constantemente. O objetivo destes modelos é avaliar, de forma aprofundada, as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas dessas moléculas, bem como outros aspectos relevantes à farmacologia (Da Silva *et al.*, 2022).

Os modelos experimentais são sistemas biológicos, físicos ou computacionais utilizados em estudos científicos para simular, estudar e/ou compreender fenômenos complexos que ocorrem em organismos vivos, como os seres humanos. Eles permitem testar hipóteses, analisar mecanismos e avaliar intervenções de forma controlada, reprodutível e ética. De maneira simplificada, ele busca mimetizar

condições humanas em um ambiente inteiramente controlado pelo experimentador (Löscher, 2017; Ohmori *et al.*, 2022; Heckers; Konrad, 2023). Os modelos biológicos mais utilizados em farmacologias envolvem animais (Robinson *et al.*, 2019).

Para que um modelo animal seja validado, ele deve obedecer a alguns critérios de validação, a saber: previsibilidade, semelhança e homologia. Um modelo deve obedecer satisfatoriamente a pelo menos um dos três critérios. A previsibilidade de um modelo é avaliada a partir da similaridade entre os efeitos farmacológicos da droga em seres humanos, na clínica, e nos animais. Dessa forma, se uma droga apresenta efeito antiepiléptico na clínica, ela deve apresentar o mesmo efeito nas condições definidas operacionalmente como parâmetros para crises epiléticas, devendo ser a potência relativa correspondente (Romanova; Sweedler, 2018; Robinson *et al.*, 2019)

O critério de semelhança refere-se à similaridade fenomenológica entre os comportamentos/parâmetros observados nos animais com aqueles observados em humanos. No caso de crises epiléticas, normalmente essa similaridade é alta, uma vez que, tanto nos humanos, como nos animais, as crises epiléticas são desencadeadas por uma hiperexcitabilidade neuronal e se manifestam da mesma forma (Robinson *et al.*, 2019). Já o critério de homologia, por sua vez também chamado de “validade teórica”, diz respeito aos processos psicobiológicos envolvidos na etiologia e fisiopatologia dos fenômenos observados experimentalmente. Também devem ser similares aos dos seres humanos (Romanova; Sweedler, 2018).

Dessa forma, caso um modelo experimental que utilize animais, como os roedores, obedeça a estes critérios, ele é válido e o resultado observado e avaliado estatisticamente pode servir para uma inferência de um resultado esperado em humanos. Além disso, outros critérios biológicos, como a similaridade genética, também devem ser levados em consideração na hora da escolha dos modelos. Os roedores, a exemplo dos camundongos, apresentam uma similaridade genética (genes homólogos ortólogos) de aproximadamente 85-90% com os seres humanos, sendo este um alto nível de similaridade para que seja possível inferir qualquer efeito farmacológico (Robinson *et al.*, 2019; Baptista; Faustino-Rocha; Oliveira, 2021).

No contexto do estudo do potencial antiepiléptico, os roedores são animais amplamente utilizados, uma vez que são de fácil manuseio, baixo custo operacional e possuem uma baixa variabilidade intraespecífica quando comparados a outras

classes (Ohmori *et al.*, 2022). Os camundongos (*Mus musculus*) são frequentemente utilizados como modelos animais de laboratório de epilepsia por serem dóceis e menores e, conseqüentemente, exigirem um menor espaço de ambientação e custo de operação, além da alta similaridade genética com os seres humanos (85-90%) (Löscher, 2017).

Nesse contexto, no estudo de novas drogas com ação antiepiléptica, modelos computacionais (*in silico*), celulares (*in vitro*) e animais (*in vivo*) são utilizados em conjunto, no intuito de somar resultados e possibilitar uma análise mais aprofundada e detalhada dos possíveis efeitos observados. No âmbito dos experimentos *in vivo*, uma importante regra deve ser respeitada, “a regra dos 3 Rs” (do inglês *Reduction*, *Refinement* and *Replacement*, ou, em português, Redução, Refinamento e Substituição, respectivamente), com o objetivo de minimizar o uso e o sofrimento animal nas pesquisas (Moro; Hanna-Rose, 2020; Song; Kim, 2021).

A redução, presente nos 3 R busca empregar o menor número possível de animais para alcançar resultados estatisticamente válidos; o refinamento implica na melhoria das condições experimentais para mitigar dor e estresse animal, assegurando práticas de manejo e procedimentos mais éticos e um ponto final humanitário. Por fim, a substituição estimula o uso de métodos alternativos, como culturas celulares e modelos computacionais, que possam substituir, parcial ou totalmente, o uso de animais (Romanova; Sweedler, 2018; Baptista; Faustino-Rocha; Oliveira, 2021).

2.5.1.1. Predição *in silico* de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas

No intuito de minimizar o uso de animais, diversas propriedades moleculares da droga em estudo são avaliadas previamente por meio de ferramentas computacionais (Da Silva *et al.*, 2023). Os modelos computacionais proporcionam uma análise preditiva do comportamento da droga no organismo vivo e suas possíveis interações com alvos moleculares importantes para o efeito esperado (De Sousa *et al.*, 2024; Rodrigues *et al.*, 2024).

O avanço das ferramentas *in silico* tem proporcionado uma transformação significativa no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, oferecendo abordagens racionais e economicamente viáveis para triagem inicial de compostos

bioativos (Xiao et al., 2025). Dentre essas ferramentas, destacam-se os métodos preditivos de propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), como o SwissADME, e os estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular, os quais permitem uma avaliação aprofundada do perfil farmacocinético e do potencial de interação molecular de substâncias com alvos biológicos específicos (De Sousa et al., 2024).

Nesse contexto, as análises de propriedades ADMET são essenciais para estimar a viabilidade de um composto como candidato a fármaco, uma vez que muitas moléculas promissoras em termos de atividade farmacológica falham em etapas posteriores devido a perfis inadequados de biodisponibilidade, toxicidade ou metabolismo. Assim, ferramentas como o SwissADME, pkCSM e admetSAR possibilitam a predição de parâmetros como a permeabilidade intestinal, penetração na barreira hematoencefálica, inibição de enzimas do citocromo P450 e o risco de toxicidade hepática e cardiotoxicidade (Da Silva et al., 2022; De Sousa et al., 2024). Esses dados, somados a um estudo bibliográfico aprofundado, fornecem subsídios relevantes para a seleção de compostos com maior probabilidade de sucesso em modelos *in vivo* e ensaios clínicos (Da Silva et al., 2023; Pires et al., 2024; Fonsêca et al., 2024).

Complementarmente, os estudos de *docking* molecular permitem a avaliação da afinidade de ligação entre a molécula de interesse e proteínas-alvo envolvidas na fisiopatologia de doenças neurológicas, como os canais iônicos ou receptores GABAérgicos ou glutamatérgicos, frequentemente associados à fisiopatologia da epilepsia (Da Silva et al., 2022; De Sousa et al., 2024; Rodrigues et al., 2024; Araújo et al., 2024).

Esta análise aprofundada dos modos de ligação, energias de interação e a identificação de resíduos-chave no sítio ativo possibilita a elucidação de mecanismos moleculares subjacentes à atividade farmacológica. A aplicação subsequente de dinâmica molecular aprofunda essa abordagem através de uma simulação temporal e espacial do comportamento do complexo ligante-receptor em condições fisiológicas em um organismo vivo, avaliando sua estabilidade conformacional, flexibilidade estrutural e persistência das interações intermoleculares ao longo do tempo (Song; Kim, 2021).

No contexto da investigação do potencial antiepiléptico e neuroprotetor de novas substâncias, essas metodologias *in silico* assumem um papel estratégico ao permitir a triagem e priorização racional de compostos antes da condução de experimentos com modelos animais. Assim, considerando a complexidade das doenças neurológicas e as limitações éticas e logísticas do uso de animais, a integração desses dados preditivos proporciona uma base científica sólida para a justificativa e o delineamento experimental *in vivo*, reduzindo o número de animais utilizados e aumentando a eficiência da pesquisa translacional (Rodrigues *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2024; Fonsêca *et al.*, 2024; Xiao *et al.*, 2025).

2.5.1.2. Modelos *in vivo*

Os estudos pré-clínicos que buscam avaliar o potencial antiepiléptico de novas drogas fazem uso de diversos modelos animais em roedores. Esses modelos permitem investigar os efeitos farmacológicos em um ambiente controlado além de compreender os mecanismos neurobiológicos subjacentes à epileptogênese. Cada modelo apresenta características específicas e fornece informações complementares, sendo essencial para a triagem e desenvolvimento de candidatos a fármacos antiepilépticos (Jafarian *et al.*, 2021).

Os modelos animais para indução de crises epilépticas baseiam-se na capacidade de estímulos químicos ou elétricos de induzirem uma hiperexcitabilidade neuronal. Dentre os modelos mais utilizados, destaca-se o modelo de crises epilépticas agudas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). É um modelo padrão-ouro na triagem de drogas com potencial antiepiléptico. O seu principal objetivo é avaliar a capacidade de uma substância em prevenir ou retardar crises tônico-clônicas generalizadas (Monteiro *et al.*, 2024; Fonsêca *et al.*, 2024; Rahimi *et al.*, 2022). O PTZ atua como um antagonista não competitivo do receptor GABA_A, reduzindo a neurotransmissão inibitória mediada por GABA e promovendo a hiperexcitabilidade neuronal (Khan *et al.*, 2024).

Outro modelo amplamente empregado é o de crises epilépticas induzidas por picrotoxina, que por sua vez bloqueia diretamente o canal do receptor GABA_A, comprometendo a neurotransmissão inibitória e facilitando a indução de crises epilépticas. De forma semelhante, o modelo de crises epilépticas induzidas por

bicuculina tem como objetivo testar a eficácia de drogas em prevenir a hiperexcitabilidade cortical. Nesse caso, a bicuculina atua como um antagonista competitivo do receptor GABA_A, bloqueando a ligação do GABA e promovendo descargas neuronais excessivas (Miziak; Chrościńska-Krawczyk; Czuczwar, 2022; Vicente-Silva *et al.*, 2022).

Já o modelo de *kindling*, que pode ser induzido por estímulos elétricos ou por injeções repetidas de agentes indutores de crises epiléticas - como injeções de dose subativa de PTZ, busca avaliar o potencial das drogas em impedir o desenvolvimento e a progressão da epileptogênese (Dhir, 2012). Esse modelo mimetiza processos de sensibilização neuronal que ocorrem em epilepsias crônicas, fornecendo informações valiosas sobre a capacidade das substâncias em interferir nesse processo (Singh; Mishra; Goel, 2021; Monteiro *et al.*, 2024)

Ademais, os modelos de crises epiléticas induzidas por ácido caínico e pilocarpina são fundamentais para investigar crises tônico-clônicas e o status epilepticus, além das consequências neurodegenerativas associadas. Esses agentes estimulam a neurotransmissão excitatória glutamatérgica (ácido caínico) ou colinérgica (pilocarpina), provocando intensa ativação neuronal e morte celular em regiões específicas do cérebro (Rusina; Bernard; Williamson, 2021; Xie *et al.*, 2022)

Além dos modelos de indução química, existe o modelo de eletrochoque auricular máximo – EAM (MES, do inglês *maximal electroshock seizure*) é um método experimental clássico de indução elétrica de crises epiléticas. Ele consiste na aplicação de um estímulo elétrico de alta intensidade e curta duração por meio de eletrodos posicionados nas orelhas (auriculares), induzindo crises epiléticas do tipo tônico-clônico generalizadas (Rahimi *et al.*, 2022). O principal parâmetro analisado nesse modelo é a supressão da fase tônica de extensão dos membros posteriores, considerada um indicador da eficácia anticonvulsivante do composto em estudo (Alaraj; Saadh; Alafnan, 2022).

Esses modelos são ferramentas indispensáveis para a triagem pré-clínica de candidatos a fármacos antiepiléticos. Eles fornecem dados relevantes sobre a eficácia e os possíveis mecanismos de ação das substâncias em estudo, contribuindo para o avanço na descoberta de novos tratamentos para a epilepsia. Dessa forma, no estudo pré-clínico do potencial antiepilético e neuroprotetor de novas drogas, são

etapas fundamentais (Jafarian *et al.*, 2021; Vicente-Silva *et al.*, 2022; Fonsêca *et al.*, 2024).

2.6. Os monoterpenos e o potencial farmacológico do hidroxicitronelal

No âmbito da pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas drogas com potencial terapêutico, os produtos naturais vêm ganhando um destaque importante, uma vez que as plantas medicinais são dotadas de um potencial biológico diverso e diversas classes de fitoquímicos já são amplamente conhecidas por apresentarem múltiplos efeitos farmacológicos (Ekiert; Szopa, 2020).

Estudos clínicos e pré-clínicos comprovaram que os metabólitos secundários, como alcaloides, terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, cinamatos e as saponinas possuem efeitos farmacológicos diversos, sobretudo a nível de Sistema Nervoso Central (SNC) (Pina *et al.*, 2021; Alvi *et al.*, 2021).

Os monoterpenos, uma subclasse dos compostos terpenoides, são formados por unidades repetidas de cinco carbonos denominadas isoprenos. Sua biossíntese tem início a partir do acetil-CoA, que participa de diversas rotas biossintéticas, incluindo a via do ácido mevalônico, logo os terpenoides é referida como produto da via do ácido mevalônico (De La Peña; Sattely, 2021). O processo envolve a síntese de intermediários fundamentais: o difosfato de isopentenil (DFI) e o difosfato de dimetilalilo (DFDMA). A partir deste ponto, a condensação dessas duas unidades de isopreno dá origem a um esqueleto de 10 carbonos, gerando o geranyl difosfato (GDF), precursor imediato de todos os monoterpenos (Zielińska-Błajet; Feder-Kubis, 2020).

Diversos monoterpenos e seus derivados já foram estudados em relação às suas atividades farmacológicas diversas, como propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral (Kong *et al.*, 2025). Alguns monoterpenos já possuem atividade antiepiléptica conhecida, tendo apresentado efeitos em roedores em doses que variam de 25 a 400 mg/kg, como o Carveol, a Carvona, o Linalol, o Limoneno, o Timol, o Terpeneol, o Borneol, o Citral, o Tetrahidrolinalol, o Geraniol, o Mentol, o Citronelol e o Citronelal (Souto-Maior *et al.*, 2016; Bianchini *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2020; Pina *et al.*, 2021; Alvi *et al.*, 2021; Nesrtekina *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023; Fonsêca *et al.*, 2024; Chowdhury *et al.*, 2024).

Alguns destes efeitos *in vivo* já estão mais elucidados e os possíveis mecanismos de ação envolvem múltiplos alvos, como o timol que age por via

GABAérgica e também atua na neuroinflamação e no sistema antioxidante (Bianchini et al., 2017). O terpineol também age por via GABAérgica promovendo o efeito antiepiléptico, mas também possui interação com as vias opioide e serotoninérgica, além de influenciar nos níveis de GSH (Pina et al., 2021).

O mentol, por sua vez, já possui ação sobre a via GABAérgica conhecida, assim como o limoneno, o carvacrol e o tetrahidrolinalol, o que denota a importância da via GABAérgica para o efeito antiepiléptico e neuroprotetor dos monoterpenos (Bianchini et al., 2017; Seo et al., 2020; Fonsêca et al., 2024).

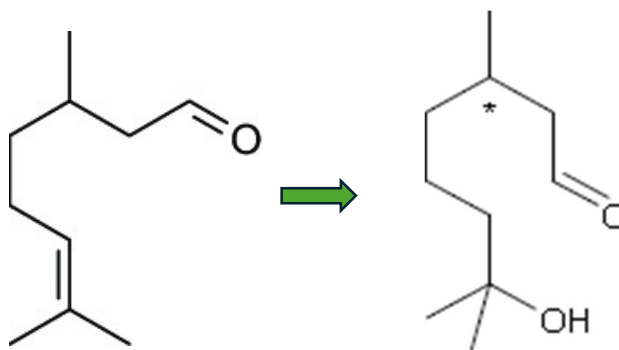
No contexto dos monoterpenos com potencial farmacológico a nível de SNC, a citronela vem sendo estudada como importante fonte de fitoquímicos dotados de potencial biológico relevante. A citronela é uma planta herbácea pertencente ao gênero *Cymbopogon*, conhecida principalmente por suas propriedades aromáticas e repelentes. Existem diferentes espécies de citronela, sendo as mais conhecidas a *Cymbopogon nardus* e a *Cymbopogon winterianus*. Essa planta é originária da Ásia e amplamente cultivada em países como Índia, Indonésia, Sri Lanka e Brasil, tanto para fins comerciais quanto medicinais (Salsabila et al., 2023; Somala et al., 2023; Rammal et al., 2024). O óleo essencial (OE) extraído das suas folhas é rico em compostos como citronelal, geraniol e citronelol, responsáveis por seu aroma característico cítrico e por suas propriedades biológicas (Andrade et al., 2021; Jawaid et al., 2023; Salsabila et al., 2023).

Do ponto de vista farmacológico, estudos têm demonstrado que a citronela possui propriedades antimicrobianas, antifúngicas e anti-inflamatórias, ampliando suas aplicações na fitoterapia (Jawaid et al., 2023; Butzge et al., 2023). Na literatura, o citronelal e seus derivados apresentam efeitos potenciais no SNC, como atividade ansiolítica e sedativa, antiepiléptica e antinociceptiva em modelos experimentais com roedores (Andrade et al., 2021; Costa et al., 2023; Chowdhury et al., 2024; Fonsêca et al., 2024).

O hidroxicitronelal (HC) (3,7-dimetil-7-hidroxiocetanal) é um monoterpeno utilizado como ingrediente de fragrâncias e é encontrado em uma ampla variedade de produtos. O HC é utilizado na indústria de cosméticos, saneantes e inseticidas. Este composto é produzido principalmente na União Europeia, em uma frequência aproximada de 88 toneladas/ano (Andrade et al., 2021; Api et al., 2022). O HC pode

ser obtido a partir da hidroxilação do citronelal, seu precursor químico encontrado na citronela (*Cymbopogon* spp.), como mostra a figura 3.

Figura 3. Síntese do Hidroxicitronelal (HC) a partir do Citronelal.



Descrição: A mistura racêmica dos isômeros R-Citronelal e S-Citronelal (Citronelal – imagem da esquerda) pode ser convertida em Hidroxicitronelal (imagem da direita) por meio de uma reação simples de hidroxilação.

Fonte: Adaptado de Andrade *et al.*, 2021.

Na literatura, o HC ainda não possui muitos trabalhos que abordem as suas propriedades farmacológicas, mas o derivado já possui bastante relevância na indústria de cosméticos e saneantes (Svedman *et al.*, 2003). Entretanto, o trabalho de Silva *et al.* (2017) avaliou os possíveis potenciais farmacológicos teóricos do HC de forma *in silico* e verificou que a substância apresenta possível efeito antioxidante, o que poderia contribuir para uma atividade neuroprotetora. Ademais, estudos recentes destacam um efeito farmacológico importante do HC a nível de SNC.

O estudo de Andrade *et al.* (2021) investigou o efeito ansiolítico-símile do HC em roedores (camundongos *Swiss* albinos machos) e, no trabalho em questão, é possível verificar que o HC possui efeito ansiolítico *in vivo* por via intraperitoneal (i.p) e que este efeito está relacionado com a via GABAérgica - quando analisados os resultados do estudo *in silico* e *in vivo* - assim como os benzodiazepínicos.

Fármacos com perfil benzodiazepínico frequentemente apresentam efeito antiepiléptico em humanos e são utilizados em associação com outros fármacos nos esquemas terapêuticos no tratamento da epilepsia (Penovich *et al.*, 2024). Dessa forma, é possível que o HC também possua efeito antiepiléptico, uma vez que a via GABAérgica é essencial na terapia antiepiléptica e vários fármacos das classes dos BDZ e dos barbitúricos possuem tal efeito.

Ademais, o trabalho de Andrade *et al.* (2021) também avaliou as propriedades farmacocinéticas e tóxicas (ADMET) do HC por meio de ferramentas como SwissADME e pkCSM e constatou que a molécula possui valores satisfatórios para todos os parâmetros avaliados e que ela obedece aos critérios de Lipinski (“regra dos 5” de Lipinski), o que torna o HC um importante candidato a fármaco e ao tratamento por via oral (Andrade *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2022).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos antiepilético e neuroprotetor do hidroxicitronelal por meio de metodologias *in silico* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

In silico

- a) Realizar estudo *in silico* da possível interação química entre o hidroxicitronelal e importantes alvos terapêuticos para as epilepsias por meio de *docking* molecular;

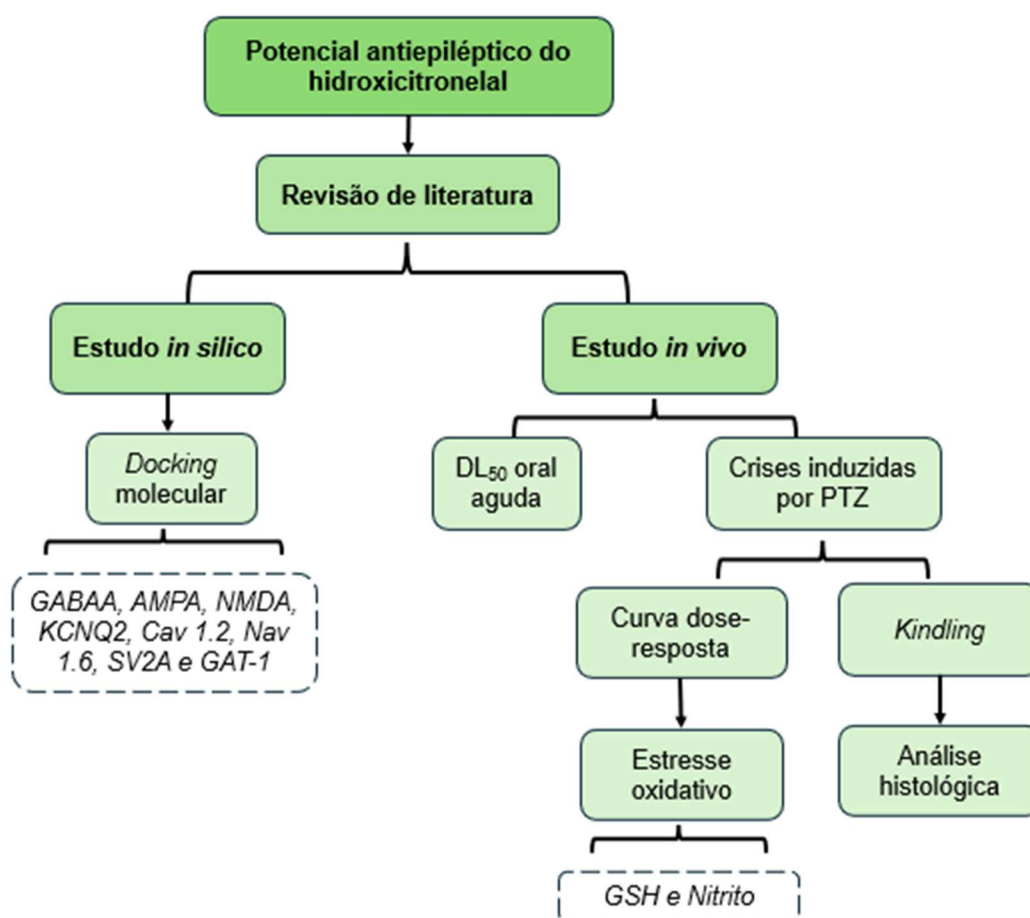
In vivo

- b) Investigar a toxicidade oral aguda e estimar a DL₅₀ oral do hidroxicitronelal por meio do protocolo nº 423 da OECD;
- c) Avaliar o efeito antiepilético e neuroprotetor do hidroxicitronelal no modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol;
- d) Determinar a curva dose-resposta do efeito antiepilético e neuroprotetor do hidroxicitronelal no modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol;
- e) Dosar marcadores do estresse oxidativo e do sistema antioxidante através da quantificação de substâncias reativas ao nitrito e à glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos pré-tratados com o hidroxicitronelal e submetidos ao modelo agudo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol;
- f) Investigar os efeitos antiepilético e neuroprotetor do hidroxicitronelal em camundongos submetidos ao modelo subcrônico de abrasamento químico (*kindling*);
- g) Realizar estudo histológico do parênquima e do estroma dos córtex cerebrais dos animais submetidos ao modelo subcrônico de abrasamento químico (*kindling*);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido por meio de metodologias *in silico* e *in vivo* no intuito de investigar o possível potencial antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxicitronelal, seguindo o design experimental que consta na figura 4.

Figura 4. Design experimental para as metodologias *in silico* e *in vivo*.



Fonte: autor (2025).

4.1. Estudo in silico

4.1.1. Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado por meio do software *Molegro Virtual Docker* (MVD) v.6.0, utilizando as configurações padrões do software, em parceria com o Laboratório de Quimioinformática da UFPB. As estruturas cocrystalizadas foram

obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) para os diversos alvos envolvidos na terapia antiepiléptica. Foram feitas simulações computacionais para avaliar a possível interação química entre o HC e os alvos selecionados. Todos os compostos de água e cofatores foram excluídos da estrutura da enzima.

Os alvos foram selecionados do PDB, também, de acordo com a sua resolução ($< 4.0 \text{ \AA}$) (tabela 1). O procedimento de acoplamento foi realizado usando uma GRID de $15 \text{ \AA}$ de raio e $0,30$ de resolução, cobrindo o local de ligação do ligante para as estruturas e os resultados foram obtidos em valores de energia em kcal/mol. antes do docking molecular, a etapa de *redocking* foi realizada, a fim de avaliar a precisão e confiabilidade dos resultados a partir do *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD). O RMSD é uma etapa importante para verificar se o algoritmo utilizado foi capaz de produzir a pose correta e valores $\leq 2 \text{ \AA}$ são considerados satisfatórios (Da Silva *et al.*, 2022; Fonseca *et al.*, 2024) .

Tabela 1. Proteínas-alvo coletadas no *Protein Data Bank*.

Proteína-alvo	PDB (ID)	Resolução	Ligante	RMSD
AMPA _R	1MY2	1,80 Å	Perampanel	-
Cav1.2	8FD7	3,10 Å	Gabapentina	0.235
GABA _A	6X3U	3,50 Å	Flumazenil	0.357
GABA _A	6X3W	3,30 Å	Fenobarbital	0.145
GABA _A	6X3X	2,92 Å	Diazepam	0.360
GAT-1	7Y7Z	3,20 Å	Tiagabina	0.145
KCNQ2	7CR2	3,20 Å	Retigabina	0.400
Nav1.6	8FHD	3,10 Å	Fenitoína	-
NMDA _R	7EOQ	3,50 Å	Felbamato	-
SV2A	8JLI	3,30 Å	Levetiracetam	0.274

Nota: Os valores de RMSD não foram considerados para o receptor AMPA_R, Nav1.6 e NMDA por não possuírem os ligantes desejados cocristalizados disponíveis no PDB.

Fonte: autor (2025).

4.2. Estudo *in vivo*

4.2.1. Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss albinos machos, pesando entre 25 e 30g, com aproximadamente 6 semanas de idade, provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM). Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, sob o certificado de número 1381250225 (ID 002408) (ANEXO I).

Na sala de manutenção da UPA-IPeFarM, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno. Estes permaneceram sob temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), tendo livre acesso a ração tipo pellets e água disponível em garrafas de polietileno, com bico de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola e sendo submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00. Os camundongos foram privados de água e ração 60 minutos antes dos testes.

Todos os procedimentos experimentais seguiram rigorosamente as normas brasileiras da Lei no 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais e de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal, dispostos na RN 30/2016 CONCEA/MCTI e no Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica – CONCEA, 2023.

Os animais utilizados na maior parte dos protocolos foram eutanasiados pelo método de superdose de anestésicos, com a administração de solução de cetamina (300 mg/kg) e a xilazina (30 mg/kg), em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal. Após a ausência do reflexo corneal, foi administrado 2 mmol/kg de cloreto de potássio, seguido de deslocamento cervical de acordo com a Resolução CONCEA nº 37/2018. Os animais que tiveram partes do cérebro retiradas após os testes das crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol, foram eutanasiados pelo método físico de decapitação, utilizando-se a guilhotina (Res. CONCEA nº 37/2018). Isso se deu pelo fato de o estudo antioxidante, presente no experimento, ter como objetivo observar as alterações bioquímicas que o experimento, juntamente com a substância teste, pudessem causar no cérebro dos animais (Zhu *et al.*, 2014).

4.2.2. Drogas e tratamentos

O hidroxicitronelal, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Damião Pergentino (DCF/UFPB), foi preparado em solução salina (NaCl 0,9 %) com adição de Tween 80 a 2 %. O veículo foi preparado com solução salina (NaCl 0,9%) em Tween 80 a 2% e as demais soluções foram produzidas de acordo com protocolos de preparo padronizados no Laboratório de Psicofarmacologia – IPeFarM/UFPB. O pentilenotetrazol (PTZ) e o diazepam (DZP) utilizados na curva dose-resposta e no abrasamento químico foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich®. Todos os animais submetidos ao estudo *in vivo* receberam tratamento v.o. e/ou i.p. na proporção de 0,1 mL/10 g de peso corporal.

4.2.3. Investigação da toxicidade oral aguda e estimativa da DL₅₀.

O protocolo da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) - “*Guidelines for testing of chemicals*” n.º 423/2001 foi adotado para a investigação da toxicidade oral aguda e estimativa da DL₅₀ do hidroxicitronelal (HC). A dose definida para início dos testes foi a de 300 mg/kg, como estabelece o protocolo (Anexo II). Dessa forma, os animais de um grupo foram tratados com veículo (salina a 0,9% 10 mL/kg, v.o.) e de outro com HC (300 mg/kg, v.o.) e os mesmos foram submetidos à observação nos intervalos de 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min e durante 14 dias seguidos.

Os animais foram avaliados quanto aos efeitos farmacológicos gerais, previamente descritos por Malone e Robichaud (1962) (estimulante ou depressor central), e possíveis sinais de toxicidade e/ou letalidade. Após realizada a análise durante os 14 dias, a depender do número de mortes de animais, os mesmos parâmetros devem ser adotados em uma nova análise com uma dose maior (2000 mg/kg) ou menor (50 mg/kg), o que se segue até que a substância se enquadre em uma faixa de DL₅₀ estipulada pelo protocolo da OECD. Ao final das análises, os animais foram eutanasiados e os órgãos (encéfalo, coração, fígado, rins, pulmão, baço e estômago) foram coletados para análise morfológica macroscópica.

4.2.4. Modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol

O pentilenotetrazol (PTZ) é uma ferramenta farmacológica química indutora de crises epiléticas, frequentemente utilizada como padrão-ouro na triagem preliminar na investigação de novas drogas com potencial anticonvulsivante (Yuskaitis *et al.*, 2021; Guedes *et al.*, 2022). Dessa forma, no protocolo foram utilizados 6 grupos de oito animais, divididos em: controle (1), que receberá apenas o veículo (salina a 0,9% 10 mL/kg, v.o.), padrão positivo (2), que receberá Diazepam (DZP 5 mg/kg i.p.); e três grupos com diferentes doses de hidroxicitronelal (HC) (3-5) definidas com base na DL₅₀ oral (200, 100 e 50 mg/kg) e grupo basal (6), utilizado nas análises neuroquímicas.

Decorridos 60 minutos, os animais receberam a administração do PTZ (Sigma-Aldrich, E.U.A.) na dose de 85 mg/kg (i.p.) e, imediatamente após a injeção de PTZ, os animais foram analisados por um período de 15 minutos quanto aos seguintes parâmetros: latência para o primeiro espasmo mioclônico (a), latência para convulsão tônico-clônica generalizada (b), duração da convulsão tônico-clônica generalizada (c), latência para a morte (d) (Erum; Van Dam; De Deyn, 2019; Monteiro *et al.*, 2024). O experimento e as análises neuroquímicas posteriores ocorreram conforme esquema presente na figura 5.

4.2.4.1. *Determinação da curva dose-resposta no modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol*

A partir da triagem de doses realizada no modelo agudo de crises epiléticas induzidas por PTZ, novas doses foram selecionadas no intuito de se determinar a curva dose-resposta do HC, as quais foram testadas de forma decrescente (50 % da dose anterior) a partir da dose de 50 mg/kg (25, 12,5 e 6,25 mg/kg) (figura 5). Os animais receberam as administrações orais de HC nas referidas doses e, decorridos 60 minutos, receberam a administração do PTZ (Sigma-Aldrich, E.U.A.) na dose de 85 mg/kg (i.p.) e, imediatamente após a injeção de PTZ, os animais foram analisados por um período de 15 minutos quanto aos seguintes parâmetros: latência para o primeiro espasmo mioclônico (a), latência para convulsão tônico-clônica generalizada (b), duração da convulsão tônico-clônica generalizada (c), latência para a morte (d) (Erum; Van Dam; De Deyn, 2019; Monteiro *et al.*, 2024).

Figura 5. Modelo agudo de Crises Epilépticas induzidas por PTZ.

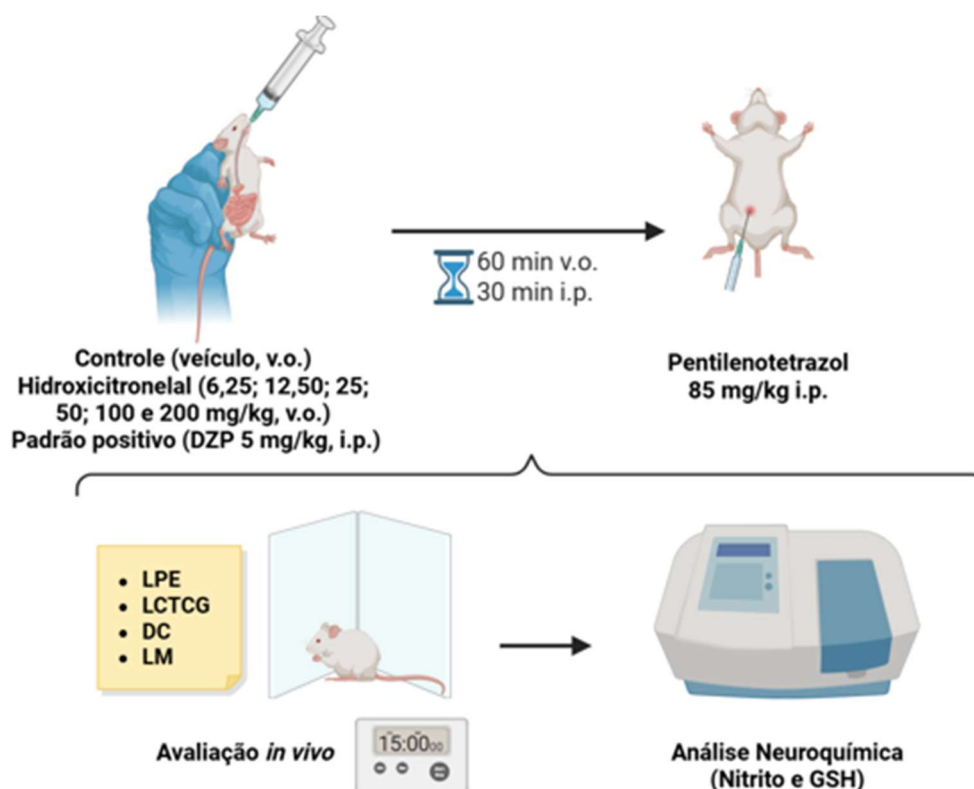


Imagem: feito com o Biorender.com.

Legenda: LPE: Latência para o Primeiro Espasmo Mioclônico; LCTCG: Latência para a Primeira Crise Epiléptica Tônico-Clônica Generalizada; DC: Duração das Crises; e LM: Latência para Morte.

Fonte: autor (2025).

4.2.5. Análises neuroquímicas: quantificação de componentes do sistema antioxidante

Os animais submetidos ao modelo de crises epilépticas induzidas por pentilenotetrazol foram eutanasiados pelo método da guilhotina, uma vez que a administração de superdose de anestésicos pode influenciar as análises neuroquímicas (Monteiro *et al.*, 2024) e, em seguida, foram removidos os cérebros para dissecação dos hipocampus. Os grupos selecionados para realização da quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e nitrito foram os seguintes: basal (1); controle (2); padrão – DZP 5 mg/kg (3); e HC 100 mg/kg (4). Em seguida, os hipocampus foram tratados e avaliados de acordo com as seguintes metodologias:

4.2.5.1. Glutathiona reduzida (GSH)

Este teste foi executado de acordo com a metodologia de Sedlak e Lindsay, 1968, baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB-5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), com os grupos tiois. A área cerebral foi diluída em EDTA 0,02M (10%) e misturada com solução de ácido tricloroacético (50%). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000rpm/15min). O sobrenadante foi coletado e misturado com tampão HCl (0,4M; pH 8.9) e DTNB (0,01M). A concentração de GSH (ng de GSH/g tecido) foi determinada por espectrofotometria (412nm).

4.2.5.2. Determinação de nitrito

Os níveis de nitrito na região cerebral do camundongo foi determinada pela reação de Griess (Green; Goldman, 1981; Radenovic; Selakovic, 2005; Monteiro et al., 2024). O homogenato foi centrifugado (800g/10min), o sobrenadante coletado e adicionado o reagente de Griess (sulfonamida 1%/N-(1-naftil) hidrocloreto de etilenodiamina 0.1%/ácido fosfórico 5%/água destilada, 1:1:1:1) e incubado, em temperatura ambiente, por 10min. A concentração de nitrito foi expressa em nM de nitrito/g de tecido e absorbância das amostras determinada a 560nm.

4.2.6. Modelo do abrasamento químico (*kindling* químico)

O *kindling* é modelo subcrônico de abrasamento químico que objetiva instaurar um processo epileptogênico no animal, ocasionando crises epiléticas espontâneas por meio de estímulos subconvulsivantes repetitivos. Substâncias com efeito antiepilético neste modelo de abrasamento químico, provavelmente apresentarão este efeito em quadros de epilepsia do lobo temporal, crises parciais e complexas em humanos (Dhir, 2012; Singh; Mishra; Goel, 2021; Monteiro et al., 2024).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos (n=8) e em dias alternados, em um período de 21 dias, receberam diferentes administrações. Um grupo recebeu apenas o veículo (salina a 0,9% 10 mL/kg, v.o.), um grupo basal não recebeu

administração de PTZ, outro recebeu HC 100 mg/kg, v.o e o grupo padrão recebeu o diazepam (5 mg/kg, i.p).

Em dias alternados às administrações cada animal recebeu uma injeção de PTZ em dose subativa (35 mg/kg, i.p.) (Dhir, 2012) e foi observado quanto aos seguintes parâmetros: latência para o primeiro espasmo mioclônico (a), latência para convulsão tônico-clônica generalizada (b), duração da convulsão tônico-clônica generalizada (c), latência para a morte (d). Ao final do período de administração, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram removidos para posteriores análises histopatológicas, conforme aponta o esquema da figura 6.

Figura 6. Design experimental do modelo subcrônico de abrasamento químico (*kindling*).

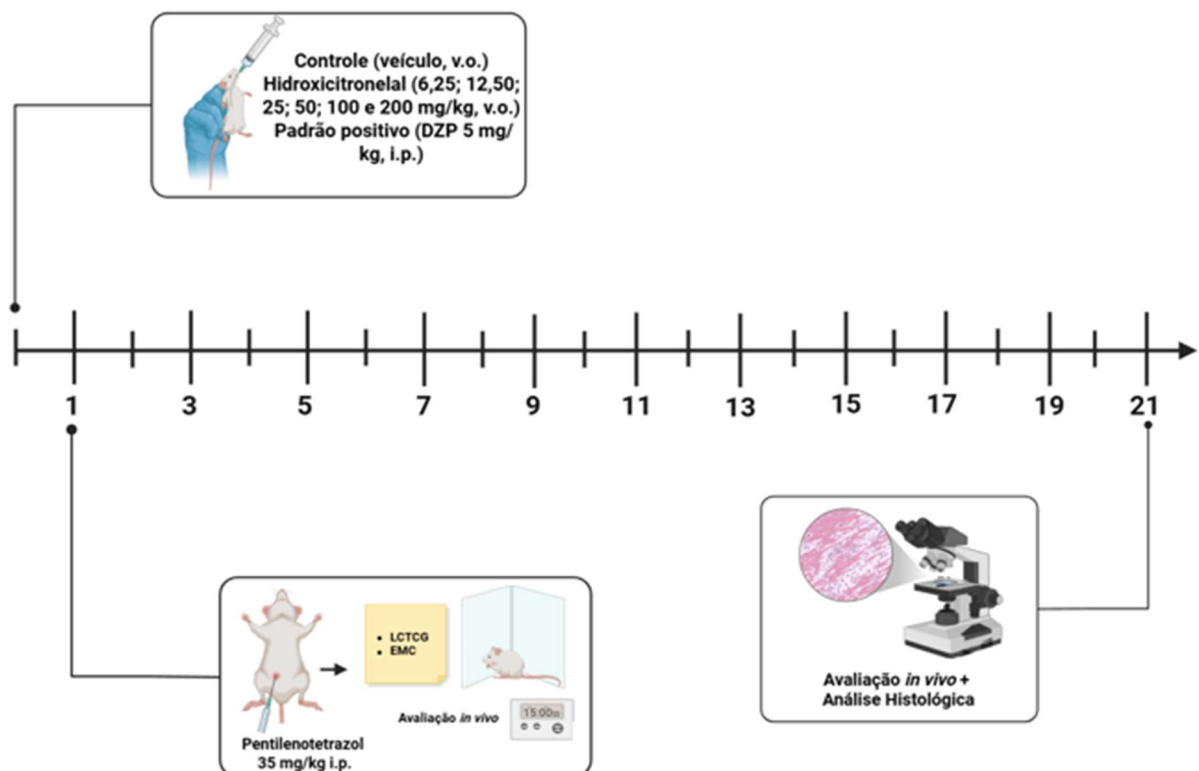


Imagem: feito com o Biorender.com.

Descrição: o esquema mostra o design experimental do modelo do abrasamento químico, no qual os animais receberam, em dias alternados (dias ímpares), administrações de PTZ 35 mg/kg para indução de epileptogênese durante 21 dias e foram avaliados por 15 minutos. Ao final, foram eutanasiados e os encéfalos foram coletados para a análise histológica.

Legenda: LCTCG: Latência para a Primeira Crise Epiléptica Tônico-Clônica Generalizada; EMC: Estágio Médio de Convulsão.

Fonte: autor (2025).

4.2.7. Análise histológica dos encéfalos de animais submetidos ao *kindling*

As análises histopatológicas dos encéfalos foram realizadas em parceria com o Laboratório de Patologia Geral da UFPB. Os animais submetidos ao modelo de abrasamento químico (*kindling*) que sobreviverem ao protocolo subcrônico foram eutanasiados e, posteriormente, seus encéfalos foram coletados e conservados em solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato – PBS (pH 7,4) para posteriores análises histológicas do parênquima cerebral. a fim de se avaliar uma possível ação do HC 100 mg/kg na diminuição do dano gerado na indução da epileptogênese, em comparação com o grupo tratado apenas com o veículo, com o grupo padrão (DZP 5 mg/kg) e com o grupo basal. Cortes sagitais foram feitos em intervalos de 1 mm, obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares.

Para o estudo microscópico, secções do hipocampo de 4 μ M foram feitas, coradas em hematoxilina e eosina (HE) e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 40x. Os campos foram analisados quanto ao tamanho, forma e afinidade tintorial dos neurônios e quanto à presença ou ausência de reação glial (Monteiro *et al.*, 2024).

4.2.8. Tratamento estatístico dos dados

A normalidade e a homogeneidade dos dados foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e de Brown Forsythe, respectivamente. Para os dados paramétricos, foi feita a Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida do teste de Tukey. Para os dados não-paramétricos, utilizaremos o teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ou como mediana e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo *in silico*

5.1.1. Docking molecular

No estudo computacional, foi possível observar que o hidroxicitronelal (HC) apresenta interação molecular satisfatória com alguns alvos relacionados com a fisiopatologia e com a farmacoterapia da epilepsia, como mostra a tabela 2.

No docking molecular, os três parâmetros considerados (*Plants Score*, *Rerank Score* e *Moldock Score*) possuem métricas diferentes para análise da interação molecular entre a molécula e os alvos proteicos. Dessa forma, os melhores alvos foram selecionados considerando a somatória dos parâmetros, através da normalização dos dados, a qual foi feita por meio do cálculo do *consensus*. Analisando o *consensus*, consideramos como melhores interações aquelas em que o valor foi superior a 0,50. Assim, os alvos moleculares em que o HC interagiu de maneira mais satisfatória, em comparação ao fármaco padrão correspondente, foram os seguintes: NMDAR, SV2A, Cav 1.2, KCNQ2, Nav 1.6 e GABA_A, como é possível observar na tabela 2.

Tabela 2. Valores de *Score* e *consensus* para as simulações *in silico* de interação molecular entre o HC e possíveis alvos farmacológicos.

Alvos	Ligantes	Plants Score	Plants Cons.	ReRank Score	ReRank Cons.	Moldock Score	Moldock Cons.	Cons.
AMPAR	Perampanel	-605.38	1.00	-150.12	1.00	-132.65	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-148.39	0.25	-86.38	0.58	-73.00	0.55	0.46
Ca _v 1.2	Gabapentina	-549.49	1.00	-81.14	1.00	-77.96	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-259.12	0.47	-47.75	0.59	-50.52	0.65	0.57
GABA _A	Flumazenil	-546.16	1.00	-102.67	1.00	-81.88	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-184.42	0.34	-60.49	0.59	-50.32	0.61	0.51
GABA _A	Fenobarbital	-553.05	1.00	-71.49	1.00	-66.86	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-198.91	0.36	-44.59	0.62	-41.04	0.61	0.53
GABA _A	Diazepam	-563.75	1.00	-118.60	1.00	-100.68	1.00	1.00

	Hidroxicitronelal	-169.24	0.30	-63.17	0.53	-55.85	0.55	0.46
GAT-1	Tiagabina	-549.70	1.00	-102.64	1.00	-84.28	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-156.36	0.28	-49.71	0.48	-43.82	0.52	0.43
KCNQ2	Retigabina	-563.92	1.00	-85.70	1.00	-79.22	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-194.60	0.35	-59.38	0.69	-52.19	0.66	0.57
Nav1.6	Fenitoína	-554.59	1.00	-91.05	1.00	-72.63	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-159.90	0.29	-50.22	0.55	-47.01	0.65	0.50
NMDAR	Felbamato	-530.95	1.00	-85.31	1.00	-75.16	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-244.95	0.46	-60.36	0.71	-51.01	0.68	0.62
SV2A	Levetiracetam	-542.28	1.00	-62.39	1.00	-53.29	1.00	1.00
	Hidroxicitronelal	-303.22	0.56	-46.08	0.74	-47.74	0.90	0.73

Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.1.1.1. Participação da via GABAérgica

Em relação às interações químicas com os alvos, para o receptor GABA_A, o HC apresentou várias interações moleculares com resíduos de aa. do alvo (quadro 2).

Em relação ao alvo 6X3U, em comparação com o flumazenil, os resíduos de aminoácidos que tanto o HC como o padrão interagiram foram os seguintes: Phe77, Tyr160, Tyr210, His102 e Ser206. Já para o alvo 6X3W, em comparação ao fenobarbital, as interações similares foram com os resíduos Leu223 e Pro228.

Por fim, para o alvo 6X3X, em relação ao diazepam, foram com os seguintes aa.: Met227, Leu231 e Phe304. Também é possível observar que o HC não possui nenhuma interação desfavorável com o alvo GABA_A para nenhuma das conformações avaliadas.

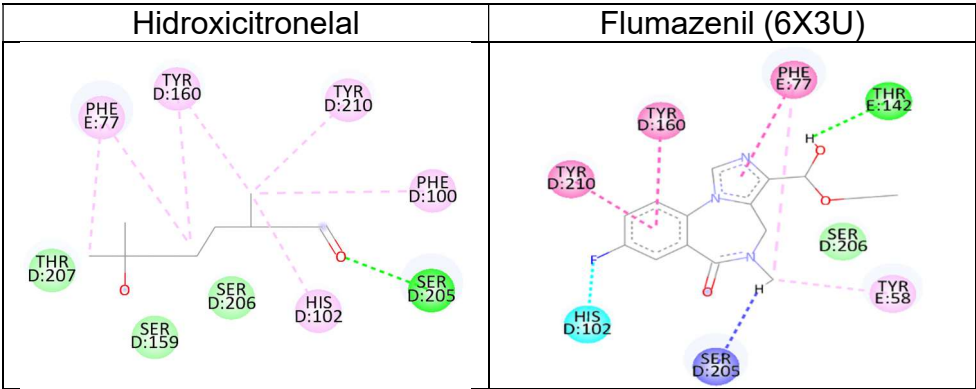
Considerando a similaridade entre as interações com os vários resíduos de aa. elencados e os valores de energia livre e *Score*, é possível concluir que a via GABAérgica pode ser um importante alvo farmacológico para o HC. Na figura 7, é possível observar cada interação em mais detalhes.

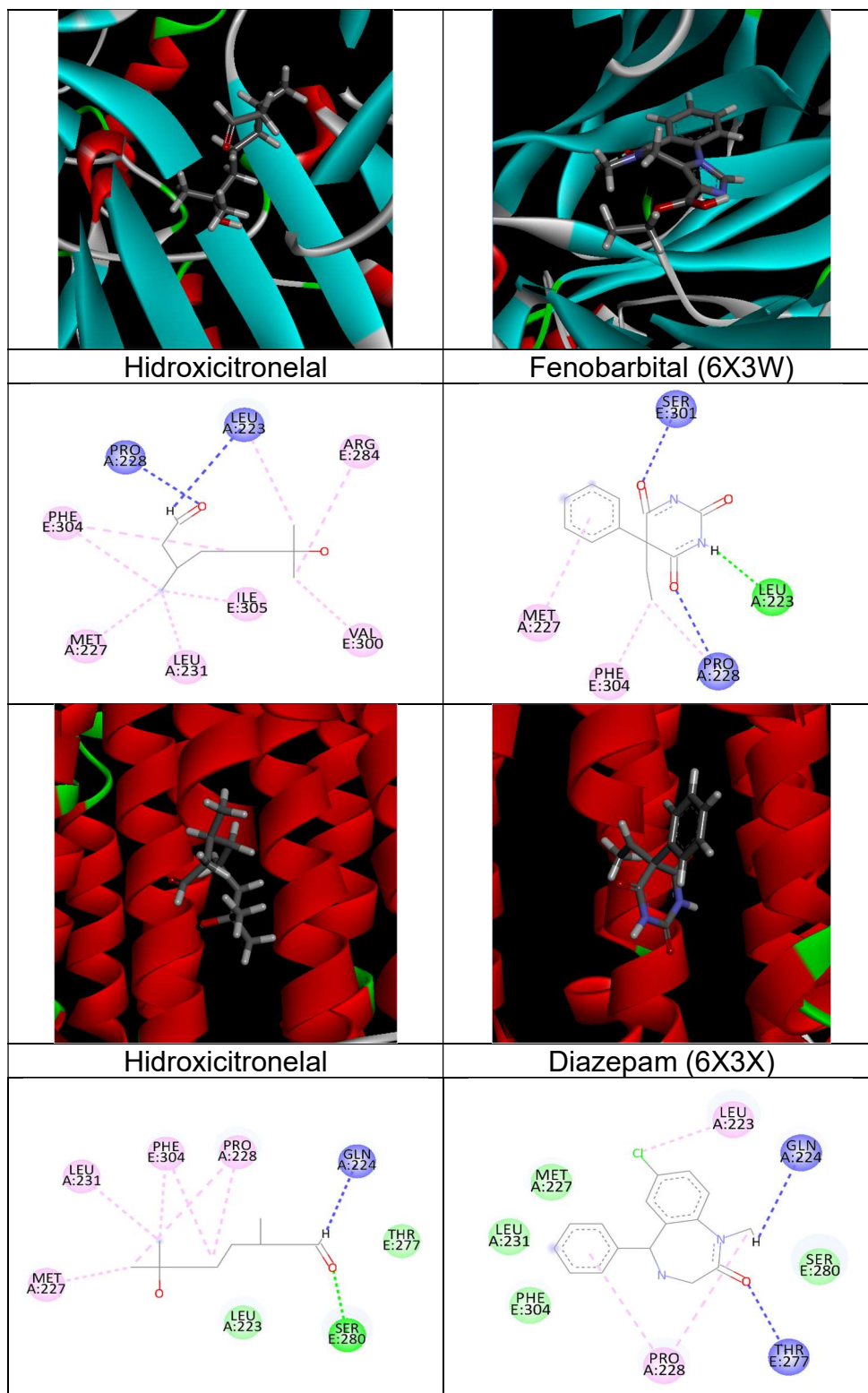
Quadro 2. Interações químicas com resíduos de aminoácido do receptor GABA_A.

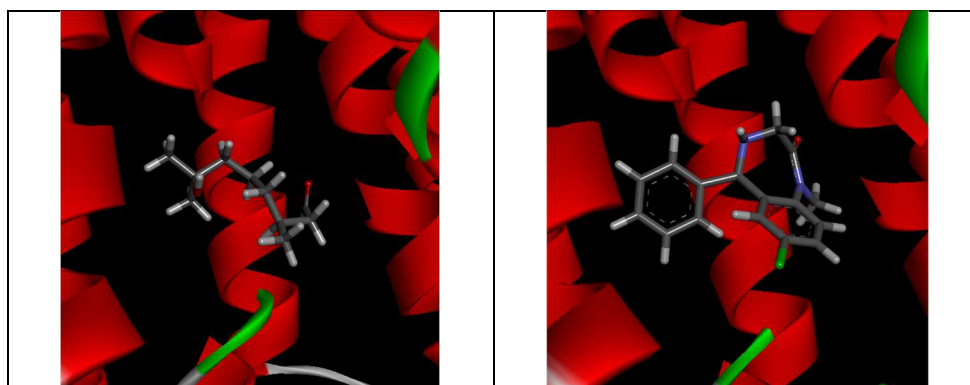
Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Halogênio	Não-favorável
GABA_A (6X3U)							
Flumazenil	Tyr58	Phe77, Tyr160, Tyr210	Thr142	Ser205	Ser206	His102	-
Hidroxicitronelal	Phe 77, Tyr 160, Tyr 210, Phe 100, His102	-	-	-	Ser159, Ser206, Thr207	-	-
GABA_A (6X3W)							
Fenobarbital	Pro228, Met227, Phe304	-	Leu223	Pro228, Ser301			-
Hidroxicitronelal	Met227, Leu231, Arg284, Val300, Phe304 Ile305	-	-	Leu223, Pro228	-	-	-
GABA_A (6X3X)							
Diazepam	Leu223, Pro228	-	-	Gln224, Thr277	Met227, Leu231, Ser280, Phe304	-	-
Hidroxicitronelal	Met227, Pro228, Leu231, Phe304	-	Ser280	Gln224	Leu223, Thr277	-	

Fonte: autor (2025).

Figura 7. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o receptor GABA_A em diferentes posições em comparação com os padrões positivos.







Legenda dos tipos de interação química:

	van der Waals		Conventional Hydrogen Bond		Carbon Hydrogen Bond
	Salt Bridge		Pi-Pi Stacked		Halogen (Cl, Br, I)
	Pi-Alkyl		Unfavorable Bump		

Fonte: autor (2025).

5.1.1.2. Participação do canal de potássio (Kv 2.7 – KCNQ2)

Para a via KCNQ2, o HC apresentou interação satisfatória no *docking* molecular em comparação à retigabina. Quando comparado ao fármaco retigabina em relação às possíveis interações com os resíduos de aa. para o alvo KCNQ2, o HC demonstrou interações similares para os resíduos Pro308, Phe240 e Trp236 (quadro 3). Também é possível observar que o HC não possui nenhuma interação desfavorável com o alvo KCNQ2.

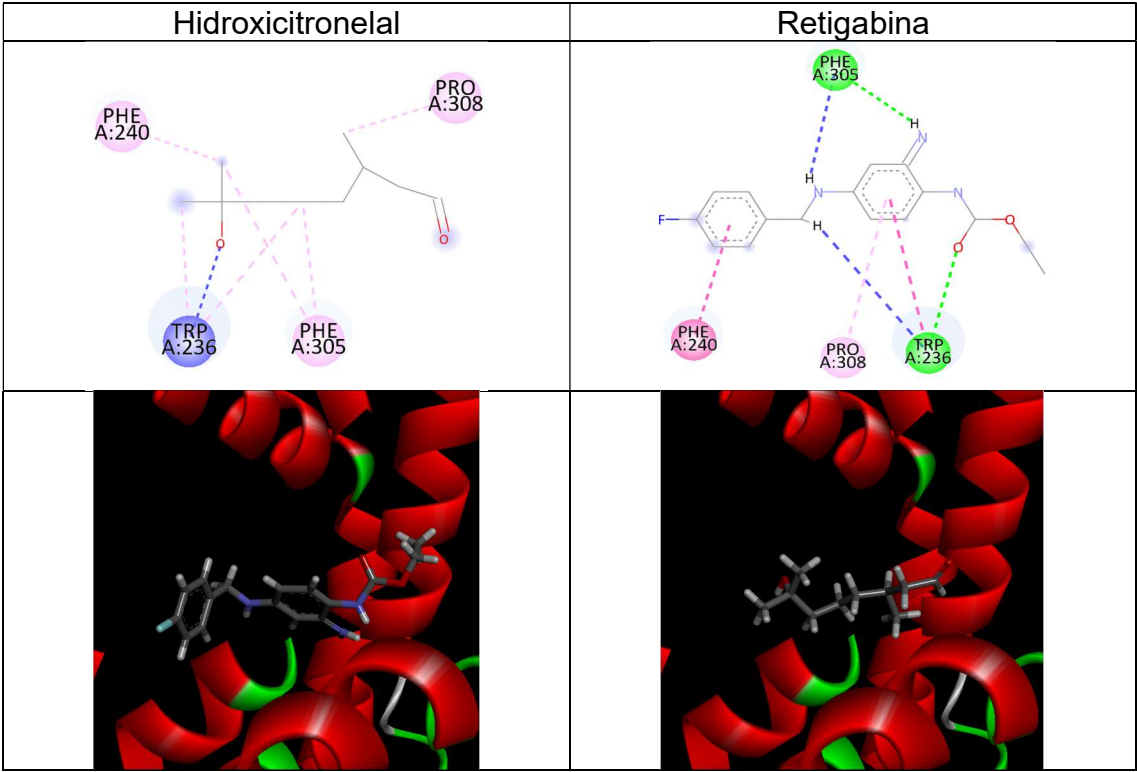
Quadro 3. Interações químicas com resíduos de aminoácido do canal KCNQ2.

Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Salt-bridge	Não-favorável
KCNQ2							
Retigabina	Pro308	Trp236, Phe240	Trp236, Phe305	Trp236, Phe305	-	-	-
Hidroxicitronelal	Phe240, Phe305, Pro308	-	-	Trp236	-	-	-

Fonte: autor (2025).

Dessa forma, é possível concluir que a via do canal de potássio KCNQ2 pode ser um importante alvo farmacológico para o HC. Na figura 8, é possível observar cada interação 2D e 3D em mais detalhes.

Figura 8. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o Canal de Potássio (KCNQ2) em comparação com a retigabina.



Legenda dos tipos de interação química:

van der Waals	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
Salt Bridge	Pi-Pi Stacked	Halogen (Cl, Br, I)
Pi-Alkyl	Unfavorable Bump	

Fonte: autor (2025).

5.1.1.3. Participação do canal de cálcio (Cav 1.2)

O canal Cav1.2 pode ser um dos alvos envolvidos no possível efeito do HC, uma vez que o HC apresenta ligações similares para os resíduos de aa. Trp207, Trp245, Tyr219, Tyr452 e Leu456, como mostra o quadro 4, apresentando apenas uma ligação química não-favorável com o alvo.

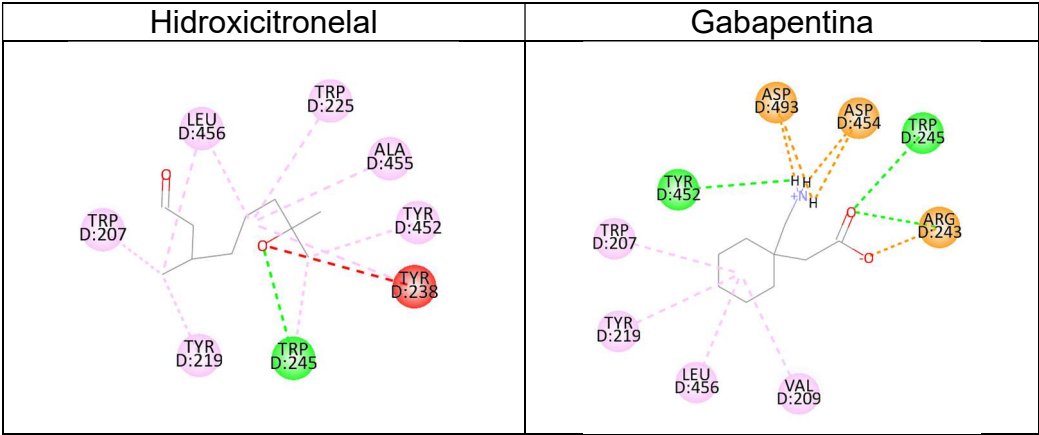
Quadro 4. Interações químicas com resíduos de aminoácido do canal Cav1.2.

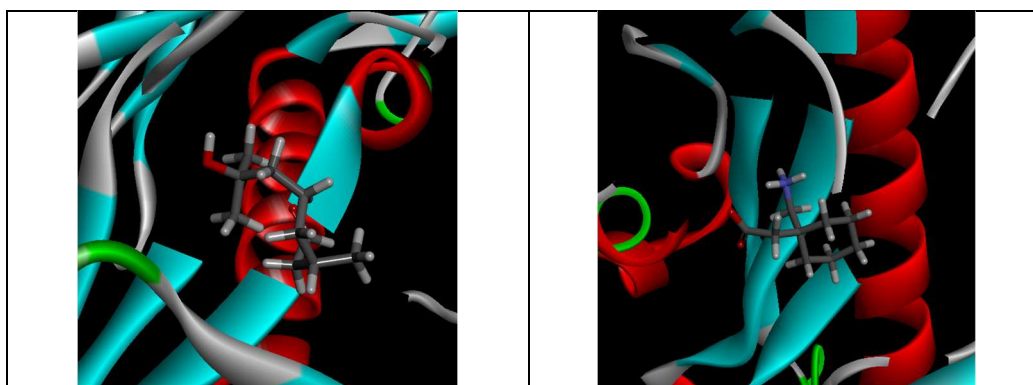
Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Salt-bridge	Não-favorável
Cav1.2							
Gabapentina	Trp207, Val209, Tyr219, leu456	-	Trp245, Tyr452	-	-	Arg243, Asp454, Asp493	-
Hidroxicitronelal	Trp207, Tyr219, Trp225, Tyr238, Tyr245, Tyr452, Ala455, Leu456	-	Trp245	-	-		Tyr238

Fonte: autor (2025).

É possível observar que o HC consegue interagir com importantes resíduos de aa. do alvo Cav1.2. Na figura 9, é possível observar cada interação 2D e 3D em mais detalhes.

Figura 9. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o Canal de Cálcio (Cav 1.2) em comparação com a Gabapentina.





Legenda dos tipos de interação química:

 van der Waals	 Conventional Hydrogen Bond	 Carbon Hydrogen Bond
 Salt Bridge	 Pi-Pi Stacked	 Halogen (Cl, Br, I)
 Pi-Alkyl	 Unfavorable Bump	

Fonte: autor (2025).

5.1.1.4. Participação do canal de sódio (Nav 1.6)

Para o canal de sódio Nav1.6 o HC apresentou interação satisfatória no docking molecular, como é possível visualizar nos valores de *Moldock Score* em relação ao padrão fenitoína. Em relação às interações químicas (quadro 5), o HC apresentou interação com resíduos de aa. que coincidem com as interações da fenitoína para os seguintes resíduos: Val1757, Phe1754 e Ser1753. Além disso, não foi observada nenhuma interação química desfavorável com o alvo em questão.

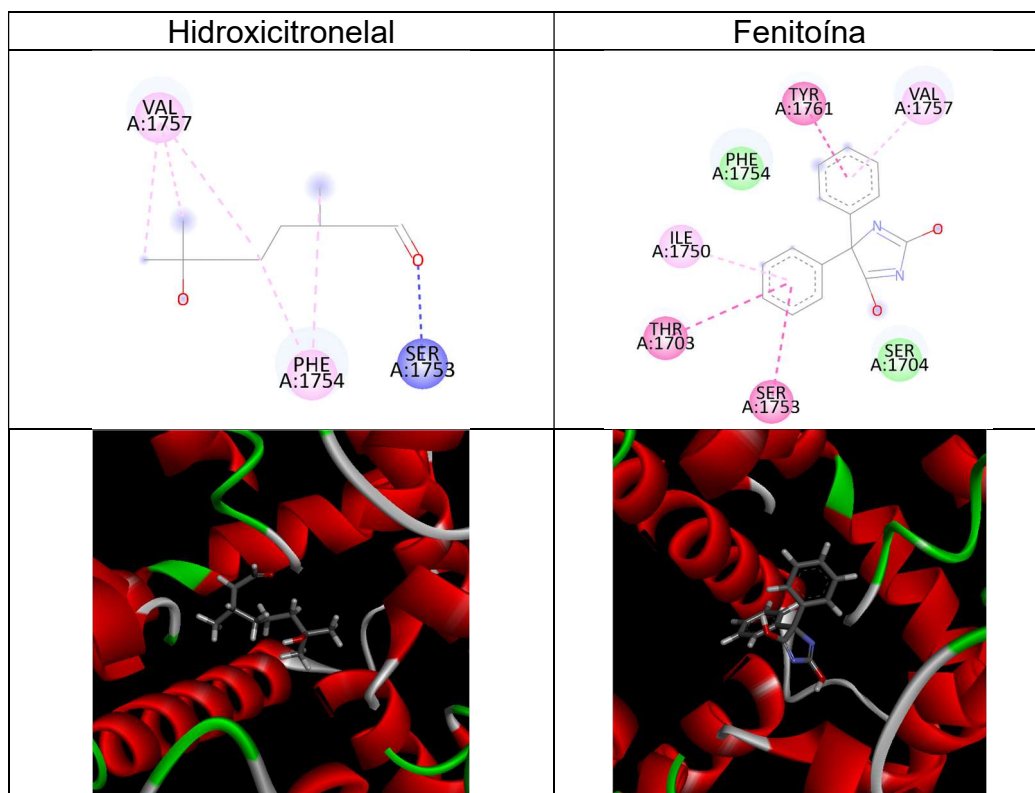
Quadro 5. Interações químicas com resíduos de aminoácido do canal Nav1.6.

Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Não-favorável
Fenitoína	Ile1750, Val1757	Thr1703, Ser1753, Tyr1761	-	-	Ser1704, Phe1754	-
Hidroxicitronelal	Phe1754, Val1757	-	-	Ser1753	-	-

Fonte: autor (2025).

Na figura 10, é possível observar as interações químicas com os resíduos de aa. em comparação com o fármaco padrão fenitoína, na qual é possível verificar a ausência de interações químicas desfavoráveis.

Figura 10. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o Canal de Sódio (Nav 1.6) em comparação com a Fenitoína.



Legenda dos tipos de interação química:

 van der Waals	 Conventional Hydrogen Bond	 Carbon Hydrogen Bond
 Salt Bridge	 Pi-Pi Stacked	 Halogen (Cl, Br, I)
 Pi-Alkyl	 Unfavorable Bump	

Fonte: autor (2025).

5.1.1.5. Participação da via glutamatérgica

No docking molecular, foi possível verificar que, para a via glutamatérgica, o HC possui melhor interação com o receptor NMDA. Em relação às interações químicas, o HC apresentou interação similar com vários resíduos de aa. do AMPA e do NMDA, como mostra o quadro 6. Para o receptor AMPA, as interações coincidentes

entre HC e perampanel foram com os resíduos Leu620, Phe623, Val792, Asn791 e Asn619, sem interações desfavoráveis. Já para o receptor NMDA, tanto o HC como o felbamato interagiram com os resíduos Ala650, Ala652 e Thr646.

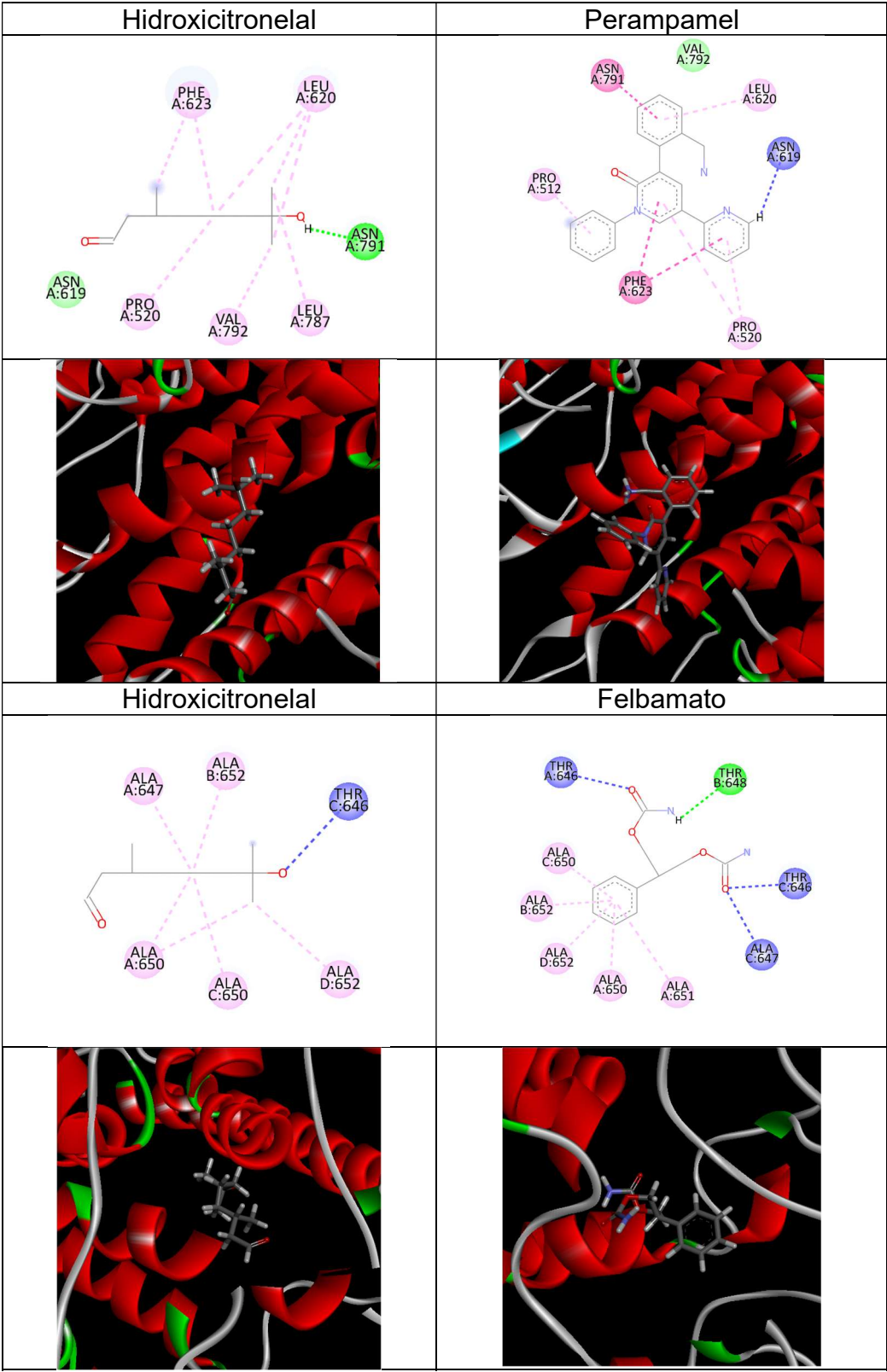
Quadro 6. Interações químicas com resíduos de aminoácido dos receptores AMPA e NMDA.

Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Não-favorável
AMPA						
Perampanel	Pro512, Pro520, Leu620	Phe623, Asn791	-	Asn619	Val792	-
Hidroxicitronelal	Pro520, Leu620, Phe623, Leu787, Val792	-	Asn791	-	Asn619	-
NMDAR						
Felbamato	Ala650, Ala651, Ala652	-	Thr648	Thr646, Ala647	-	-
Hidroxicitronelal	Ala647, Ala650, Ala652	-	-	Thr646	-	-

Fonte: autor (2025).

Assim, é possível observar que o HC consegue interagir com importantes resíduos de aa. do alvo Cav1.2. Na figura 11, é possível observar cada interação 2D e 3D em mais detalhes.

Figura 11. Interações moleculares 2D e 3D do HC com os receptores AMPA e NMDA em comparação com o Perampamel e o Felbamato, respectivamente.



Legenda dos tipos de interação química:

 van der Waals	 Conventional Hydrogen Bond	 Carbon Hydrogen Bond
 Salt Bridge	 Pi-Pi Stacked	 Halogen (Cl, Br, I)
 Pi-Alkyl	 Unfavorable Bump	

Fonte: autor (2025).

5.1.1.6. Participação da Proteína Vesicular Sináptica 2A (SV2A)

Em relação a proteína vesicular sináptica 2ª (SV2A), o HC apresentou bom comportamento no *docking* molecular, quando comparado ao fármaco padrão levetiracetam. Em relação a interação química (quadro 7) entre o composto e os resíduos de aa específicos, é possível observar que o HC não apresentou nenhuma interação desfavorável que limitasse a sua ação por essa via e que os resíduos Cys297, Trp300, Trp461, Trp666 e Asp670 foram pontos de interação tanto para o HC como para o padrão positivo.

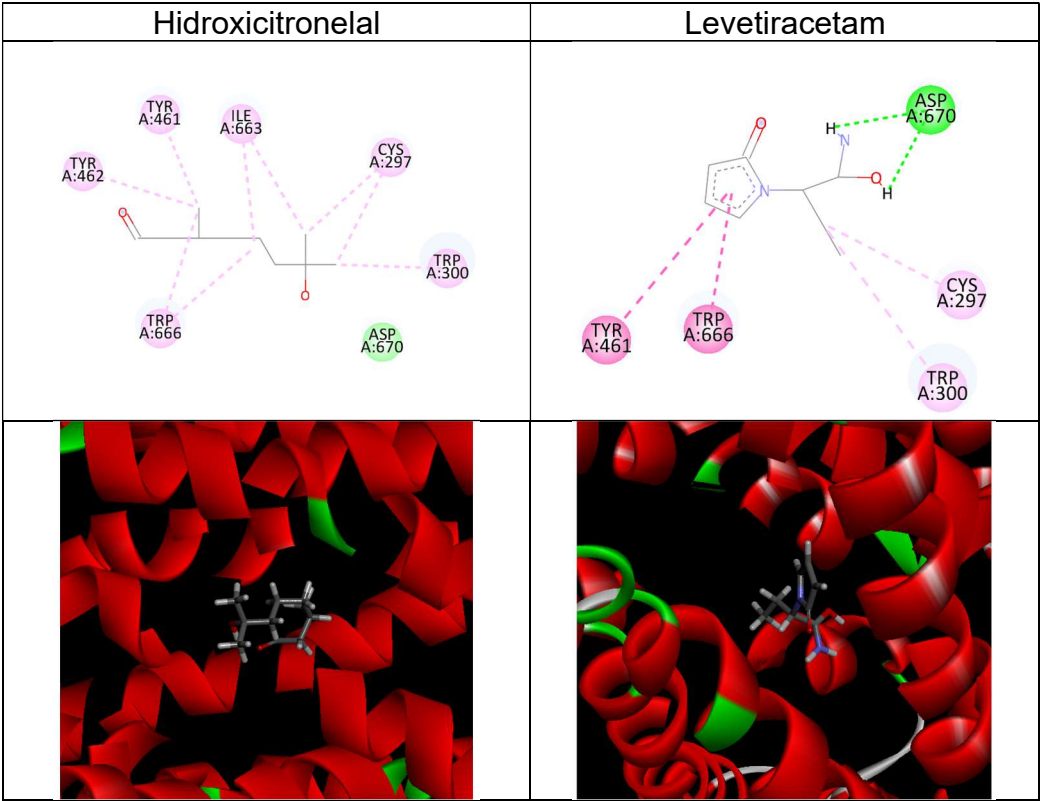
Quadro 7. Interações químicas com resíduos de aminoácido da SV2A.

Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Não-favorável
SV2A						
Levetiracetam	Cys297, Trp300	Tyr461, Trp666	Asp670	-	-	-
Hidroxicitronelal	Cys297, Trp300, Tyr461, Tyr462, Ile663, Trp666	-	-	-	Asp670	-

Fonte: autor (2025).

Na figura 12, é possível observar as interações 2D e 3D com a proteína SV2A em comparação ao fármaco levetiracetam em detalhes.

Figura 12. Interações moleculares 2D e 3D do HC com a proteína SV2A em comparação com o Levetiracetam.



Legenda dos tipos de interação química:

van der Waals	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
Salt Bridge	Pi-Pi Stacked	Halogen (Cl, Br, I)
Pi-Alkyl	Unfavorable Bump	

Fonte: autor (2025).

5.1.1.7. Participação do Transportador de GABA do tipo 1 (GAT-1)

Em relação ao alvo GAT-1, o HC não apresentou valores tão satisfatórios no *docking* molecular, porém, alguns resíduos de aa. com os quais o composto interagiu coincidiram com os da tiagabina (quadro 8), a saber: Cys399, Gly63, Gly65 e Leu306. Ademais, o HC apresentou uma interação desfavorável com o resíduo Tyr60.

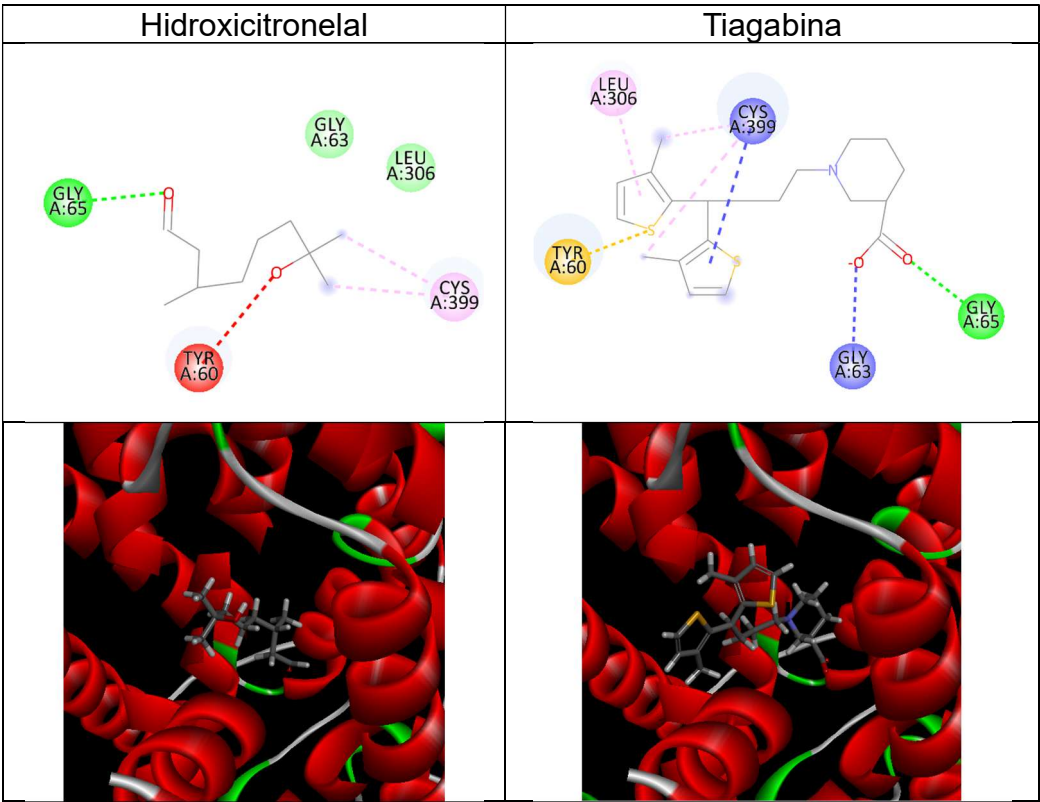
Quadro 8. Interações químicas com resíduos de aminoácido do GAT-1.

Ligante	Pi-alquila	Empilhamento pi-pi	Ligação de hidrogênio	Ligação carbono-hidrogênio	Van der Waals	Salt-bridge	Não-favorável
GAT-1							
Tiagabina	Leu306	-	Gly65	Gly63, Cys399	-	Tyr60	-
Hidroxicitronelal	Cys399	-	Gly65	-	Gly63, Leu306	-	Tyr60

Fonte: Autor (2025).

A seguir, é possível visualizar as interações 2D e 3D do HC com o GAT-1 em comparação ao fármaco tiagabina (figura 13).

Figura 13. Interações moleculares 2D e 3D do HC com o receptor GAT-1 em comparação com a tiagabina.



Legenda dos tipos de interação química:

- | | | |
|---|--|--|
|  van der Waals |  Conventional Hydrogen Bond |  Carbon Hydrogen Bond |
|  Salt Bridge |  Pi-Pi Stacked |  Halogen (Cl, Br, I) |
|  Pi-Alkyl |  Unfavorable Bump | |

Fonte: autor (2025).

5.2. Estudo *in vivo*

5.2.1. Toxicidade oral aguda (OECD nº 423)

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos, grupo controle (veículo) e experimental (HC 300 mg/kg). Na observação das alterações comportamentais gerais e das manifestações autonômicas e tóxicas durante as primeiras 4 horas de experimento, os animais do grupo HC 300 mg/kg não apresentaram sinais de toxicidade, mas apresentaram analgesia, tremores finos e hipolocomoção leve em comparação ao grupo controle.

Decorridas as 4 horas iniciais, os animais seguiram em observação por 14 dias seguidos, não tendo sido observada nenhuma alteração comportamental geral no grupo HC 300 mg/kg, em relação ao grupo controle (veículo). Passados os 14 dias de observação, os animais foram eutanasiados e alguns órgãos (encéfalo, fígado, coração, estômago, rins e baço) foram removidos para análise macroscópica, não tendo sido detectada qualquer alteração em comparação ao grupo controle.

De acordo com fluxograma contido no protocolo n.º 423 da OECD (2001) para análise de toxicidade oral aguda (anexo 2), caso não houvesse nenhuma morte, ou apenas um animal viesse a óbito durante o experimento com a dose inicial (300 mg/kg), a dose mais alta poderia ser testada (2.000 mg/kg). Dessa forma, dois grupos (controle – veículo e HC 2.000 mg/kg) foram avaliados seguindo os mesmos parâmetros da dose de 300 mg/kg, com o objetivo de enquadrar o HC em uma faixa de toxicidade quando administrado por via oral.

Durante as primeiras 4 horas de experimento, os animais do grupo HC 2.000 mg/kg apresentaram sinais como analgesia, hipolocomoção e tremores finos e grosseiros. Passadas as primeiras 4 horas, nos 14 dias que se seguiram não foi possível observar qualquer alteração comportamental entre o grupo experimental e o controle.

Como não houve mortes em nenhum grupo que recebeu o HC (300 ou 2.000 mg/kg v.o), foi possível classificar o HC como substância de baixa toxicidade (anexo 2), como estabelece o protocolo n.º 423. Durante todo o experimento, o peso dos animais foi avaliado para uma posterior análise ponderal, a fim de se detectar alguma diferença significativa em comparação com o grupo controle na evolução ponderal

(tabela 3). O consumo de água e ração foi controlado, tendo todos os grupos recebido a mesma quantidade de água e ração durante todos os dias de tratamento.

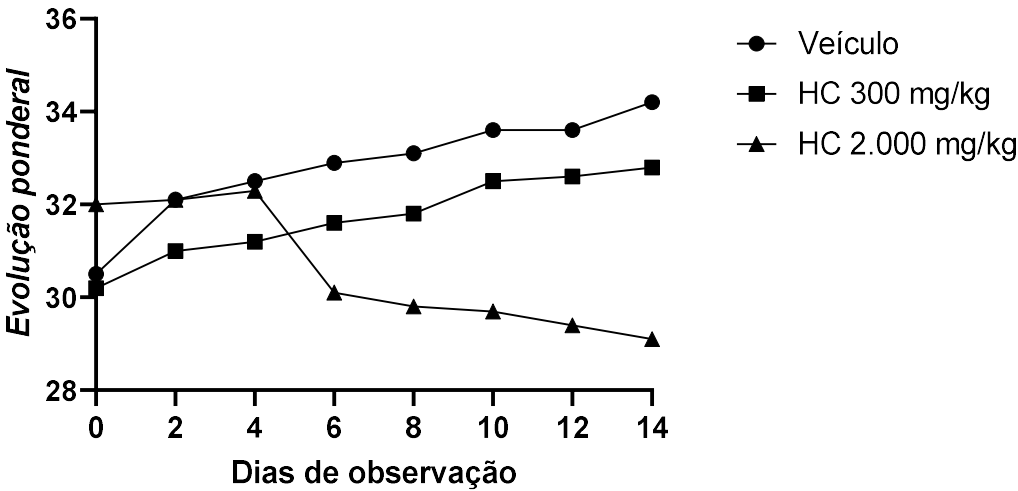
No estudo, foi possível verificar que os grupos controle (veículo) e HC 300 mg/kg apresentaram ganho de peso durante os 14 dias de tratamento com o HC, enquanto o grupo que recebeu a maior dose do protocolo (2.000 mg/kg) - mesmo sem consumir menos água ou ração (o consumo foi controlado), apresentou perda de peso em comparação aos demais grupos tratados, como mostra o gráfico 1 com a evolução ponderal comparada entre os três grupos.

Tabela 3. Pesos dos animais por dia de experimento no protocolo da OECD.

Dia	Grupos experimentais											
	Veículo				HC 300 mg/kg				HC 2.000 mg/kg			
	A1	A2	A3	Média	A1	A2	A3	Média	A1	A2	A3	Média
0	30,1	34,0	30,5	30,5	28,6	31,5	30,5	30,2	33,0	32,6	29,1	32,0
2	32,0	33,4	31,0	32,1	28,8	32,0	32,1	31,0	33,2	33,1	30,0	32,1
4	33,1	34,0	30,4	32,5	28,6	32,5	32,5	31,2	33,5	33,2	30,2	32,3
6	33,6	34,3	30,7	32,9	29,2	32,7	32,9	31,6	32,1	33,5	30,4	30,1
8	33,1	34,7	31,5	33,1	29,0	33,1	33,2	31,8	29,4	33,8	30,1	29,8
10	34,0	35,0	31,8	33,6	30,2	33,5	33,7	32,5	29,8	34,3	28,4	29,7
12	34,2	35,2	31,5	33,6	28,8	33,8	34,2	32,6	29,5	34,2	26,3	29,4
14	34,5	35,0	33,0	34,2	28,6	34,0	35,0	32,8	28,0	34,2	26,0	29,1

Fonte: dados da pesquisa (2025).

Gráfico 1. Evolução ponderal dos grupos durante o protocolo da OECD.



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise da evolução ponderal dos animais que receberam o hidroxycitronelal por 14 dias consecutivos. No gráfico, é representada a média de cada grupo por dia de observação.

Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.2.2. Efeitos antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxicitronelal no modelo agudo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol

Após a análise da toxicidade e a classificação do HC como substância de baixa toxicidade, as doses experimentais iniciais foram definidas em 10, 5 e 2,5 % da dose máxima testada no protocolo da OECD (2.000 mg/kg), sendo, portanto, as doses de 200, 100 e 50 mg/kg selecionadas para início dos testes com o HC. A partir daí e tendo sido observada uma manutenção dos efeitos mesmo na menor dose, outras doses foram utilizadas com o intuito de construir uma curva dose-resposta do efeito antiepiléptico e neuroprotetor no modelo agudo de crises epiléticas induzidas por PTZ (25, 12,5 e 6,25 mg/kg).

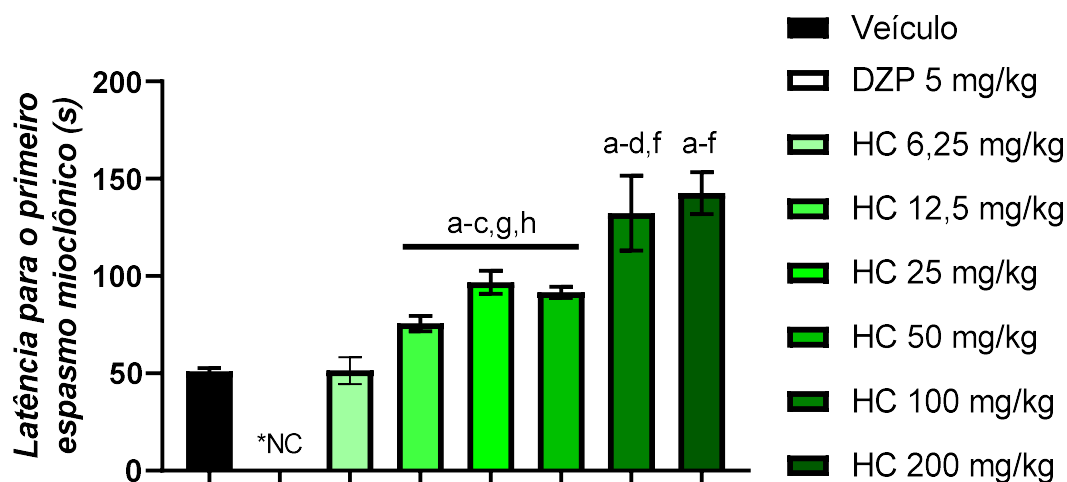
No modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ, os animais foram avaliados quanto a quatro parâmetros: Latência para o primeiro espasmo mioclônico; latência para a primeira crise tônico-clônica generalizada; duração das crises; e latência para morte.

5.2.2.1. Efeito do HC sobre a Latência para o Primeiro Espasmo Mioclônico (LPE)

No LPE, todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao grupo controle ($51,00 \pm 1,23$ s), com exceção da dose de 6,25 mg/kg ($51,50 \pm 6,90$ s), que não apresentou diferença do controle e, portanto, foi a menor dose testada, como é possível verificar no gráfico 2. As doses de 200 ($142,70 \pm 10,77$ s) e 100 mg/kg ($132,30 \pm 19,19$ s) não apresentaram diferença estatística entre si, apresentando o mesmo efeito em relação ao controle, com aumento percentual de 179,8 e 159,4 %, respectivamente.

As doses mais baixas (50, 25 e 12,5 mg/kg) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($91,67 \pm 2,84$; $96,83 \pm 5,97$; $75,67 \pm 4,00$ s, respectivamente), com aumento percentual de 79,7, 89,7 e 48,4 % em relação ao controle, mas também apresentaram diferença em relação às maiores doses (100 e 200 mg/kg). O grupo que recebeu DZP 5 mg/kg, entretanto, não apresentou crises epiléticas, sendo, portanto, diferente de todos os outros grupos testados. Dessa forma, a melhor dose avaliada neste parâmetro foi a dose de 100 mg/kg.

Gráfico 2. Efeito do HC sobre a Latência para o Primeiro Espasmo Mioclônico.



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise do efeito do hidroxycitronelal na latência para o primeiro espasmo mioclônico. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Legenda: *NC = não convulsionou.

Fonte: dados da pesquisa (2025).

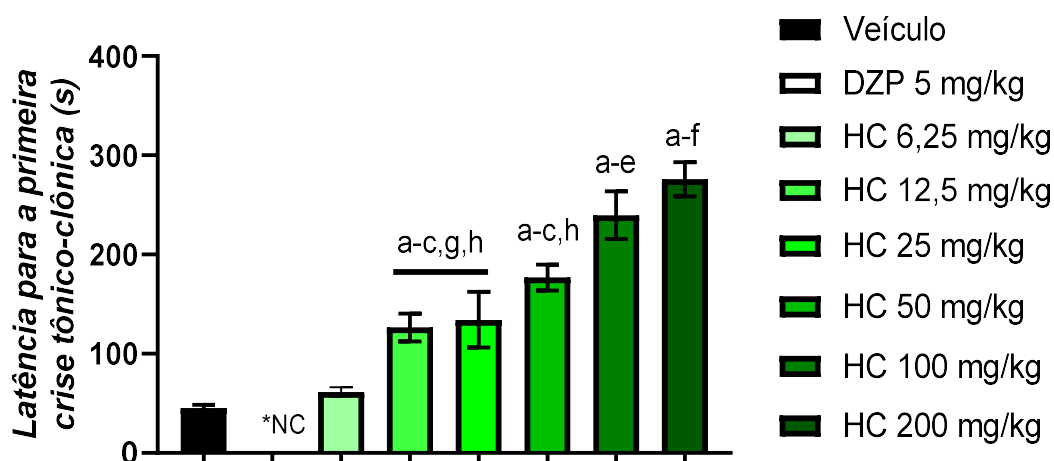
5.2.2.2. Efeito do HC sobre a Latência para a Primeira Crise Tônico-Clônica Generalizada (LCTCG)

De forma similar, no parâmetro LCTCG, os grupos experimentais que receberam o HC em todas as doses apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($45,17 \pm 3,49$ s) (gráfico 3), com exceção da dose de 6,25 mg/kg ($61,50 \pm 4,50$ s), que serviu como ponto de perda do efeito do HC. Mais uma vez, os grupos que receberam as doses de 200 ($275,7 \pm 17,13$ s) e 100 mg/kg ($239,50 \pm 24,12$ s) não apresentaram diferença entre si, com aumento percentual de 510,4 e 430,2 % em relação ao controle, respectivamente.

As doses mais baixas (50, 25 e 12,5 mg/kg) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($167,70 \pm 13,14$; $134,20 \pm 27,90$; $126,30 \pm 14,10$ s, respectivamente) em relação ao controle, com aumento percentual de 271,3, 197,1 e 179,6 %, mas também apresentaram diferença em relação às doses de 100 e 200 mg/kg. O grupo que recebeu DZP 5 mg/kg, de maneira similar ao parâmetro anterior, não apresentou crises epiléticas, sendo, portanto, diferente de todos os outros

grupos testados. Dessa forma, a melhor dose avaliada neste parâmetro também foi a dose de 100 mg/kg.

Gráfico 3. Efeito do HC sobre a Latência para a Primeira Crise Tônico-Clônica Generalizada (LCTCG).



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise do efeito do hidroxycitronelal na latência para a primeira crise tônico-clônica generalizada. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Legenda: *NC = não convulsionou.

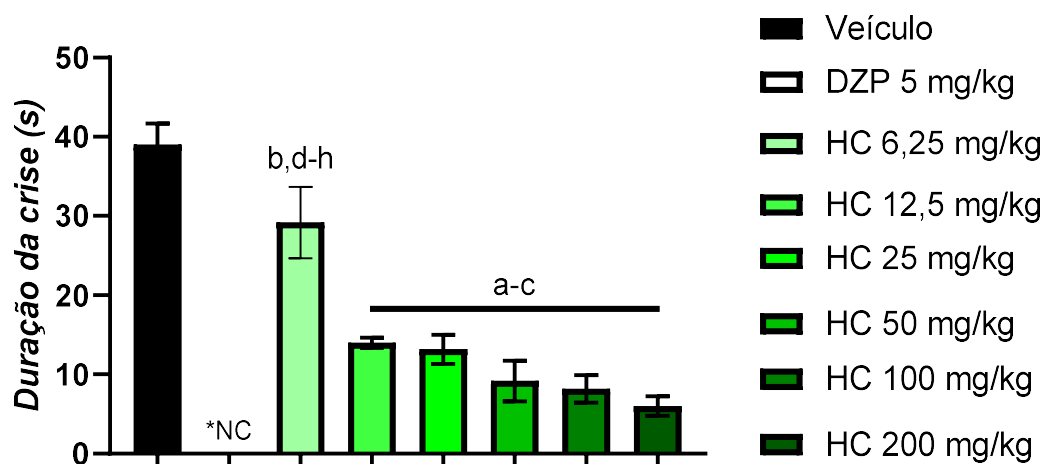
Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.2.2.3. Efeito do HC sobre a Duração das Crises (DC)

No parâmetro DC, todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($39,00 \pm 2,68$ s), com exceção do grupo que recebeu a dose de 6,25 mg/kg ($29,17 \pm 4,53$ s) (gráfico 4).

Os grupos de 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg/kg não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($6,00 \pm 1,21$; $8,17 \pm 1,74$; $9,17 \pm 2,56$; $13,17 \pm 1,87$; $14,00 \pm 0,63$ s, respectivamente), com redução percentual de 84,6, 79,1, 76,5, 66,2 e 64,1 %, respectivamente. O grupo que recebeu DZP 5 mg/kg ($0,00 \pm 0,00$ s), de maneira similar aos parâmetros anteriores, não apresentou crises epiléticas, sendo, portanto, diferente de todos os outros grupos testados.

Gráfico 4. Efeito do HC sobre a Duração das Crises (DC).



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise do efeito do hidroxicitronelal na duração das crises. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Legenda: *NC = não convulsionou.

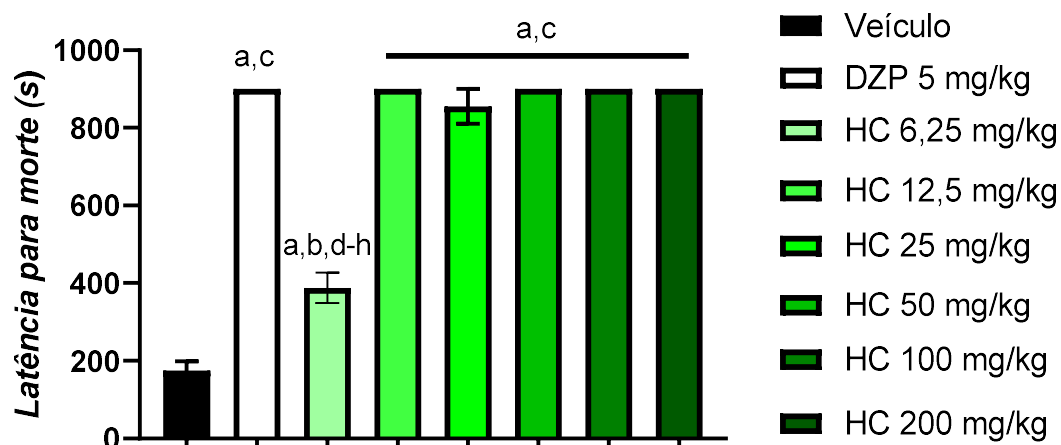
Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.2.2.4. Efeito do HC sobre a Latência para morte (LM)

Por fim, no parâmetro LM, todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle ($174,8 \pm 24,21$ s) (gráfico 5), uma vez que tanto o HC como o padrão DZP foram capazes de evitar que os animais morressem com a administração aguda de PTZ 85 mg/kg. As doses de 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg/kg ($900,00 \pm 0,00$; $900,00 \pm 0,00$; $900,00 \pm 0,00$; $855,00 \pm 45,00$; $900,00 \pm 0,00$ s) não houve diferença estatística quando comparadas entre si e com o padrão DZP 5 mg/kg ($900,00 \pm 0,00$ s), com aumentos percentuais de 514,9 % para as doses de 200, 100, 50 e 12,5 mg/kg e para o DZP 5 mg/kg.

Entretanto, a dose de 6,25 mg/kg ($388,20 \pm 29,21$ s), apesar de ter apresentado diferença estatística em relação ao controle, com aumento percentual de 122,1 %, foi a única que apresentou diferença em relação a todos os demais grupos testados, com menor efeito.

Gráfico 5. Efeito do HC sobre a Latência para Morte (LM).



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise do efeito do hidroxicitronelal na latência para morte. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

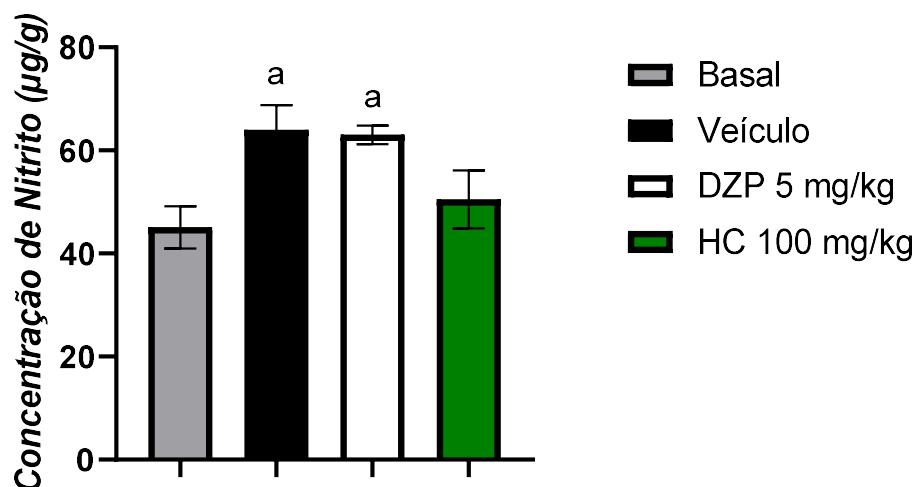
Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.2.3. Análises neuroquímicas

Em relação aos níveis de nitrito (gráfico 6), os animais que receberam apenas o veículo ($63,95 \pm 4,85 \mu\text{g/g}$) e os que receberam a droga padrão ($63,06 \pm 1,80 \mu\text{g/g}$) apresentaram aumento em relação ao grupo basal ($45,09 \pm 4,09 \mu\text{g/g}$) de 41,83 e 39,85 %, respectivamente. Entretanto, o grupo que recebeu o HC 100 mg/kg, v.o ($50,48 \pm 5,61 \mu\text{g/g}$) não apresentou diferença estatística nos níveis de nitrito após a administração aguda de PTZ 85 mg/kg em comparação ao basal.

Entretanto, quanto aos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (gráfico 7), os animais que receberam apenas o veículo ($5,05 \pm 0,84 \mu\text{g/g}$) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo basal ($4,16 \pm 1,22 \mu\text{g/g}$), enquanto os animais do grupo padrão ($14,79 \pm 2,73 \mu\text{g/g}$) e os do grupo que recebeu o HC 100 mg/kg, v.o ($10,72 \pm 1,94 \mu\text{g/g}$) apresentaram aumento nos níveis de GSH após a administração de PTZ 85 mg/kg, i.p, em comparação ao grupo basal, de 255,5 e 157,7 %, respectivamente.

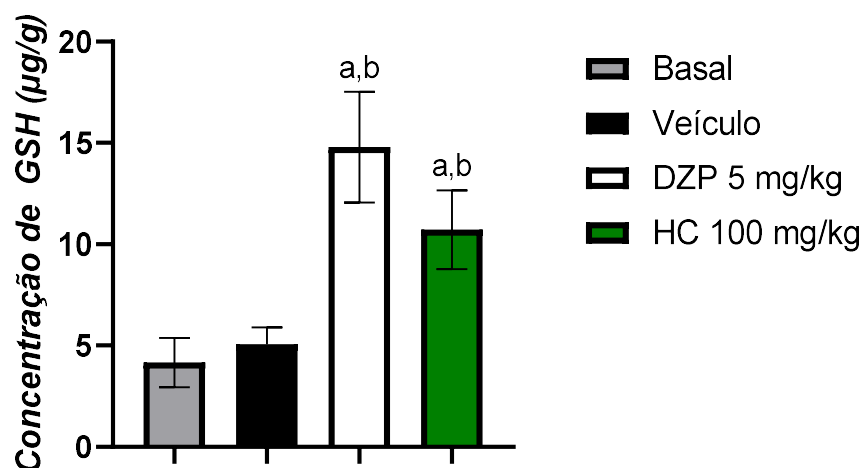
Gráfico 6. Concentração de nitrito ($\mu\text{g/g}$) nos hipocampus.



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise dos níveis de nitrito em homogenatos de hipocampo dos animais submetidos ao modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Fonte: dados da pesquisa (2025).

Gráfico 7. Concentração de GSH ($\mu\text{g/g}$) nos hipocampus.



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise dos níveis de GSH em homogenatos de hipocampo dos animais submetidos ao modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

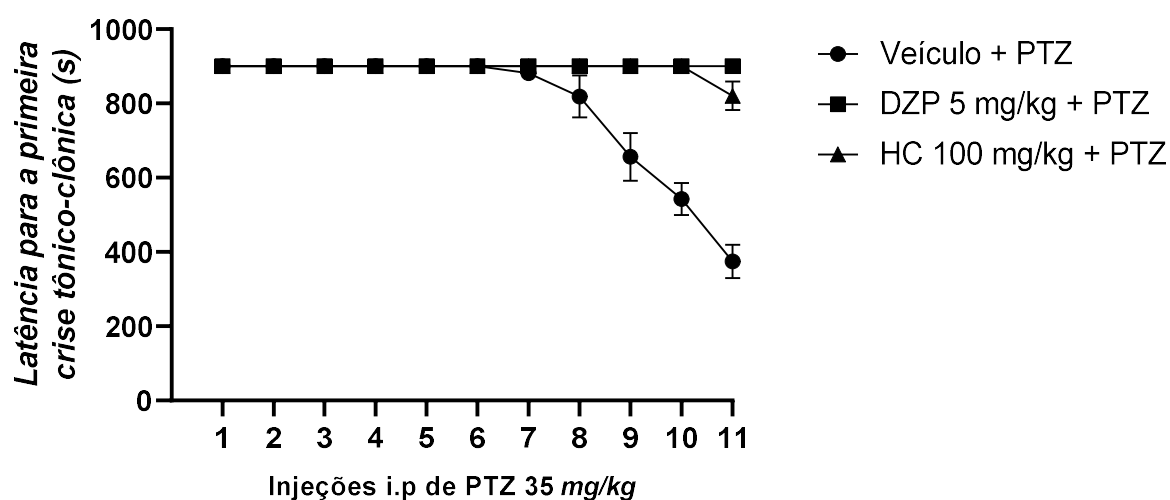
Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.2.4. Modelo do abasamento químico por PTZ (*kindling*)

A partir dos estudos iniciais para avaliar o efeito do HC no modelo de crises epilépticas induzidas por PTZ, a dose de 100 mg/kg foi escolhida como melhor dose e, portanto, foi utilizada nos próximos experimentos. Os animais submetidos ao *kindling*, receberam administração de PTZ 35 mg/kg em dias alternados e foram avaliados quanto à latência para a crise epiléptica tônico-clônica generalizada e quanto ao estágio médio de atingido. Os animais do grupo Basal foram considerados apenas para as análises histológicas do parênquima cerebral de animais submetidos ao *kindling*.

No *kindling*, o grupo experimental que recebeu o HC 100 mg/kg apresentou crises tônico-clônicas generalizadas apenas na décima primeira injeção i.p de PTZ 35 mg/kg (21º e último dia de experimento), enquanto o grupo controle apresentou as mesmas crises a partir da sétima injeção de PTZ (13º dia de experimento, como observado no gráfico 8. Além disso, a redução percentual na latência para a primeira crise epiléptica tônico-clônica generalizada (LCTCG) no último dia foi de 119,5 % para o HC 100 mg/kg ($820,0 \pm 39,14$ s) em relação ao grupo controle ($373,60 \pm 45,15$ s).

Gráfico 8. Latência para a crise tônico-clônica generalizada no *kindling*.

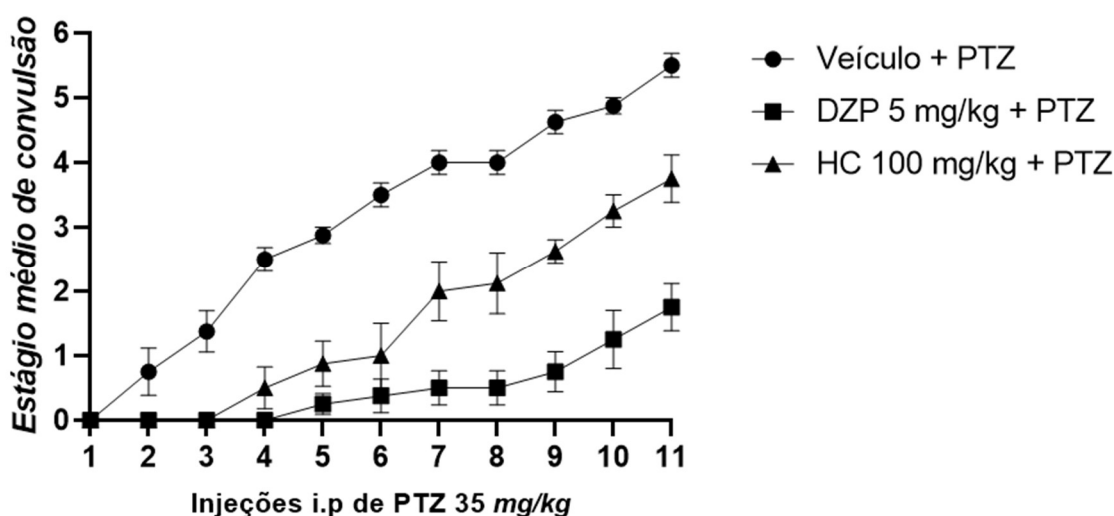


Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise do efeito do hidroxycitronelal na latência para a primeira crise tônico-clônica no *kindling*. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de cada dia de administração de PTZ 35 mg/kg, através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Fonte: dados da pesquisa (2025).

No gráfico 9 é possível observar a evolução do estágio médio de convulsão atingido no *kindling* com as administrações de HC 100 mg/kg, DZP 5 mg/kg e do veículo. O grupo que recebeu o HC 100 mg/kg apresentou crises epilépticas no grau 5 apenas no último dia de experimento, enquanto o grupo controle apresentou as crises a partir do décimo terceiro dia.

Gráfico 9. Estágio Médio de Convulsão Atingido no *Kindling*.



Descrição: O Gráfico apresenta os resultados da análise do efeito do hidroxycitronelal sobre o estágio médio de convulsão atingido no *kindling*. No gráfico, é representada a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de cada dia de administração de PTZ 35 mg/kg, através da ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (*post hoc*) e teste t não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Legenda: Níveis da Escala de Racine modificada: 0 – Normal; 1 – Mudanças no comportamento; 2 – Espasmos faciais; 3 – Espasmos do tipo “neck jerkings”; 4 – Convulsão mioclônica sentado; 5 – Convulsão Tônico-Clônica/queda de lado; 6 – Morte.

Fonte: dados da pesquisa (2025).

5.2.4.1. Análises histológicas do encéfalo dos animais submetidos ao *kindling*

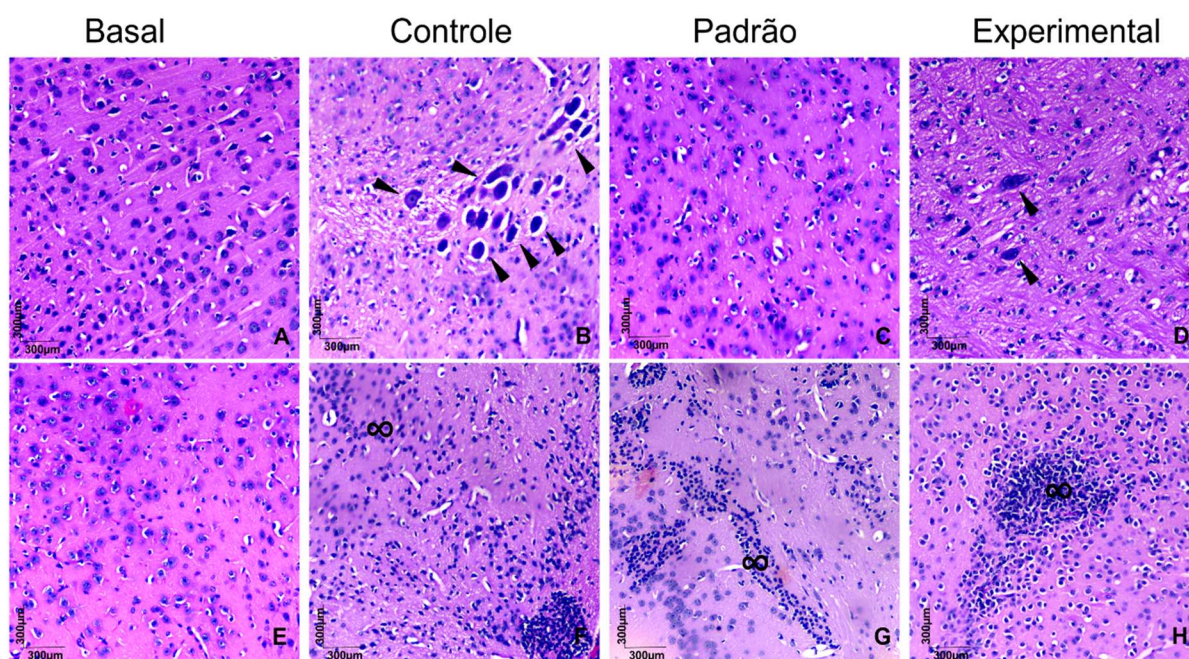
Na imagem (figura 14), é possível visualizar cortes histológicos corados em HE, representativos do parênquima e do estroma do sistema nervoso central, dos grupos experimentais avaliados, a saber: grupo basal, controle (veículo + PTZ), padrão (DZP 5 mg/kg + PTZ) e grupo experimental (HC 100 mg/kg + PTZ).

No grupo basal, neurônios totalmente preservados são observados, apresentando manutenção do tamanho, da forma e da afinidade tintorial, o que é

compatível com normalidade, além de haver ausência de reação glial. Já no grupo controle observa-se diversos focos de neurônios com expansão do corpo celular e alteração de afinidade tintorial (setas pretas), exibindo ainda nódulos microgliais distribuídos de forma intensa e multifocal por todo parênquima (∞).

No grupo padrão, observa-se neurônios preservados, compatíveis com o grupo basal, no entanto apresentando ainda poucos nódulos microgliais focais (∞). Por outro lado, os animais do grupo experimental, que receberam o HC na melhor dose (100/kg), é possível observar poucos neurônios alterados (setas pretas), apresentando ainda poucos nódulos microgliais focais (∞), sendo, portanto, menos evidente do que no grupo controle.

Figura 14. Cortes histológicos do parênquima e do estroma do córtex cerebral dos camundongos submetidos ao modelo de abrasamento químico.



Descrição: Fotomicrografia representativa de cortes histológicos do parênquima e do estroma do córtex cerebral de camundongos dos grupos experimentais (basal, controle, padrão positivo e hidroxycitronelal 100 mg/kg) corados em HE e observados em aumento total de até 40 X por microscopia óptica.

Legenda: ►: neurônios alterados; ∞ : nódulos microgliais focais.

Fonte: dados da pesquisa (2025).

6. DISCUSSÃO

O estudo *in silico* e *in vivo* realizado com o hidroxicitronelal (HC) neste trabalho mostrou que a substância apresenta um importante efeito antiepiléptico e neuroprotetor. Os resultados obtidos contribuem para o estudo do papel do HC, um monoterpeno derivado do citronelal, no controle de crises epilépticas, uma vez que o HC apresentou um efeito promissor quando administrado de forma aguda e por via oral em camundongos em múltiplas doses.

A epilepsia é uma condição complexa que envolve múltiplos fatores patológicos. Diversos fenômenos podem desencadear ou agravar as crises epilépticas, como visto anteriormente neste trabalho. Assim, foi de fundamental importância para este estudo uma análise *in silico* de interação molecular entre o HC e possíveis alvos farmacológicos (GABA_A, Nav 1.6, Kv 2.7 - KCNQ 2, Cav 1.2, AMPA, NMDA, SV2A e GAT-1), uma vez que estes alvos estão relacionados de alguma forma com a doença (Pong *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2024).

Os estudos computacionais são uma importante ferramenta para predição de efeitos farmacológicos e nos permitem minimizar o uso de animais, fornecendo resultados relevantes para análises complexas antes de iniciar o estudo *in vivo*. Estas análises são amplamente utilizadas na investigação do potencial psicofarmacológico de drogas naturais e sintéticas (Rodrigues *et al.*, 2024; Fonsêca *et al.*, 2024).

Os alvos farmacológicos supracitados foram selecionados do *Protein Data Bank (PDB)* com base na farmacoterapia e na fisiopatologia da epilepsia. Segundo Andrade *et al.* (2021), o HC apresenta efeito ansiolítico *in vivo* e este efeito parece estar relacionado, pelo menos parcialmente, com a via GABAérgica, uma vez que o antagonista benzodiazepínico flumazenil conseguiu reverter o efeito ansiolítico do HC. Da mesma forma, o seu precursor químico, o Citronelal, parece interagir com a via GABAérgica e com a via do canal de sódio dependente de voltagem, promovendo efeito antiepiléptico em roedores, como aponta o estudo de Chowdhury *et al.*, 2024.

Dessa forma, no intuito de investigar de maneira mais aprofundada a possível interação do HC com o receptor GABAérgico GABA_A, foi realizada uma análise *in silico* da sua interação molecular com o alvo em comparação com o diazepam, com o flumazenil e com o fenobarbital, que são fármacos que atuam no receptor GABA_A e possuem efeito farmacológico conhecido.

No *docking* molecular, os valores de energia de ligação e score obtidos para o HC foram satisfatórios para alguns principais alvos, como NMDAR, SV2A, Cav 1.2, Nav 1.6, KCNQ2 e GABA_A. Além disso, as interações químicas com os resíduos de aminoácidos específicos foram avaliadas em detalhes. Nesse contexto, o HC apresentou apenas duas interações químicas desfavoráveis em Tyr238 no canal iônico Cav1.2 e em Tyr60 no transportador GABAérgico GAT-1. Todas as outras interações químicas foram favoráveis e muitas delas foram similares às observadas com os fármacos padrão positivo. Isso mostra que o HC pode agir por essas vias e que estudos *in vivo* devem ser realizados a fim de se confirmar seu efeito nestes alvos farmacológicos, por meio de modelos de antagonismo e sinergismo.

Em relação ao canal de sódio dependente de voltagem Nav 1.6, apesar de os valores de energia livre e de *score* não serem melhores que os do padrão fenitoína, é possível que o HC interaja com essa via. Isso se dá pelo motivo de o composto foi capaz de interagir com os resíduos Val1757, Phe1754 e Ser1753, que também são pontos de interação da fenitoína. Também vale ressaltar que o estudo de Chowdhury *et al.*, (2024) aponta a via do canal de sódio dependente de voltagem como uma possível via de ação para o citronelal, seu precursor químico. Já em relação aos receptores AMPA e NMDA, importantes alvos da via glutamatérgica, o HC apresentou melhor interação com o NMDA no *docking* molecular e também apresentou pontos de interação similares aos do felbamato nos resíduos Ala650, Ala652 e Thr646. Tanto para o AMPA como para o NMDA, o HC não apresentou nenhuma interação química desfavorável.

Em relação ao canal de cálcio (Cav1.2), foi possível observar que o HC apresentou boa interação com o alvo, uma vez que os valores de energia de ligação e Score foram próximos aos do padrão gabapentina. Entretanto, o HC apresentou interação química desfavorável com o Cav1.2 no resíduo Tyr238. Para a proteína sináptica neuronal 2A (SV2A), o HC apresentou valores satisfatórios no *docking* molecular, com valores próximos aos do levetiracetam, e também não apresentou interações desfavoráveis com os resíduos de aminoácido.

Por fim, para os alvos KCNQ2 e GAT-1, no *docking* molecular foi possível observar que os valores de energia e de Score da interação molecular do HC com os alvos não foram satisfatórios, em comparação aos padrões retigabina e tiagabina, respectivamente. Porém, em relação às suas interações com resíduos de aa, é

possível verificar que o HC não apresentou nenhuma ligação desfavorável e que vários resíduos foram semelhantes aos dos padrões positivos. Dessa forma, é possível que o efeito antiepiléptico do HC se dê por múltiplas vias e, portanto, estudos com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos de ação *in vivo* devem ser realizados. Estes resultados estão alinhados com o estudo de Andrade et al. (2021) que também avaliou a possível interação entre o HC e o receptor GABAA e o receptor NMDA para exercer o seu efeito ansiolítico, por meio de *docking* e dinâmica molecular, dando mais um indício de que o HC pode agir por essas vias.

Com base em todas as informações obtidas no estudo *in silico*, foi possível estabelecer um design experimental *in vivo* mais direcionado. A princípio, a toxicidade oral do HC foi avaliada, uma vez que o trabalho de Andrade et al. (2021) foi realizado apenas com administrações via intraperitoneal (i.p.). Para isso, o protocolo n.º 423 da OECD para análises de toxicidade oral aguda e estimativa da DL₅₀ foi utilizado. Como pudemos observar nos resultados, o HC apresentou baixa toxicidade e se enquadrou na última classe com a maior faixa de DL₅₀ (acima de 2.000 mg/kg), uma vez que nenhum animal veio a óbito durante os 14 dias de experimentação e que não foram observados sinais graves de toxicidade.

Durante o teste, foi observada uma pequena redução do peso médio do grupo que recebeu a maior dose (HC 2.000 mg/kg) – mesmo sem redução no consumo de água e ração durante o teste, o que abre portas para novos estudos que busquem investigar este efeito de forma mais aprofundada e por meio de quantificações de biomarcadores relevantes. Além disso, na triagem farmacológica por via oral, tanto na dose de 300 mg/kg, como na dose de 2.000 mg/kg, possíveis efeitos sedativo e analgésico foram observados, uma vez que os animais apresentaram hipolocomoção e analgesia nos primeiros momentos. Logo, novos estudos são necessários para investigar estes efeitos farmacológicos de maneira aprofundada, bem como as vias envolvidas. O efeito sedativo frequentemente está associado a fármacos com perfil benzodiazepínico (Penovich et al., 2024).

No trabalho de Andrade et al. (2021) a DL₅₀ do HC administrado via i.p foi de 500 mg/kg, o que torna o HC mais seguro para administração oral, tendo em vista que, com a administração da dose de 2.000 mg/kg, v.o, nenhum animal veio a óbito. Além disso, a via oral é frequentemente mais recomendada em estudos pré-clínicos, tendo em vista a projeção dos resultados para ensaios clínicos (Wang et al., 2022),

por conta da facilidade de administração e conforto do paciente durante a terapia farmacológica. Dessa forma, o HC surge como um potencial fármaco seguro e com baixa toxicidade.

Dando prosseguimento ao estudo dos efeitos antiepilético e neuroprotetor do HC, o modelo agudo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) foi utilizado para avaliação dos efeitos e determinação de uma curva dose-resposta. Este modelo é padrão-ouro na análise de drogas com possível efeito antiepilético, uma vez que o PTZ é capaz de induzir crises epiléticas mioclônicas, crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas, crises de ausência, crises epiléticas tônico-clônicas bilaterais focais e causar morte celular neuronal em roedores, a depender da via de administração e da dose aplicada (Skiba *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2024)

O PTZ é um antagonista não competitivo dos receptores GABA_A e induz uma cascata de eventos neurotóxicos que se iniciam através da hiperexcitabilidade neuronal mediada pela ativação excessiva dos receptores NMDA, causando a excitotoxicidade glutamatérgica, aumento do estresse oxidativo e indução de mecanismos neuroinflamatórios (Shimada; Yamagata, 2018).

No modelo animal em questão alguns parâmetros foram avaliados, como a Latência para o Primeiro Espamos (LPE), a Latência para a Primeira Crise Tônico-Clônica Generalizada (LCTCG) a Duração das Crises (DC) e a Latência para Morte (LM), sendo estes fundamentais para inferência de um possível efeito anticonvulsivante. É sabido que drogas antiepiléticas e neuroprotetoras promovem redução da duração das crises, bem como aumento das latências para as primeiras crises e para a morte (Guedes *et al.*, 2022).

No nosso estudo, foi verificado que o HC aumenta a LPE, a LCTCG e a LM, bem como reduz a DC nas três doses avaliadas inicialmente com base na DL₅₀ (50, 100 e 200 mg/kg). Estas doses iniciais foram escolhidas com base na DL₅₀, tendo sido estabelecidas em 2,5, 5 e 10% da maior dose testada no protocolo da OECD n.º 423. Este achado foi fundamental para o estudo do potencial antiepilético do HC. O aumento das latências para o primeiro espasmo e para a primeira crise epilética tônico-clônica generalizada, bem como a redução da duração das crises em relação ao grupo controle são indicativas de ação antiepilética (Entezari; Jahanabadi, 2022).

De outro lado, o aumento da latência para morte pode indicar um possível efeito neuroprotetor da substância sobre os animais (Monteiro *et al.*, 2024).

A partir desta análise, estudos mais aprofundados a respeito das possíveis vias de ação do HC e sobre a sua influência sobre o sistema antioxidante e a neuroinflamação são fundamentais para complementar o estudo do seu potencial neuroprotetor. Caso este efeito seja comprovado, o HC surgirá como um importante candidato à terapia antiepiléptica, uma vez que nenhum fármaco antiepilético disponível no mercado possui efeito neuroprotetor associado ao efeito antiepilético, sendo, portanto, todos utilizados apenas no controle das crises epiléticas, reduzindo a sua frequência e intensidade (Elkommos; Mula, 2022; Pong *et al.*, 2023).

Durante as análises, foi possível escolher a dose de 100 mg/kg como a melhor dose do HC para os efeitos antiepilético e neuroprotetor, uma vez que ela apresenta o mesmo efeito que a dose de 200 mg/kg (sem diferença estatística) em todos os parâmetros, mas apresenta maior efeito quando comparada a dose de 50 mg/kg (com diferença estatisticamente significativa). Essa dose, portanto, foi utilizada nas análises neuroquímicas, no *kindling* e na análise histológica.

Para determinação da curva dose-resposta, as doses de 25, 12,5 e 6,25 mg/kg foram avaliadas no modelo do PTZ, no intuito de encontrarmos a dose em que houvesse perda de efeito antiepilético dentro das condições experimentais avaliadas. A redução da dose se deu sempre em 50 % da dose que apresentou efeito previamente. Assim, foi possível determinar que o HC apresenta efeito antiepilético e neuroprotetor, quando administrado por via oral e de forma aguda, até a dose de 12,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (veículo).

A dose de 6,25 mg/kg do HC, entretanto, não foi capaz de aumentar a latência para o primeiro espasmo mioclônico (LPE) e a latência para a primeira crise tônico-clônica generalizada (LCTCG) e nem de reduzir a duração das crises (DC), tendo apresentado um discreto aumento no parâmetro LM em comparação ao grupo controle (veículo). Dessa forma, a dose de 6,25 mg/kg foi o ponto final da curva dose-resposta para o efeito antiepilético do HC, dentro dos critérios e das condições experimentais avaliadas. Possivelmente, o efeito neuroprotetor da dose de 6,25 mg/kg ainda seja possível, mas estudos mais aprofundados são necessários para avaliar sua influência em estudos crônicos, na neuroinflamação e no sistema antioxidante.

Os monoterpenos já promovem efeito antiepiléptico na literatura, o que pode indicar que o HC seja dotado deste potencial farmacológico. O estudo de Souto-Maior *et al.*, (2017) avaliou o efeito do óxido de linalol em camundongos Swiss e verificou que este monoterpeno possui efeito anticonvulsivante quando administrado pela via i.p na dose de 150 mg/kg, o que também foi avaliado por meio do modelo de crises induzidas por PTZ. O trabalho de Alvi *et al.*, (2021) verificou que o monoterpeno carveol é capaz de reduzir a neuroinflamação no modelo de crises induzidas por PTZ. Ademais, o estudo realizado por Fonsêca *et al.*, (2024) aponta o efeito antiepiléptico do monoterpeno tetrahidrolinalol (THL) em camundongos Swiss, o que também parece estar relacionado com a atuação do THL pela via GABAérgica.

Neste contexto, o Citronelal, um monoterpeno e precursor químico do HC, também apresentou efeito antiepiléptico *in vivo*, como mostra o trabalho de Chowdhury *et al.*, (2024), que avaliou o efeito antiepiléptico do HC em roedores e verificou que este efeito possivelmente está relacionado com as vias GABAérgica e com a via dos canais de sódio dependentes de voltagem. Este achado está coincide com os achados do trabalho de Andrade *et al.*, (2021), que aponta que o HC também age pela via GABAérgica, quando administrado por via i.p. Assim, considerando os nossos resultados *in silico* e *in vivo*, o nosso trabalho está alinhado com os resultados encontrados na literatura com outras drogas da classe dos monoterpenos e reforça o possível papel do HC como importante candidato a fármaco antiepiléptico e neuroprotetor.

Além disso, em relação ao estresse oxidativo desencadeado a partir de crises epiléticas, dois componentes atuam como importantes biomarcadores da atividade do sistema antioxidante: o nitrito (NO_2^-) e a glutatona reduzida (GSH). O NO_2^- é um importante biomarcador do metabolismo do óxido nítrico (NO), uma molécula sinalizadora que, em condições fisiológicas, participa de processos como vasodilatação, neurotransmissão e modulação imune. No entanto, em situações de estresse oxidativo exacerbado, como no caso das crises epiléticas, a produção de NO aumenta significativamente (Wink *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2021; Łukawski; Czuczwar, 2023).

Essa produção elevada de NO pode levar à formação de espécies reativas de nitrogênio, as quais têm alto potencial de causar danos oxidativos em proteínas, lipídios e DNA neuronal. Assim, a quantificação de nitrito nos hipocampus é usada

como um indicador indireto da atividade do NO e, por consequência, do estresse oxidativo induzido por crises convulsivas (Łukawski; Czuczwar, 2023).

A glutathiona reduzida (GSH), por sua vez, é um tripeptídeo (composto por glutamato, cisteína e glicina) que atua como o principal antioxidante endógeno nas células neuronais. Sua principal função é neutralizar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN), prevenindo o dano oxidativo aos constituintes celulares. Durante crises epiléticas, o aumento de espécies reativas, como radicais livres e óxido nítrico, pode sobrecarregar as defesas antioxidantes. A GSH atua regenerando outros antioxidantes, além de participar diretamente da redução de peróxidos lipídicos e da desintoxicação de espécies reativas por meio da ação de enzimas como a glutathiona peroxidase (Łukawski; Czuczwar, 2023; Chaudhary *et al.*, 2024).

Quando a demanda de defesa antioxidante excede a capacidade regenerativa da GSH, seus níveis intracelulares diminuem, resultando em maior suscetibilidade a danos oxidativos e apoptose neuronal. Substâncias que atuem estimulando o aumento dos níveis de GSH podem exercer um efeito antioxidante indireto e, consequentemente, reduzir o estresse oxidativo (Hazany *et al.*, 2023).

Nesse sentido, nas análises neuroquímicas realizadas neste trabalho, com os homogenatos de hipocampo dos animais submetidos ao modelo agudo de crises epiléticas induzidas por PTZ, o HC 100 mg/kg foi capaz de aumentar os níveis de GSH, em relação ao grupo basal, como ocorreu também com o fármaco padrão (DZP 5 mg/kg), mas não com o grupo controle (veículo).

Esse resultado demonstra que o efeito antiepilético e neuroprotetor do HC pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a sua ação sobre o sistema antioxidante. Em contrapartida, o HC não foi capaz de reduzir os níveis de nitrito em relação ao grupo controle, não tendo apresentado diferença estatística com nenhum grupo. Este achado sugere que a possível ação antioxidante do HC se dá sobre a sua modulação nos níveis de GSH, mas sem efeito sobre o NO.

Estes achados estão alinhados com o estudo de Valentim *et al.*, (2024) que avaliou o efeito antidepressivo do monoterpeno carvacrol (CARV) e verificou que o CARV possui efeito antidepressivo e é capaz de reduzir os níveis de MDA e nitrito, além de aumentar os níveis de GSH. Assim, é possível verificar que os monoterpenos são dotados de potencial antioxidante e podem agir sobre o SNC, reduzindo o estresse oxidativo e a neuroinflamação.

Dando prosseguimento ao estudo, além de avaliar o efeito agudo do HC sobre crises epiléticas induzidas por PTZ, este trabalho buscou avaliar se o composto possui alguma capacidade de prevenir ou retardar a epileptogênese em um modelo de abrasamento químico (*kindling*). Como o HC apresentou fortes indícios de atividade antiepilética e neuroprotetora in vivo, possivelmente teria capacidade de proteger o SNC dos camundongos submetidos a administrações repetidas de uma dose subaguda de PTZ.

Nos resultados, é possível verificar que o grupo que recebeu o HC 100 mg/kg só apresentou crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas no último dia de administração do PTZ, enquanto o grupo controle já apresentava as crises desde o décimo terceiro dia, com alguns animais indo a óbito. Além disso, observando apenas o último dia de administração, houve um aumento significativo na latência para as crises em relação ao grupo controle.

Estes resultados estão alinhados com o estudo de Tambe et al., (2016) que avaliou o efeito do monoterpeno borneol no modelo de epileptogênese induzida pelo PTZ (*kindling*) e verificou que o monoterpeno é capaz de retardar a epileptogênese e que ele reduz os níveis de peroxidação lipídica e, conseqüentemente, no controle do estresse oxidativo e da neuroinflamação.

Como o *kindling* é um experimento subcrônico, com diversas administrações de um agente neurotóxico (PTZ), é esperado que haja um comprometimento neuronal no grupo que não recebeu nenhum tratamento (controle – veículo, v.o) (Dhir, 2012). De maneira a avaliar o possível efeito neuroprotetor na redução da neuroinflamação, o parênquima e o estroma do córtex cerebral dos camundongos foi avaliado por meio de técnica histológica. Nos cortes histológicos, foi possível observar que o grupo basal não apresenta morte neuronal ou nódulos gliais – indicativos de um processo neuroinflamatório.

Além disso, é possível observar que o grupo que recebeu o HC 100 mg/kg ainda apresentou um certo nível de alteração morfológica nos neurônios e alguns nódulos gliais. Entretanto, quando em comparação ao grupo controle, existe uma redução significativa. De outro lado, o grupo que recebeu o fármaco padrão (DZP 5 mg/kg) também apresentou poucos nódulos gliais, mas não apresentou alteração neuronal mesmo com os 21 dias de experimentação com o PTZ.

Levando isso em consideração, é possível que o HC, na dose de 100 mg/kg v.o., possua um efeito neuroprotetor quando administrada de forma repetida. Dessa forma, outros estudos subcrônicos e crônicos são necessários para avaliar o efeito neuroprotetor do HC, bem como as melhores doses e possíveis mecanismos de ação. Além disso, uma análise mais detalhada deve ser feita a respeito da influência do HC sobre a neuroinflamação, por meio da quantificação de componentes envolvidos no estresse oxidativo, no sistema antioxidante e de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α .

7. CONCLUSÕES

Com a avaliação dos efeitos antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxicitronelal por meio de metodologias *in silico* e *in vivo* foi possível concluir que:

- a) O hidroxicitronelal parece interagir com as vias GABAérgica, glutamatérgica e da proteína SV2A e com canais iônicos como o Nav1.6, Cav1.2 e KCNQ2.
- b) O hidroxicitronelal apresenta baixa toxicidade, com DL₅₀ acima de 2.000 mg/kg quando administrado de forma aguda e por via oral em camundongos.
- c) O hidroxicitronelal é capaz de aumentar a latência para o primeiro espasmo, a latência para a primeira crise tônico-clônica generalizada e a latência para morte, bem como de reduzir a duração das crises no modelo agudo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol.
- d) As doses de 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/kg do hidroxicitronelal promovem efeito antiepiléptico e neuroprotetor em camundongos, quando administradas de forma aguda e por via oral.
- e) A dose de 6,25 mg/kg do hidroxicitronelal não foi capaz de promover efeito antiepiléptico em camundongos, nas condições experimentais avaliadas.
- f) O hidroxicitronelal promove a redução dos níveis de nitrito e aumento dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), quando administrado de forma aguda e por via oral em camundongos submetidos ao modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol.
- g) O hidroxicitronelal é capaz de retardar a epileptogênese e de impedir a morte dos camundongos no modelo de abrasamento químico (*kindling*), impedindo a morte neuronal e a neuroinflamação.

8. PERSPECTIVAS

Como a epilepsia é uma condição crônica, é importante que a toxicidade oral subcrônica e crônica do hidroxicitronelal (HC) seja avaliada, com o objetivo de estabelecer as doses seguras e os possíveis efeitos tóxicos no tratamento prolongado.

No intuito de aprofundar o estudo do potencial antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxicitronelal, é fundamental que os possíveis mecanismos de ação avaliados por meio do *docking* molecular sejam avaliados *in vivo*, a exemplo da via GABAérgica, a via dos canais de sódio e a via glutamatérgica. Modelos de antagonismo e sinergismo farmacológicos devem ser realizados para avaliar a participação destas vias no possível mecanismo de ação do HC.

Além disso, considerando o possível efeito neuroprotetor observado no modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ e no modelo do abrasamento químico, deve-se avaliar os possíveis mecanismos envolvidos no controle da epileptogênese, por meio de ferramentas *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Nesse contexto, é importante que se façam quantificações de componentes do sistema antioxidante em modelos subcrônicos e crônicos, bem como de citocinas pró-inflamatórias, a fim de verificar a influência do HC no controle do estresse oxidativo dos mecanismos neuroinflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARRATEGUI, Belén *et al.* Temporal lobe epilepsy: A never-ending story. **Epilepsy & Behavior**, v. 122, p. 108122, set. 2021.
- ADACHI, Naoto; ITO, Masumi. Epilepsy in patients with schizophrenia: Pathophysiology and basic treatments. **Epilepsy & Behavior**, v. 127, p. 108520, fev. 2022.
- ALARAJ, M.; SAADH, M. J.; ALAFNAN, A. Insulin potentiates the anticonvulsive activity of phenytoin against maximal electroshock-induced seizures in mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 22, p. 8534–8538, nov. 2022.
- ALVI, Arooj Mohsin *et al.* Carveol Attenuates Seizure Severity and Neuroinflammation in Pentylenetetrazole-Kindled Epileptic Rats by Regulating the *Nrf2* Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, p. 9966663, jan. 2021.
- ANDRADE, Jéssica C. *et al.* Involvement of GABA_A Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal. **BioMed Research International**, v. 2021, n. 1, p. 9929805, jan. 2021.
- API, A. M. *et al.* RIFM fragrance ingredient safety assessment, hydroxycitronellal, CAS Registry Number 107-75-5. **Food and Chemical Toxicology**, v. 163, p. 112983, maio 2022.
- ARAÚJO, Gleycyelly Rodrigues *et al.* In Silico and In Vitro Evaluation of the Antifungal Activity of a New Chromone Derivative against *Candida* spp. **BioTech**, v. 13, n. 2, p. 16, 25 maio 2024.
- AUD'HUI, M. *et al.* Detection of seizure onset in childhood absence epilepsy. **Clinical Neurophysiology**, v. 163, p. 267–279, jul. 2024.
- BAPTISTA, Catarina V.; FAUSTINO-ROCHA, Ana I.; OLIVEIRA, Paula A. Animal Models in Pharmacology: A Brief History Awarding the Nobel Prizes for Physiology or Medicine. **Pharmacology**, v. 106, n. 7–8, p. 356–368, 2021.
- BARTOLINI, Emanuele *et al.* Drug-resistant epilepsy at the age extremes: Disentangling the underlying etiology. **Epilepsy & Behavior**, v. 132, p. 108739, jul. 2022.
- BAYAT, Allan *et al.* Epilepsy Syndromes in the First Year of Life and Usefulness of Genetic Testing for Precision Therapy. **Genes**, v. 12, n. 7, p. 1051, 8 jul. 2021.
- BEGHI, Ettore; GIUSSANI, Giorgia; SANDER, Josemir W. The natural history and prognosis of epilepsy. **Epileptic Disorders**, v. 17, n. 3, p. 243–253, set. 2015.

BELETE, Daniel *et al.* Association Between Antiepileptic Drugs and Incident Parkinson Disease. **JAMA Neurology**, v. 80, n. 2, p. 183, 1 fev. 2023.

BIANCHINI, A. E. *et al.* Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, p. e6346, 2017.

BINDER, Devin K.; STEINHÄUSER, Christian. Astrocytes and Epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 10, p. 2687–2695, out. 2021.

BINDING, Lawrence P. *et al.* Structure and function of language networks in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 63, n. 5, p. 1025–1040, maio 2022.

BUTZGE, Juliana Caroline *et al.* Antifungal Properties of Essential Oils Derived from the Genus *Cymbopogon* : A Systematic Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 10, p. e202300663, out. 2023.

CHAUDHARY, Sarika *et al.* Genistein mitigates nitroglycerine-induced migraine: modulation of nitric oxide-mediated vasodilation and oxidative stress. **Metabolic Brain Disease**, v. 39, n. 5, p. 821–831, 25 maio 2024.

CHEN, Tsang-Shan *et al.* Immunity, Ion Channels and Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6446, 9 jun. 2022.

CHOWDHURY, Raihan *et al.* Anticonvulsant effect of ($\pm$) citronellal possibly through the GABAergic and voltage-gated sodium channel receptor interaction pathways: In vivo and in silico studies. **Neurochemistry International**, v. 175, p. 105704, maio 2024.

COPPLER, Patrick J.; ELMER, Jonathan. Status Epilepticus. **Critical Care Clinics**, v. 39, n. 1, p. 87–102, jan. 2023.

COSTA, A. O. C. *et al.* Evaluation of the antinociceptive effect generated by citronellal monoterpene isomers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e271781, 2023.

COUGHLIN, Curtis R. *et al.* Consensus guidelines for the diagnosis and management of pyridoxine-dependent epilepsy due to α -aminoacidic semialdehyde dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 44, n. 1, p. 178–192, jan. 2021.

DA GUEDES, Erika *et al.* Anticonvulsant Activity of *trans* -Anethole in Mice. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 9902905, jan. 2022.

DA SILVA, P. R. *et al.* Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Monoterpene Tetrahydrolinalool and *In silico* Approach of new Potential Targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 1530–1552, jul. 2022.

DA SILVA, P. R. *et al.* Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Monoterpene Tetrahydrolinalool and *In silico* Approach of new Potential Targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 1530–1552, jul. 2022.

DA SILVA, Pablo Rayff *et al.* Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Disorders: A Review with Experimental Approach. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 4, p. 842–866, abr. 2023.

DE LA PEÑA, Ricardo; SATTELY, Elizabeth S. Rerouting plant terpene biosynthesis enables momilactone pathway elucidation. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 205–212, fev. 2021.

DE SOUSA, Natália Ferreira *et al.* Proposition of *In silico* Pharmacophore Models for Malaria: A Review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 27, n. 17, p. 2525–2543, nov. 2024.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Idiopathic Generalized Epilepsy: Misunderstandings, Challenges, and Opportunities. **Neurology**, v. 102, n. 3, p. e208076, 13 fev. 2024.

DHIR, Ashish. Pentylenetetrazol (PTZ) Kindling Model of Epilepsy. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 58, n. 1, jan. 2012.

EKIERT, Halina Maria; SZOPA, Agnieszka. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769, 7 dez. 2020.

ELKOMMOS, Samia; MULA, Marco. Current and future pharmacotherapy options for drug-resistant epilepsy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 23, n. 18, p. 2023–2034, 12 dez. 2022.

ENTEZARI, Zahra; JAHANABADI, Samane. Anticonvulsant Effect of Minocycline on Pentylenetetrazole-Induced Seizure in Mice: Involvement of 5-HT₃ Receptor. **Drug Research**, v. 72, n. 05, p. 268–273, jun. 2022.

FALCO-WALTER, Jessica. Epilepsy—Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. **Seminars in Neurology**, v. 40, n. 06, p. 617–623, dez. 2020.

FONSÊCA, Diogo V. *et al.* Anticonvulsant activity of Tetrahydrolinalool: behavioral, electrophysiological, and molecular docking approaches. **ChemMedChem**, v. 19, n. 15, p. e202400135, ago. 2024.

GREEN, Laura C.; TANNENBAUM, Steven R.; GOLDMAN, Peter. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 3 abr. 1981.

GRIBKOFF, Valentin K.; WINQUIST, Raymond J. Potassium channelopathies associated with epilepsy-related syndromes and directions for therapeutic intervention. **Biochemical Pharmacology**, v. 208, p. 115413, fev. 2023.

GUEDES, Erika *et al.* Anticonvulsant Activity of *trans* -Anethole in Mice. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 9902905, jan. 2022.

GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651–715, mar. 2020.

GUO, Anni *et al.* Inhibition of connexin hemichannels alleviates neuroinflammation and hyperexcitability in temporal lobe epilepsy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 45, p. e2213162119, 8 nov. 2022.

HAN, Yu Na *et al.* Nitric Oxide Produced by the Antioxidant Activity of Verapamil Improves the Acute Wound Healing Process. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 179–186, fev. 2021.

HAZANY, Saman *et al.* Brain Glutathione Increase and Seizure Burden Decrease in Patients with Intractable Epilepsy on Ketogenic Diet. **Journal of Epilepsy Research**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 30 jun. 2023.

HE, Zimeng *et al.* Dravet syndrome: Advances in etiology, clinical presentation, and treatment. **Epilepsy Research**, v. 188, p. 107041, dez. 2022.

HECKERS, Stephan; KONRADI, Christine. Animal Model Reveals Mechanism of Hippocampal Hyperactivity in Psychosis. **Schizophrenia Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 546–548, 3 maio 2023.

HENNING, Oliver *et al.* Temporal lobe epilepsy. **Tidsskrift for Den norske legeforening**, 30 jan. 2023.

INDELICATO, Elisabetta; BOESCH, Sylvia. CACNA1A-Related Channelopathies: Clinical Manifestations and Treatment Options. *In*: STRIESSNIG, Jörg (Org.). **Voltage-gated Ca²⁺ Channels: Pharmacology, Modulation and their Role in Human Disease**. Cham: Springer International Publishing, v. 279 p. 227–248. 2023.

JAFARIAN, Maryam *et al.* The effect of GABAergic neurotransmission on the seizure-related activity of the laterodorsal thalamic nuclei and the somatosensory cortex in a genetic model of absence epilepsy. **Brain Research**, v. 1757, p. 147304, abr. 2021.

JAWAID, Talha *et al.* Preparation and Evaluation of Nanoemulsion of Citronella Essential Oil with Improved Antimicrobial and Anti-Cancer Properties. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 478, 27 fev. 2023.

KHAN, Jehan Zeb *et al.* Chronic stress intensify PTZ-induced seizures by triggering neuroinflammation and oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 729, p. 150333, out. 2024.

KONG, Amanda Shen-Yee *et al.* Harnessing Monoterpenes and Monoterpenoids as Weapons against Antimicrobial Resistance. **Polish Journal of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 1–18, 1 mar. 2025.

LATTANZI, Simona *et al.* Highly Purified Cannabidiol for Epilepsy Treatment: A Systematic Review of Epileptic Conditions Beyond Dravet Syndrome and Lennox–Gastaut Syndrome. **CNS Drugs**, v. 35, n. 3, p. 265–281, mar. 2021.

LIU, Jia; TAI, Yao-Jun; WANG, Lu-Ning. Topiramate for juvenile myoclonic epilepsy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2021, n. 11, 24 nov. 2021.

LÖSCHER, Wolfgang *et al.* Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 606–638, jul. 2020.

LÖSCHER, Wolfgang. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 7, p. 1873–1888, jul. 2017.

ŁUKAWSKI, Krzysztof; CZUCZWAR, Stanisław J. Oxidative Stress and Neurodegeneration in Animal Models of Seizures and Epilepsy. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1049, 5 maio 2023.

Malone, M., Robichaud, R. A. **Hippocratic screen for pure or crude drug materials**. 1962.

MANFORD, Mark. Recent advances in epilepsy. **Journal of Neurology**, v. 264, n. 8, p. 1811–1824, ago. 2017.

MENEZES, Luis Felipe Santos *et al.* Epilepsy-Related Voltage-Gated Sodium Channelopathies: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1276, 18 ago. 2020.

MILLIGAN, Tracey A. Epilepsy: A Clinical Overview. **The American Journal of Medicine**, v. 134, n. 7, p. 840–847, jul. 2021.

MIZIAK, Barbara; CHROŚCIŃSKA-KRAWCZYK, Magdalena; CZUCZWAR, Stanisław J. Neurosteroids and Seizure Activity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 541802, 30 set. 2020.

MONTEIRO, Álefe Brito *et al.* Neuroprotective effect of cinnamic alcohol: A bioactive compound of Cinnamomum spp. essential oil. **Neurochemistry International**, v. 179, p. 105807, out. 2024.

MONTEIRO, Álefe Brito *et al.* Neuroprotective effect of cinnamic alcohol: A bioactive compound of Cinnamomum spp. essential oil. **Neurochemistry International**, v. 179, p. 105807, out. 2024.

MONTEIRO, Álefe Brito *et al.* Pentylenetetrazole: A review. **Neurochemistry International**, v. 180, p. 105841, nov. 2024.

MORO, Corinna A.; HANNA-ROSE, Wendy. Animal Model Contributions to Congenital Metabolic Disease. *In*: LIU, Aimin (Org.). **Animal Models of Human Birth Defects**. Singapore: Springer Singapore. v. 1236 p. 225–244. 2020.

NELSON, Julie A.; KNUPP, Kelly G. Lennox-Gastaut Syndrome: Current Treatments, Novel Therapeutics, and Future Directions. **Neurotherapeutics**, v. 20, n. 5, p. 1255–1262, set. 2023.

NESTERKINA, Mariia *et al.* Novel (–)-carvone derivatives as potential anticonvulsant and analgesic agents. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 4978–4987, 2 dez. 2021.

NEUMANN, Anne-Marie; BRITSCH, Stefan. Molecular Genetics of Acquired Temporal Lobe Epilepsy. **Biomolecules**, v. 14, n. 6, p. 669, 7 jun. 2024.

NG, Andy Cheuk-Him *et al.* Channelopathies in epilepsy: an overview of clinical presentations, pathogenic mechanisms, and therapeutic insights. **Journal of Neurology**, v. 271, n. 6, p. 3063–3094, jun. 2024.

OECD. 2001. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**, nº 423. 2001

OHMORI, Iori *et al.* Novel animal model of combined generalized and focal epilepsy. **Epilepsia**, v. 63, n. 7, jul. 2022.

PATROS, Mikaela *et al.* The physiology, anatomy and stimulation of the vagus nerve in epilepsy. **The Journal of Physiology**, v. 603, n. 8, p. 2201–2217, abr. 2025.

PAVONE, Piero *et al.* West syndrome: a comprehensive review. **Neurological Sciences**, v. 41, n. 12, p. 3547–3562, dez. 2020.

PENOVICH, Patricia E. *et al.* Benzodiazepines for the Treatment of Seizure Clusters. **CNS Drugs**, v. 38, n. 2, p. 125–140, fev. 2024.

PERUCCA, Piero; SCHEFFER, Ingrid E.; KILEY, Michelle. The management of epilepsy in children and adults. **Medical Journal of Australia**, v. 208, n. 5, p. 226–233, mar. 2018.

PIETRAFUSA, Nicola *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy: Long-term prognosis and risk factors. **Brain and Development**, v. 43, n. 6, p. 688–697, jun. 2021.

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

PIRES, H. F. O. *et al.* Mechanisms Involved in the Therapeutic Effect of Cannabinoid Compounds on Gliomas: A Review with Experimental Approach. **Current Protein & Peptide Science**, v. 25, n. 1, p. 27–43, jan. 2024.

PONG, Amanda W.; XU, Kevin J.; KLEIN, Pavel. Recent advances in pharmacotherapy for epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 36, n. 2, p. 77–85, abr. 2023.

PONG, Amanda W.; XU, Kevin J.; KLEIN, Pavel. Recent advances in pharmacotherapy for epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 36, n. 2, p. 77–85, abr. 2023.

RAMMAL, Marwa *et al.* Cymbopogon winterianus (Java Citronella Plant): A Multi-Faceted Approach for Food Preservation, Insecticidal Effects, and Bread Application. **Foods**, v. 13, n. 5, p. 803, 5 mar. 2024.

ROBINSON, N. Bryce *et al.* The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Surgery**, v. 72, p. 9–13, dez. 2019.

RODRIGUES, Teresa Carrolliny Moreira Lustoza *et al.* Epileptic Targets and Drugs: A Mini-Review. **Current Drug Targets**, v. 24, n. 3, p. 212–224, fev. 2023.

RODRIGUES, Teresa Carrolliny Moreira Lustoza *et al.* Multi-target Phenylpropanoids Against Epilepsy. **Current Neuropharmacology**, v. 22, n. 13, p. 2168–2190, nov. 2024.

ROMANOVA, Elena V.; SWEEDLER, Jonathan V. Animal Model Systems in Neuroscience. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 1869–1870, 15 ago. 2018.

RUSINA, Evgeniia; BERNARD, Christophe; WILLIAMSON, Adam. The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. **eneuro**, v. 8, n. 2, p. ENEURO.0337-20.2021, mar. 2021.

SALSABILA, Dhiya *et al.* Cytoprotective Properties of Citronella Oil (Cymbopogon nardus (L.) Rendl.) and Lemongrass Oil (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf) through Attenuation of Senescent-Induced Chemotherapeutic Agent Doxorubicin on Vero and NIH-3T3 Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 5, p. 1667–1675, 1 maio 2023.

SEO, Sowoon *et al.* D-limonene Inhibits Pentylentetrazole-Induced Seizure via Adenosine A2A Receptor Modulation on GABAergic Neuronal Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9277, 4 dez. 2020.

SHIMADA, Tadayuki; YAMAGATA, Kanato. Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. **Journal of Visualized Experiments**, n. 136, p. 56573, 12 jun. 2018.

SILVA, M. A. B. *et al.* Bioprospecção dos potenciais farmacológicos do monoterpeno 7-hidroxicitronelal: Ensaios in silico. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 7, n. 2, p. 72–76, 1 abr. 2017.

SINGH, Gagandeep; SANDER, Josemir W. The global burden of epilepsy report: Implications for low- and middle-income countries. **Epilepsy & Behavior**, v. 105, p. 106949, abr. 2020.

SINGH, Sandeep Kumar *et al.* Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 666–674, jul. 2019.

SINGH, Tanveer; MISHRA, Awanish; GOEL, Rajesh Kumar. PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 7, p. 1573–1590, out. 2021.

SINGH, Tanveer; MISHRA, Awanish; GOEL, Rajesh Kumar. PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 7, p. 1573–1590, out. 2021.

SKIBA, Adrianna *et al.* Evaluation of the Antiseizure Activity of Endemic Plant *Halfordia kendack* Guillaumin and Its Main Constituent, Halfordin, on a Zebrafish Pentylenetetrazole (PTZ)-Induced Seizure Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2598, 30 jan. 2023.

SOCALA, Katarzyna *et al.* TRPV1 channel in the pathophysiology of epilepsy and its potential as a molecular target for the development of new antiseizure drug candidates. **Progress in Neurobiology**, v. 240, p. 102634, set. 2024.

SOLTANI KHABOUSHAN, Alireza; YAZDANPANA, Niloufar; REZAEI, Nima. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1724–1743, mar. 2022.

SOMALA, Naphat *et al.* Citronella essential oil-based nanoemulsion as a post-emergence natural herbicide. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 20851, 27 nov. 2023.

SONG, Juhyun; KIM, Young-Kook. Animal models for the study of depressive disorder. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 633–642, jun. 2021.

SOUTO-MAIOR, Flávia Negromonte *et al.* Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 63–67, jan. 2017.

SPECCHIO, Nicola *et al.* International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. **Epilepsia**, v. 63, n. 6, p. 1398–1442, jun. 2022.

STOECKELHUBER, Markus *et al.* A validated UPLC–MS/MS method for biomonitoring the exposure to the fragrance 7-hydroxycitronellal. **Journal of Chromatography B**, v. 1068–1069, p. 261–267, nov. 2017.

STRZELCZYK, Adam; SCHUBERT-BAST, Susanne. Expanding the Treatment Landscape for Lennox-Gastaut Syndrome: Current and Future Strategies. **CNS Drugs**, v. 35, n. 1, p. 61–83, jan. 2021.

SVEDMAN, C. *et al.* Deodorants: an experimental provocation study with hydroxycitronellal. **Contact Dermatitis**, v. 48, n. 4, p. 217–223, abr. 2003.

TAMBE, Rufi *et al.* Antiepileptogenic effects of borneol in pentylenetetrazole-induced kindling in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 5, p. 467–475, maio 2016.

TEWARI, Bhanu P. *et al.* Pilocarpine-induced acute seizure causes rapid area-specific astrogliosis and alters purinergic signaling in rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1815, p. 148444, set. 2023.

THIJS, Roland D. *et al.* Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689–701, fev. 2019.

TRAN, Suzanne *et al.* Neuropathologie de l'épilepsie. **Annales de Pathologie**, v. 40, n. 6, p. 447–460, nov. 2020.

VALENTIM, José Tiago *et al.* Carvacrol alleviates CUMS-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by reducing oxidative stress and neuroinflammation in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 472, p. 115135, ago. 2024.

VAN ERUM, Jan; VAN DAM, Debby; DE DEYN, Peter Paul. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. **Epilepsy & Behavior**, v. 95, p. 51–55, jun. 2019.

VEZZANI, Annamaria *et al.* Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 18, n. 12, p. 707–722, dez. 2022.

VICENTE-SILVA, Wilson *et al.* Sakuranetin exerts anticonvulsant effect in bicuculline-induced seizures. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 663–673, ago. 2022.

WANG, Min *et al.* Effect of oral and intraperitoneal administration of walnut-derived pentapeptide PW5 on cognitive impairments in APPSWE/PS1ΔE9 mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 180, p. 191–197, fev. 2022.

WANG, Yi; CHEN, Zhong. An update for epilepsy research and antiepileptic drug development: Toward precise circuit therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 201, p. 77–93, set. 2019.

WANG, Yu *et al.* (+)-Borneol enantiomer ameliorates epileptic seizure via decreasing the excitability of glutamatergic transmission. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 44, n. 8, p. 1600–1611, ago. 2023.

WINK, David A. *et al.* [43] Antioxidant effects of nitric oxide. *In: Methods in Enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1999. v. 301 p. 413–424.

WIRRELL, Elaine C. *et al.* International consensus on diagnosis and management of Dravet syndrome. **Epilepsia**, v. 63, n. 7, p. 1761–1777, jul. 2022.

XIAO, Longfei *et al.* Exploring the mechanism of action of *Phyllanthus emblica* in the treatment of epilepsy based on network pharmacology and molecular docking. **Medicine**, v. 104, n. 7, p. e41414, 14 fev. 2025.

XIE, Ruijin *et al.* Quercetin alleviates kainic acid-induced seizure by inhibiting the Nrf2-mediated ferroptosis pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 191, p. 212–226, out. 2022.

YUSKAITIS, Christopher J. *et al.* Factors influencing the acute pentylentetrazole-induced seizure paradigm and a literature review. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 8, n. 7, p. 1388–1397, jul. 2021.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, Mariola; FEDER-KUBIS, Joanna. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7078, 25 set. 2020.

ANEXO I. Certificado de aprovação do projeto pela CEUA/UFPB



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial antiepiléptico e neuroprotetor do hidroxycitronelal em camundongos.", protocolada sob o CEUA nº 1381250225 (ID 002408), sob a responsabilidade de **Mirian G. S. Stiebbe Salvadori e equipe; Hugo Fernandes Pires** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 12/05/2025.

We certify that the proposal "Evaluation of the antiepileptic and neuroprotective potential of hydroxycitronellal in mice.", utilizing 313 Heterogenics mice (304 males and 9 females), protocol number CEUA 1381250225 (ID 002408), under the responsibility of **Mirian G. S. Stiebbe Salvadori and team; Hugo Fernandes Pires** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/12/2025.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 05/2025 a 12/2028 Área: Psicologia

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 6 a 8 semanas

Quantidade: 304

Linhagem: Mus musculus - Swiss

Peso: 20 a 30 g

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 6 a 8 semanas

Quantidade: 9

Linhagem: Mus musculus - Swiss

Peso: 20 a 30 g

João Pessoa, 12 de maio de 2025

Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares Moreira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

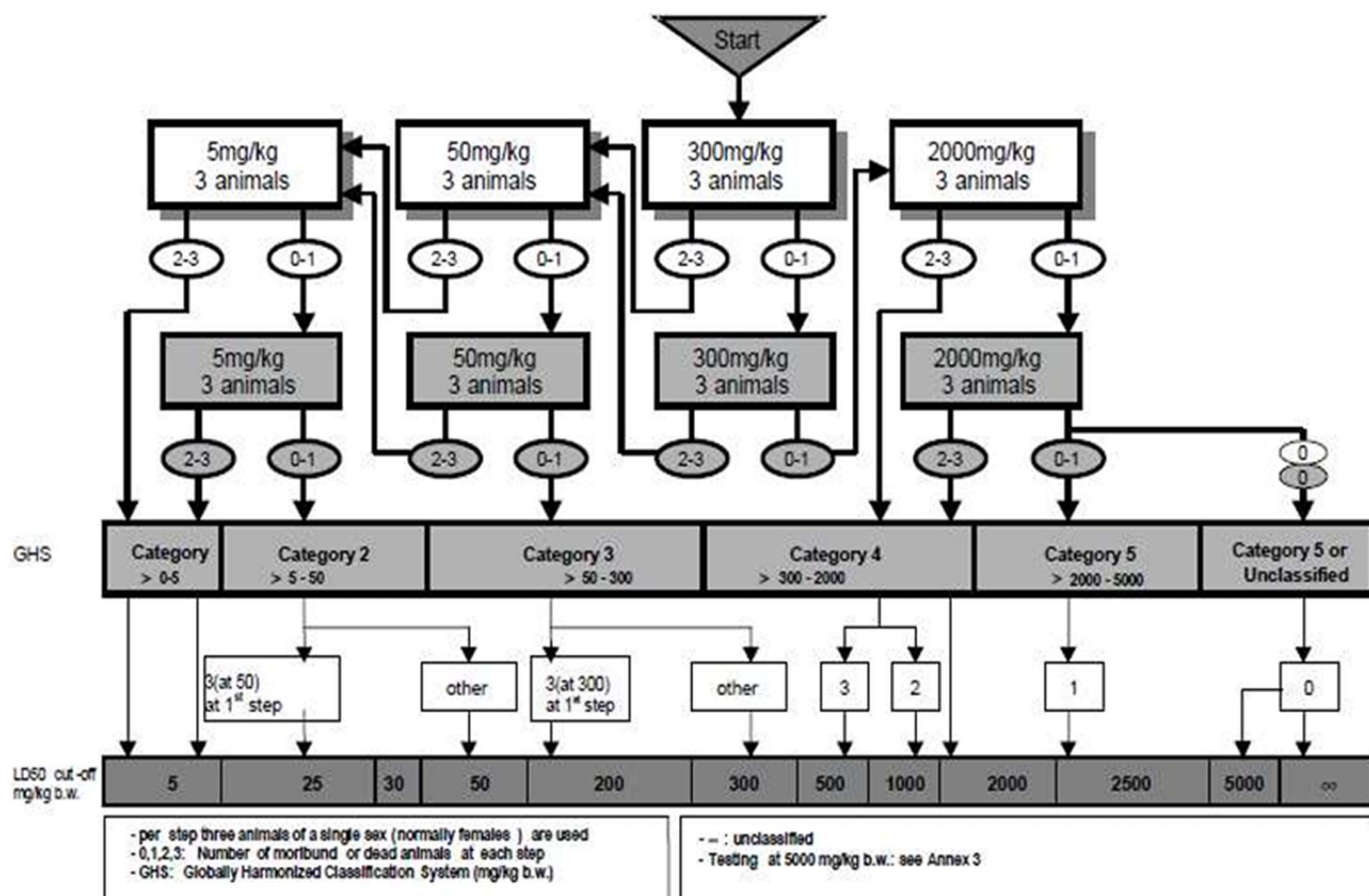


ANEXO II. Parâmetros comportamentais, autonômicos e tóxicos avaliados

	Quantificação dos Efeitos				
	Sem Feito, (-) Efeito diminuído, (+) Efeito presente, (++) Efeito aumentado				
Tempo	Até 30'	60'	120'	180'	240'
1. Sistema Nervoso Central					
Estimulante					
Agressividade					
Ambulação Diminuída					
Andar em círculo					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Irritabilidade					
Levantar-se					
Movimentação Intensa de Vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
Depressores					
Abdução das patas posteriores					
Ambulação diminuída					
Algesia					
Anestesia					
Ataxia					
Catatonía					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptose palpebral					
Reflexo do endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2. Sistema Nervoso Autônomo					
Cianose					
Constipação					
Defecação					
Diarreia					
Força para agarrar					
Lacrimagem					
Micção					
Piloereção					
Respiração					
Salivação					
Tônus muscular					
3. Mortes					

Fonte: adaptado de Almeida (2006).

**ANEXO III. Fluxograma do Protocolo n.º 423 da OECD para Toxicidade Oral
Aguda em camundongos**



Fonte: OECD (2001).

ANEXO IV. Tabela de observação com Escala de Racine Modificada para os experimentos

Experimento: _____ Avaliador: _____ Data: ____/____/____

RACINE	COMPORTAMENTOS CARACTERÍSTICOS
0	Animal explorando normalmente, sem alteração comportamental
1	Imobilidade súbita, deitado de barriga (sobre o ventre), olhar imóvel
2	Automatismos faciais (vibrissas e/ou boca), cauda enrijecida, mioclonia de membros/pescoço (espasmo)
3	Convulsão clônica na postura sentada, sacudidelas mioclônicas (<i>dog shake</i>), possível crise de ausência
4	<i>Rearing</i> com convulsão clônica/tônico-clônica seguida de queda de frente (queda sobre o ventre, sem perda do equilíbrio)
5	Convulsão tônico-clônica com queda de costas ou de lado (perda do equilíbrio), corridas e saltos "selvagens", convulsão tônica com recuperação
6	Morte por convulsão tônica (extensão de membros anteriores/posteriores e parada respiratória)

Nº	ANIMAL	LATÊNCIA P/ 1º ESPASMO MIOCLÔNICO	LATÊNCIA P/ 1º CRISE TÔNICO- CLÔNICA	DURAÇÃO DAS CRISES TÔNICO- CLÔNICAS (minuto de início e de fim)	Escala Máxima atingida 1-6	COMENTÁRIOS (comportamentos atípicos, latência p/ morte, outros)
1						
2						
3						
4						
5						
6						

Fonte: adaptado de Almeida (2006).

ANEXO V: Contribuições científicas durante o mestrado (2023-2025)

1. Artigos completos publicados:

SCOTTI, L.; DA SILVA, P. R.; DE ANDRADE, J. C.; DE SOUSA, N. F.; PORTELA, A. C. R.; PIRES, H. F. O.; REMÍGIO, M. C. R. B.; ALVES, D. N.; DE ANDRADE, H. H. N.; DIAS, A. L.; SALVADORI, M. G. S. S. S.; GOLZIO, A. M. F. O.; DE CASTRO, R. D.; SCOTTI, M. T.; FELIPE, C. F. B.; DE ALMEIDA, R. N. Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Disorders: A Review with Experimental Approach. **Current Neuropharmacology**, v. 21, p. 1875-6190, 2023.

PIRES, H. F. O.; DA SILVA, P. R.; DIAS, A. L.; GOMES, C. S.; DE SOUSA, N. F.; DOS SANTOS, A. M. F.; SOUZA, L. R. P.; LIMA, J. L. F.; OLIVEIRA, M. C. N.; FELIPE, C. F. B.; DE ALMEIDA, R. N.; DE CASTRO, R. D.; SALVADORI, M. G. S. S. S.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L. Mechanisms Involved in the Therapeutic Effect of Cannabinoid Compounds on Gliomas: A Review with Experimental Approach. **Current Protein & Peptide Science**, v. 24, p. 1-26, 2024.

MONTEIRO, A. B.; ALVES, A. F.; PORTELA, A. C. R.; PIRES, H. F. O.; MELO, M. P.; BARBOSA, NAYANA, M. N. M. V.; FELIPE, C. F. B. Pentylentetrazole: a review. **Neurochemistry International**, v. 179, p. 105841, 2024.

MONTEIRO, A. B.; ANDRADE, H. H. N.; GUEDES, E. C.; PORTELA, A. C. R.; PIRES, H. F. O.; LOPES, M. J. P.; BARBOSA, N. M. M. V.; ALVES, A. F.; GOLZIO, A. M. F. O.; DE SOUSA, D. P.; FELIPE, C. F. B.; DE ALMEIDA, R. N. Neuroprotective effect of cinnamic alcohol: a bioactive compound of Cinnamomum spp. essential oil. **Neurochemistry International**, v. 179, p. 105807, 2024.

RODRIGUES, T. C. M. L.; DIAS, A. L.; DOS SANTOS, A. F. M.; MONTEIRO, A. F. M.; OLIVEIRA, M. C. N.; PIRES, H. F. O.; DE SOUSA, N. F.; SALVADORI, M. G. S. S.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L. Multi-target Phenylpropanoids Against Epilepsy. **Current Neuropharmacology**, v. 22, p. 2168-2190, 2024.

FONSÊCA, D. V.; DA SILVA, PABLO R.; PIRES, H. F. O.; ROCHA, JULIANA S.; DE OLIVEIRA, L. E. G.; REIS, F. M. S.; CAVALHO, E. B. M.; PAZOS, N. D. N.; DE SOUSA, N. F.; GUEDES, E. C.; RIBEIRO, L. R.; SÁ, R. C. S.; SALVADORI, M. G. S. S.; SOUSA, D. P.; SCOTTI, M. T.; FELIPE, C. F. B.; DE ALMEIDA, R. N.; SCOTTI, L.. Anticonvulsant activity of Tetrahydrolinalool: behavioral, electrophysiological, and molecular docking approaches. **ChemMedChem**, v. 19, p. e202400135, 2024.

DA SILVA, P. R.; PAZOS, N. D. N.; DE ANDRADE, J. C.; DE SOUSA, N. F.; PIRES, H. F. O.; LIMA, J. L. F.; DIAS, A. L.; SALVADORI, M. G. S. S. S.; GOLZIO, A. M. F. O.; DE CASTRO, R. C.; SCOTTI, M. T.; PATIL, V. M.; FELIPE, C. F. B.; DE ALMEIDA, R. N.; SCOTTI, L. An In Silico Approach to Exploring the Antinociceptive Biological Activities of Linalool and its Metabolites. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 558, 2024.

2. Artigos aceitos para publicação:

SILVA, P. R. ; PIRES, H. F. O. ; DIAS, A. L. ; SCOTTI, L. . Nose-to-Brain Delivery System for incorporating Monoterpenes with Anti-Depressant Potential. **Current Neuropharmacology**, 2025.

SILVA, A. J. ; SILVA, P. R. ; PIRES, H. F. O. ; DIAS, A. L. ; CASTRO, R. D. . Orofacial antinociceptive effect of a novel 2-aminothiophene derivative and its possible targets of action. **Brazilian Oral Research**, 2025.

DIAS, A. L. ; SILVA, P. R. ; PIRES, H. F. O. ; GONCALVES, M. C. F. ; FELIPE, C. F. B. ; SALVADORI, M. G. S. S. ; SCOTTI, L. A Review of Pathophysiology and Computational Studies of Isoeugenol-Derived Acetamides Against Alzheimer's Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2025.

3. Capítulos de livro publicados:

GONÇALVES, M. C. F.; MATOS, A. L. C. S.; RODRIGUES, B. F. A.; NERI, L. C. D.; PIRES, H. F. O. Clinical Pharmacist's Role in Managing Patients with Chronic Kidney Disease: a Review. **Brazil in Advancing Pharmacotherapy and Clinical Pharmacy in Latin America: Proceedings of the Fourth Brazilian Congress of Pharmacotherapy and Clinical Pharmacy**. 1ed.: Supervisão Clínica, , v. , p. 1, 2024.

GONÇALVES, M. C. F.; MATOS, A. L. C. S.; RODRIGUES, B. F. A.; NERI, L. C. D.; PIRES, H. F. O. The Role of the Clinical Pharmacist in the Implementation of Antimicrobial Stewardship Programs. **Brazil in Advancing Pharmacotherapy and Clinical Pharmacy in Latin America: Proceedings of the Fourth Brazilian Congress of Pharmacotherapy and Clinical Pharmacy**. 1ed.: Supervisão Clínica, v. 1, p. 590, 2024.

4. Coorientação de Trabalho de Conclusão de Curso:

DIAS, A. L. ESTUDO NÃO-CLÍNICO DO POTENCIAL ANSIOLÍTICO-SÍMILE E ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DA SEMENTE DE *Juglans regia* Linn (NOZ INGLESA). Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia - Farmacêutico) - **Universidade Federal da Paraíba**, 2024.