

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

***Lippia alba* (Mill.): Caracterização neuroquímica / neuroetológica e
fitoquímica.**

Dissertação apresentada a
Universidade de Ribeirão
Preto – UNAERP, para a
obtenção do grau de
mestre em Biotecnologia.

Aluno: ANTONIO COUTINHO NETO

RIBEIRÃO PRETO - SP
FEVEREIRO / 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

***Lippia alba* (Mill.): Caracterização neuroquímica / neuroetológica e
fitoquímica.**

Aluno: ANTONIO COUTINHO NETO

Dissertação apresentada a
Universidade de Ribeirão
Preto – UNAERP, para a
obtenção do grau de
mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Renê
de Oliveira Beleboni.

Co-orientador: Prof. Dr.
Paulo Sérgio Pereira.

Colaboradora: Prof^a. Dr^a.
Ana Maria Soares Pereira.

RIBEIRÃO PRETO - SP
FEVEREIRO / 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Isabela Esteves Cury Coutinho pelo apoio e incentivo, que me deu durante esses dois anos, pois sem seu amor, amizade, carinho, compreensão, não seria possível a conclusão dessa dissertação.

À minha mãe Rosa e ao meu pai Elio, pela dedicação com que fui criado, pelos valores os quais amadureci.

Ao meu sogro Roberto e a minha sogra Arligene, pela amizade e carinho que nasceu nestes últimos dez anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni, me orientou, me guiou nesse mundo de pesquisa, por sua amizade cultivada em tão pouco tempo.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, que me co-orientou brilhantemente, me fez ver o mundo através da química orgânica, também um amigo.

À Prof^a Dr^a Ana Maria Soares Pereira, que colaborou para que fosse possível a conclusão desse trabalho, me estimulando com sugestões.

Aos Professores Doutores da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, que contribuíram para minha formação e realização desse curso com sucesso.

Aos Técnicos dos laboratórios, pois sem eles nada seria realizado com tamanha destreza, fica um grande abraço para Carla, Valéria, Sara, Simone, José, Soninha e Edi.

Aos Três jardineiros Paulo, Niquinho e Buscapé, responsáveis pela preparação do solo, mudas e pelo cuidado de nossa coleção de plantas medicinais.

Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto por permitir a realização de parte dos experimentos de neuroquímica, também as técnicas Vera e Silvinha pela colaboração e auxílio.

Aos meus amigos Eldo e Rosana, pela amizade e ajuda nos momentos precisos pelos quais passei e Ribeirão Preto.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que trabalham em favor da preservação e estudo das Plantas Medicinais.

Este conhecimento etnofarmacológico tem importância fundamental no reconhecimento das propriedades farmacológicas, dos princípios ativos e dos usos para os quais as Plantas Medicinais popularmente são utilizadas, e como meio de tratamento alternativo para as pessoas sem recursos econômicos.

Que a biodiversidade da região Norte seja olhada, preservada, estudada e desenvolvida, pois assim teremos matéria prima para garantir novas substâncias que venham a contribuir para uma sociedade mais saudável e consciente.

Preservar é garantir sua própria sobrevivência.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS _____	I
LISTA DE FIGURAS _____	II
LISTA DE TABELAS _____	III
ABSTRACT _____	IV
RESUMO _____	V
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Epilepsia _____	13
1.2. O envolvimento do L-glutamato e GABA nas epilepsias _____	14
1.2.1. L-Glutamato (L-glu) _____	15
1.2.2. Ácido gama-aminobutírico (GABA) _____	17
1.3. Plantas medicinais com propriedades anticonvulsivantes: <i>Lippia alba</i> (Mill) _____	20
2. OBJETIVO GERAL _____	25
2.1. OBEJETIVOS ESPECIFICOS _____	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Produção, plantio de mudas e coleta de <i>Lippia alba</i> (Mill) _____	26
3.2 FITOQUÍMICA	
3.2.1. Preparação dos extratos vegetais e extração de óleos essenciais _____	28
3.2.2. Análises fitoquímicas por CCDC e CG-EM _____	29
3.3. Procedimento experimental neuroetológicos utilizando o modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol (PTZ) _____	30
3.4. NEUROQUÍMICA	
3.4.1. Preparação dos sinaptosomas _____	32
3.4.2. Estudo da recaptação do ³ H-GABA e ³ H-glutamato em sinaptosomas (curvas dose-resposta) _____	32
3.4.3. Preparação das membranas sinaptosomais para os estudos de “ <i>binding</i> ” _____	34
3.4.4. Estudo do “ <i>binding</i> ” do ³ H-GABA e ³ H-glutamato em membranas sinaptosomas (curvas dose-resposta) _____	34
4. RESULTADOS	
4.1. Análises Fitoquímicas _____	36
4.2. Análises Neuroetológicas _____	38
4.3. Análises Neuroquímicas _____	41
5. DISCUSSÃO _____	45
6. CONCLUSÃO _____	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	58

ABREVIATURAS

AP5	D-2-amino-5-fosforo pentanoato;
BAW	<i>N</i> -Butanol:Ácido Acético:Water (4:1:5);
CCDC	Cromatografia de Camada Delgada;
CG-EM	Cromatografo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas;
CPM	Cintilador líquido;
DL-AP4	2-amino-4-fosfonobutirato;
DPM	Desintegrações por minuto;
DZP	Diazepam;
EH	Extrato hidroalcoólico;
eV.	Eletro volt;
GABA	Ácido gama-aminobutírico;
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase;
i.p.	Intraperitoneal;
L-glu	L-glutamato;
lib.	Libras;
mL	mililitros;
mM	milimolar;
mm	milímetro;
NMDA	N-metil-D-aspartato;
nM	nanomolar;
NT	Neurotransmissor;
POPOP	1,4-bis[5-fenil-2oxazol]-benzeno, 2,2''-p-feniloxazol;
PPO	2,5-difenil oxazol;

PTZ	Pentilenotetrazol;
rpm	Rotações por minuto;
SNC	Sistema Nervoso Central;
TCA	Ácido tricloroacético;
v.o.	Via Oral;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Forma estrutural do L-Glutamato - L-glu – 17
- Figura 2.** Forma estrutural do Ácido gama-aminobutírico – GABA – 19
- Figura 3.** Exemplar da planta medicinal *Lippia alba* (Mill), pertencente a coleção de plantas medicinais da Unidade de Biotecnologia da UNAERP (foto do arquivo pessoal) –24
- Figura 3.1.** Beta-mirceno, limoneno, linalol e isômeros do citral e carvona substâncias encontradas no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) (SMITH *et al.*,2006) – 24
- Figura 4.** Preparação das estacas das variedades de *Lippia alba* (Mill) na Unidade de Biotecnologia da UNAERP (foto do arquivo pessoal) – 27
- Figura 5.** Disposição esquemática do plantio das 07 variedades de *Lippia alba* em terreno adequado de aproximadamente 40 m² no sítio Terra de Ismael (Jardinópolis-SP) – 27
- Figura 6.** Aparelho de “clevenger” e amostra de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) em destaque. (foto do arquivo pessoal) – 28
- Figura 7.** Extratos de *Lippia alba* (Mill) sendo rotaevaporado. (foto do arquivo pessoal) – 29
- Figura 8.** Camundongo em crise clônica com perda do reflexo postural, obtendo o score 3, após tratamento com PTZ. (foto do arquivo pessoal) – 31
- Figura 9.** Placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCDC), revelada com vanilina sulfúrica e vapores de iodo, demonstrando o perfil fitoquímico dos sete quimiotipos e os padrões de mirceno, limoneno e citral. (Foto do arquivo pessoal). – 36
- Figura 9.1.** Placa de CCDC, revelada com vanilina sulfúrica, demonstrando o perfil variado do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3. (Foto do arquivo pessoal) – 36
- Figura 10.** Porcentagem de animais que entraram em convulsões induzidas por PTZ, 1 h após os diferentes tratamentos. *p<0,05. – 39
- Figura 11.** Tempo de Latência para a Morte dos animais que entraram em convulsão entre os diferentes tratamentos. *p<0,05. – 40
- Figura 12.** Porcentagem de sobrevivência dos animais após os 30 min. da administração do PTZ entre os diferentes tratamentos. *p< 0,05. – 40
- Figura 13.** Tempo médio decorrido para o aparecimento da primeira crise convulsiva nos diferentes tratamentos (Latência). *p<0,05. – 40
- Figura 14.** Duração média em segundos da primeira crise convulsiva registrada nos diferentes grupos. * p<0,05. – 41
- Figura 15.** Pontuação com base no grau de severidade das crises durante as convulsões induzidas por PTZ 1 h após os diferentes tratamentos. *p < 0,05. – 41
- Figura 16.** Curva dose-resposta mostrando o efeito inibitório do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) na recaptção H³-GABA em sinaptosomas cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1

mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. – 42

Figura 17. Curva mostrando o discreto efeito inibitório do extrato hidroalcólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) na recaptação H^3 -glutamato em sinaptosomas cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$. – 42

Figura 18. Curva dose-resposta mostrando o efeito inibitório do extrato hidroalcólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) no “binding” H^3 -GABA em membranas sinaptosomais cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. – 43

Figura 19. Curva o discreto efeito inibitório do extrato hidroalcólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) no “binding” de H^3 -glutamato em membranas sinaptosomais cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$. – 44

Tabelas

Tabela 1. Percentagem das substâncias no óleo essencial dos quimiotipos de *Lippia alba*, analisados por cromatografia gasosa de alta eficiência. – **37**

Tabela 2: Perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3, destacando-se a presença das substâncias indicadas. – **38**

ABSTRACT

The epilepsy is a very common neurological disorder, which affects millions of people around the world. Molecular mechanisms implicated with generation and persistence of convulsions always involve an imbalance between GABA and L-glutamate neurotransmitter systems. Based on this concept, the search for new drugs from different sources has increased in the last decades. Recently, many evidences have demonstrated that the *Lippia alba* (Mill.) leaf extract as well as its essential oils presents anticonvulsant properties or sedative ones. However, explanations involving the molecular mechanism related to those activities are frequently insignificant or absent. The present work provides a neurochemical, neuroethological and phytochemical characterization of *L. alba* (Mill.) leaf extract or its essential oils. In our phytochemical analyses we could observe a great diversity of compounds, which might explain the high variance of anticonvulsant responses observed from each chemotype assayed in the neuroethological experiments. Based on its anticonvulsant activity, the extract from LP3 chemotype, was assayed for its effects on H³-GABA / H³-L-glutamate uptake and binding using synaptosomal assay. LP3 extract was particularly able to inhibit the GABA uptake and to modify the GABA binding, which could be a clue to explain the anticonvulsant activity of *L. alba* (Mill.) extract at molecular level.

Key-words: Anticonvulsants; GABA, L-glutamate; *Lippia Alba* (Mill); Neuroethology; Neurochemistry; Phytochemistry.

RESUMO

A epilepsia, um problema médico-epidemiológico relevante, caracteriza-se como uma desordem neurológica evidente e comum, sem limitações por barreiras sócio-étnicas, etárias ou sexuais. Os mecanismos neurais vinculados à geração e persistência das crises epiléticas envolvem alterações marcantes no equilíbrio entre os sistemas excitatórios e inibitórios do Sistema Nervoso Central (SNC). Com efeito, a prospecção por novos compostos, de diferentes naturezas químicas e origens biológicas, capazes de aumentar ou diminuir, respectivamente, as atividades sinápticas GABAérgicas e/ou glutamatérgicas têm merecido interesse denotado no desenvolvimento racional de drogas potencialmente anticonvulsivantes. Estudos recentes, têm demonstrado de maneira preliminar, que o extrato hidroalcoólico de folhas do subarbusto *Lippia alba* (Mill.), bem como óleos essenciais provenientes das mesmas apresentam potenciais atividades anticonvulsivantes, ou mesmo, miorrelaxantes e sedativas. Contudo, dados que descrevam acerca dos mecanismos moleculares/neurobiológicos envolvidos na expressão de tais atividades são insignificantes ou ausentes. Assim, o presente trabalho cumpre numa caracterização fitoquímica aplicada e neuroquímica/neuroetológica do(s) extrato(s) hidroalcoólico(s) ou óleos essenciais de folhas de *L. alba*. As análises fitoquímicas de extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais, por meio de Cromatografia em camada delgada ou Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas, revelaram grande variedade e diversidade de compostos entre os sete (07) quimiotipos de *L. alba* estudados, sendo encontrados para a maioria dos casos, os componentes citral, beta-mirceno e limoneno, tidos até então, como os principais compostos responsáveis pela atividade anticonvulsivante demonstrada pela planta. As análises neuroetológicas comprovaram atividades anticonvulsivantes variadas para os diferentes quimiotipos, destacando-se mais significativamente, em termos de eficácia, o quimiotipo LP3. Para as análises neuroquímicas, o extrato hidroalcoólico deste quimiotipo (LP3) foi avaliado quanto aos seus efeitos na recaptção de H³-GABA e H³-L-glutamato e ligação a receptores GABAérgicos/glutamatérgicos em modelos sinaptosomais, demonstrando particularmente uma inibição da recaptção GABAérgica e alteração da ligação de H³-GABA em seus receptores, o que pode explicar pelo menos parcialmente, os efeitos anticonvulsivantes da *L. alba* em níveis moleculares, contribuindo, pois, para o desenvolvimento mais avançado e a compreensão mecanística de compostos(s) de potencial interesse farmacológico.

Palavras-chaves: Anticonvulsivantes; Fitoquímica; GABA; Glutamato; *Lippia alba* (Mill.); Neuroetologia; Neuroquímica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epilepsia

A epilepsia é uma desordem da função cerebral denotada pela ocorrência repetida de ataques epiléticos convulsivos ou não. Uma síndrome epilética é um conjunto de características clínico-neurofisiológicas bem estabelecidas, caracterizadas como manifestações clínicas de descargas neuronais anormais, hiperativas e/ou hipersíncronas no córtex cerebral e regiões subcorticais (ENGEL, 1993). Os mecanismos neurais vinculados à geração e persistência das epilepsias envolvem alterações marcantes no equilíbrio entre os sistemas excitatórios e inibitórios do Sistema Nervoso Central (SNC), podendo ser manifestações das crises, sensoriais, psíquicas, autonômicas ou motoras, de acordo com a região afetada (ENGEL, 1993; DELGADO-ESCUETA *et al.*, 1999).

A epilepsia caracteriza-se como uma desordem neurológica evidente e comum, sem limitações por barreiras sócio-étnicas, etárias ou sexuais (GOMES, 2000). Cerca de 01-02% da população mundial é afetada pela desordem, enquanto, 10% de toda a população irá sofrer pelo menos uma crise epilética ao longo da vida. Estudos brasileiros ratificam os coeficientes mundiais, relatando cerca de 119 casos para cada 10.000 habitantes na cidade de São Paulo (MARINO *et al.*, 1986; GUERREIRO *et al.*, 2000).

Por mais amplo que seja o arsenal terapêutico utilizado no tratamento das epilepsias atualmente, muito ainda precisa ser avançado, sobretudo acerca, da potência das drogas úteis, da redução substancial de efeitos colaterais, do aumento da especificidade de ação, bem como de correções de solubilidade e estabilidade química (KROGSGAARD-LARSEN *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2001; PERUCCA, 2005). Com efeito, a prospecção avançada de novas drogas

anticonvulsivantes de diferentes naturezas químicas e de variadas fontes biológicas, aliada a modificações estruturais de compostos conhecidos, bem como aos estudos avançados acerca do mecanismo específico de ação, apresenta marcada valia para um controle mais efetivo e duradouro das crises epiléticas, bem como ainda, para uma compreensão mais vigorosa do funcionamento cerebral normal e patológico (PERUCCA, 2005).

1.2. O envolvimento do L-glutamato e GABA nas epilepsias

1.2.1. L-Glutamato (L-glu)

O aumento da atividade excitatória, particularmente mediada pelo glutamato (Figura 1) em seus receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), tem assumido papel denotado na etiogênese das epilepsias desde longa data (BRADFORD, 1995). Dado o volume substancial e variado de informações a este respeito, apenas um breve compêndio das principais evidências acerca do envolvimento deste aminoácido na etiologia das crises epiléticas será introduzido nesta sessão.

A grande coleção de dados, obtida por microdiálise de focos epiléticos em modelos animais nos últimos 25 anos, é bastante extensa e não deve ser ignorada. Segundo a maioria destes resultados, um nível bastante elevado de glutamato pode ser detectado no início e desenvolvimento dos quadros epiléticos numa gama variada de experimentações. Neste contexto, MINAMOTO *et al.*, (1992) têm demonstrado relevantes aumentos na liberação deste neurotransmissor no hipocampo de ratos (02-08 vezes) ao longo dos diferentes estágios do abrasamento amigdalár. Estes dados estão em comum acordo com aqueles obtidos posteriormente por UEDA e TSURU (1994), empregando análises similares. Adicionalmente, DURING e SPENCER (1993) relataram uma sustentada elevação

dos níveis extracelulares de glutamato (02 vezes) em hipocampos de pacientes epiléticos. Ainda neste sentido, é também comum observar aumentos consideráveis nas concentrações extracelulares de glutamina, dado o aumento da síntese glial deste componente em resposta aos níveis aumentados de seu precursor metabólico. O aumento de glutamina pelo metabolismo do glutamato é uma das estratégias empregadas pelo cérebro em estado epilético na tentativa de anular os efeitos lesivos causados pelo glutamato, por meio da inativação deste último (KAURA *et al.*, 1995).

Biópsias de cérebros de pessoas portadoras de epilepsia mostraram coeficientes aumentados de glutamato, sem alterações significativas das quantidades presentes de GABA e aspartato (PERRY e HANSEN, 1981). Embora controversas e raras, as dosagens de neurotransmissores no plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes acometidos pela epilepsia podem contribuir com dados importantes acerca da relevância do glutamato na desordem neurológica. Neste sentido, PLUM (1974) revelou quantidades aumentadas deste neurotransmissor no líquido cefalorraquidiano de pacientes epiléticos não tratados. Por outro lado, MUTANI *et al.*, (1975) reportaram níveis diminuídos para indivíduos em terapia e controle satisfatório dos quadros de crises.

Estudos autoradiográficos para a ligação de ácido caínico e H³-glutamato em tecido extraído do lobo temporal anterior de pacientes epiléticos revelou uma população aumentada de receptores NMDA em regiões do giro parahipocampal, em contraposição a quantidades diminuídas destes receptores nas regiões esclerótica (CA3), CA1 e hilo do hipocampo (GEDDES *et al.*, 1990). Apesar da corrente refutabilidade destes resultados, é possível estabelecer que modificações constatadas na estrutura ou quantidade de receptores podem estar vinculadas a

etiogênese das epilepsias, em adição às concentrações alteradas de neurotransmissores.

A administração intracerebroventricular ou sistêmica de glutamato e de seus agonistas, como o NMDA, tem sido empregada por muito tempo na indução de crises epiléticas em modelos animais. Seguindo este propósito, o NMDA tem sido também utilizado na produção de abrasamento químico de diferentes estruturas cerebrais *per se*, ou de modo a facilitar o abrasamento elétrico (CROUCHER *et al.*, 1992, 1995). A aplicação de antagonistas de glutamato, notadamente D-2-amino-5-fosfono pentanoato (AP5) em focos epiléticos produzidos pelo uso de cobalto, bloqueia o aparecimento de crises motoras e hiperatividade eletroencefalograficamente registrada em ratos, confirmando que a quantidade elevada deste aminoácido na fenda sináptica é agente causal da epilepsia, o que contraria a hipótese inicial de que este evento pudesse ser simples consequência de sua manifestação (COUTINHO-NETTO *et al.*, 1981). Adicionalmente, AP5 inibe o potencial excitatório pós-sináptico em fatias de hipocampo abrasado por diferentes modos (MODY e HEINEMANN, 1987). Dados similares foram obtidos pelo emprego do agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos 2-amino-4-fosfonobutirato (D, L-AP4). Esta droga bloqueia a liberação de glutamato no início da crise epilética, bem como a extensão deste processo, causada pelas altas concentrações deste neurotransmissor, observadas ao final da convulsão (COUTINHO-NETTO *et al.*, 1981).

Após as prospecções iniciais relacionadas aos usos de AP4 e AP5, muito se modificou acerca do entendimento de como o glutamato se vincula às epilepsias, bem como quanto à obtenção estratégica de novas terapias medicamentosas. Após as buscas empíricas, uma nova ordem, baseada no desenho ordenado e racional de

drogas a partir de AP4 e AP5 foi introduzida (BRADFORD, 1995; LOSCHER, 1998). Neste contexto, dentre outras drogas, a Lamotrigina (Lamictal®), um bloqueador da liberação glutamatérgica, tem sido largamente empregada na clínica das epilepsias (MILLER *et al.*, 1986).

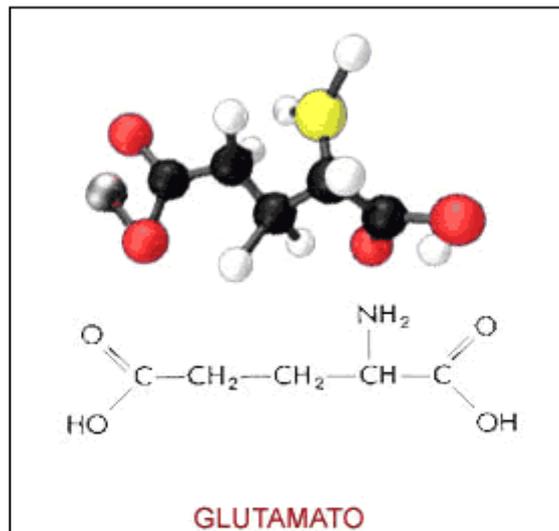


Figura 1 - Fórmula estrutural do L-Glutamato
(http://72.21.62.210/alcooledrogas/figuras/as_145_1.gif)

1.2.2. Ácido gama-aminobutírico (GABA)

A implicação da neurotransmissão GABAérgica na patogenia das epilepsias, sobretudo nas localizadas, se apresenta como hipótese coerente, pois a alteração de um sistema inibitório repercute no predomínio relativo dos sistemas excitatórios, especialmente mediados pelo glutamato, como extensamente demonstrado por BRADFORD e DODD (1976) e MELDRUM (1989).

Biópsias de focos epilépticos apresentaram reduzida atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), bem como diminuição do número de receptores GABA_A (PITA-CALANDRE *et al.*, 1999). A diminuição dos níveis de

GABA (Figura 2) no fluido cefalorraquidiano de pacientes acometidos por diferentes tipos de epilepsia parece ser comum. Além disso, a inibição da GAD pode reproduzir em babuínos normais e geneticamente sensíveis quadros epilépticos disparados por estímulos luminosos (KROGSGAARD-LARSEN *et al.*, 1987; MELDRUM, 1989). Em modelos animais, um significativo decréscimo da população de neurônios GABAérgicos (30-50%), bem como uma reduzida quantidade de GABA (30-40% do normal) foram determinados em amígdalas de ratos submetidos à experimentação (LOSCHER e SCHWARK, 1987; KAURA *et al.*, 1995)

Por meio de microdiálise, experimentos com ácido nipecótico suportaram a idéia de que a reduzida população de transportadores GABAérgicos ou a perda de sua eficiência estão diretamente relacionados à atividade epiléptica em cérebros de ratos e humanos. Estas análises mostraram que a atividade do transporte reverso de GABA, normalmente estimulada por altas concentrações de glutamato na fenda sináptica e aumento intracelular de sódio por conta de uma atividade despolarizante duradoura, está diminuída quando dos quadros epilépticos nas condições experimentais (DURING *et al.*, 1995).

O aumento da concentração de GABA ou de sua atividade no encéfalo diminui a susceptibilidade a convulsões e condições epilépticas, segundo um grande conjunto de observações (METCALF, 1979; SHERIF e AHMED, 1995; BELEBONI *et al.*, 2004). Assim, um aumento da liberação de GABA, seja por exocitose clássica ou transporte reverso, ou ainda o aumento de sua atividade em seus receptores, bem como a sua reduzida recaptção da fenda sináptica, poderiam, em última análise, contribuir para proteção do SNC contra as condições epileptogênicas (BRADFORD, 1995).

Fármacos que atuam sustentando a transmissão GABAérgica, tais como agonistas ou moduladores de receptores (fenobarbital e benzodiazepínicos), inibidores da enzima GABA-T (vigabatrina), inibidores do transporte de GABA (NNC-711) e estimuladores de sua liberação (gabapentina) aparecem como boas opções terapêuticas. Neste sentido, o inibidor da recaptação de GABA NNC-711 e os ésteres do ácido nipecótico são potentes anticonvulsivantes em modelos experimentais de epilepsias, bem como algumas das drogas supracitadas, como a vigabatrina e benzodiazepínicos, têm sido largamente empregadas na clínica do cérebro em estado epiléptico (BERNÁSKOVA *et al.*, 1999). Por outro lado, drogas, como a semicarbazida, que bloqueiam a síntese endógena de GABA, concorrem para promoção de crises epiléticas, evidenciando mais uma vez a relevante participação deste neurotransmissor nos eventos que envolvem as mais variadas formas de epilepsia (MELDRUM, 1989).

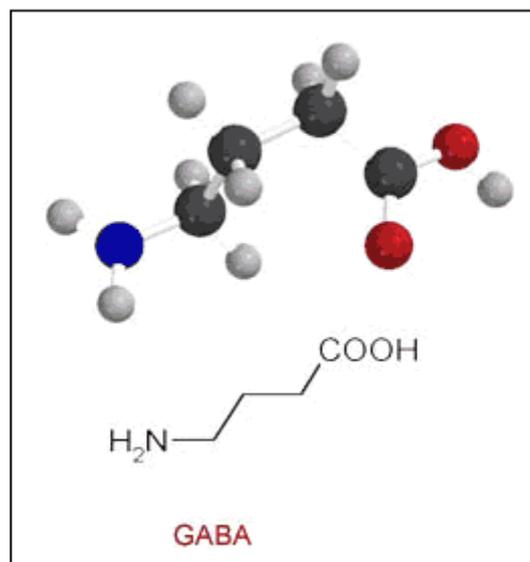


Figura 2 - Fórmula estrutural do Ácido gama-aminobutírico (GABA)
(http://72.21.62.210/alcooledrogas/figuras/as_145_1.gif)

1.3. Plantas medicinais com propriedades anticonvulsivantes: *Lippia alba* (Mill)

No Brasil, milhões de pessoas têm um acesso dificultado aos medicamentos em farmácias, sendo uma alternativa os medicamentos fornecidos pelo Sistema Único de Saúde – SUS ou ainda aqueles de origem popular e natural (CALLEGARI, 2000).

A “medicina” popular é uma fonte rica no indicativo para novos fármacos, sendo normalmente consultada para o desenvolvimento de novos medicamentos potencialmente mais seguros, eficazes e com menos efeitos colaterais. O uso de plantas preparada na forma de infuso, decocto e outras, com a finalidade de curar ou ao menos amenizar o sofrimento do doente, tem grande importância histórica, e também na atualidade para diversos grupos populacionais (OLIVEIRA, 2003).

Entre todos os medicamentos comercializados no mundo atualmente, cerca de 40% tiveram origem direta ou indiretamente de fontes naturais, salientando que 78% das drogas antibacterianas e 60% dos medicamentos antitumorais são derivados de produtos naturais. Destacam-se ainda aquelas com atividade no Sistema Nervoso Central (SNC), tais como cafeína, epinefrina, canabinóides, opióides e reserpina (CARLINI, 2003; DE SMET *et al.*, 1979).

A *Lippia alba* (Mill) (Figura 3), objeto primeiro de nossos estudos, é conhecida pelos nomes populares de falsa-melissa, carmelitana, erva-cidreira, lípia, cidreira, salva-limão, alecrim-do-campo, salva-do-brasil, cidreira-brava e pronto-alívio, dentre outros. Trata-se de um subarbusto de morfologia variável, alcançando até um metro e meio de altura, raramente dois metros, nativa de quase todo território brasileiro. Seus ramos são finos, esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços. As folhas são inteiras, opostas, de bordos serrados, com uma fina pilosidade e ápice agudo,

de 03–06 cm de comprimento. Flores azul-roxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Esta espécie está sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas, em função do meio ambiente onde se encontra (CORRÊA, 1992; GOMES *et al.*, 1993).

Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas. Produz a carvona, citral, β -mirceno, limoneno e linalol (Figura 3.1), substâncias de maior interesse farmacológico (ALONSO *et al.*, 2004; LORENZI e ABREU MATOS 2002). Segundo VIANA *et al.*, 2000, as principais espécies químicas envolvidas na atividade anticonvulsivante e sedativa, provavelmente, são o β -mirceno, limoneno e citral.

Desde os tempos remotos vem-se buscando também reino vegetal um tratamento mais efetivo para a epilepsia. A história deste tipo de tratamento com ervas é tão antiga quanto a história da própria civilização (ARORA *et al.*, 1958; ADESINA, 1982). Em 1882, Hyeronimus já observava as seguintes propriedades da *Lippia alba* (Mill): atividades espasmolítica suave, calmante, analgésica, sedativa e ansiolítica (ALONSO, 2004). O uso de extratos vegetais para o tratamento das convulsões aparece em revisões de ASHORKY *et al.*, 1987 e ADESINA 1982, onde os autores descrevem a ação farmacológica anticonvulsiva para mais de 50 plantas de diferentes famílias e gêneros. Demonstrou-se que alguns terpenóides presentes nestes extratos de plantas protegiam entre 10-40% das convulsões induzidas por PTZ (CHATURVEDI *et al.*, 1976).

Em meados de 1996, KLÜEGER *et al.*, utilizou infuso e destilado de *Lippia alba* (Mill.) para verificar o efeito depressor do SNC obtendo tal comprovação somente para o infuso na dose de 30 mg/Kg via i.p.; ainda em 1997, KLÜEGEL *et al.*, repetiram os testes anteriores utilizando agora as doses de 30, 100 e 300 mg/Kg pelas vias i.p. e v.o.. Os resultados foram os mesmos, ou seja, somente o infuso

apresentou atividade depressora do SNC. Os mesmos autores também analisaram uma fração butanólica nas mesmas concentrações e vias de administração, observando sua ação sedativa pela via i.p.. Esse efeito foi semelhante ao obtido anteriormente, quando da utilização do extrato aquoso também nas mesmas concentrações e vias, sendo a de melhor resultado a via i.p., demonstrando atividade sedativa.

SANTOS *et al.*, 1998, verificaram a ação depressora do SNC através da administração v.o. do extrato etanólico (40%, 60%, 80% e/ou 90%) nas concentrações 100 e 200 mg/Kg. VALE *et al.*, 1999, compararam e analisaram três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.), utilizando o óleo essencial nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg pela via i.p., obtendo comprovação dos efeitos ansiolíticos e sedativos dos compostos ensaiados.

Na contínua busca por resultados VIANA *et al.*, 2000, realizaram trabalhos com óleo essencial dos três quimiotipos supra mencionado, nas concentrações 50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg por via i.p. e v.o., obtendo resultados positivos na anticonvulsão induzida por PTZ. Com os resultados avançando em busca de uma ação mais efetiva. SOARES *et al.*, 2001, realizaram experimentos com extrato etanólico (40%, 60%, 80% e/ou 90%) nas concentrações 100, 200 e 400 mg/Kg. Também foi analisada uma fração butanólica nas mesmas concentrações, administrada por v.o. e i.p., onde verificou-se atividade anticonvulsivante no ensaio com PTZ. Simultaneamente foram realizados testes com duas subfrações butanólicas, SBN4-C e SBN4-D, nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 mg/Kg, apresentando também atividade anticonvulsivante no ensaio com PTZ.

GURGEL DO VALE *et al.*, 2002 analisaram os componentes citral, mirceno e limoneno, presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) nas doses 5, 25, 50, 100

e 200 mg/Kg, observando as atividades miorreaxantes e sedativa do tipo ansiogênica. Neste mesmo ano ZETÓLA *et al.*, utilizaram extratos etanólicos (40%, 60%, 80% e/ou 90%) na dose de 200 mg/Kg por v.o., observando as ações: sedativa, miorreaxante e anticonvulsivante.

Outros estudos têm demonstrado potentes efeitos anticonvulsivante, sedativo, miorreaxante e atividade antimicrobiana para os óleos essenciais da planta (VIANA *et al.*, 2000). Utilizada em toda América, seja em centros urbanos e/ou rurais, a literatura etnofarmacológica registra o uso do chá de cidreira (*Lippia alba* (Mill)), tanto por seu sabor agradável como pela ação calmante/sedativa atribuída pela medicina tradicional brasileira (BOORHEM *et al.*, 1999; MORS *et al.*, 2000). O amplo emprego desta planta nas práticas caseiras da medicina popular, aliado as descrições científicas supracitadas, faz-nos cercar de indicativos atraentes para sua escolha como tema farmacológico e clínico (LORENZI e ABREU MATOS 2002).

A maioria dos estudos descrevendo *L. alba* enfoca as atividades antimicrobiana, repelente e o efeito larvicida do óleo volátil e de diferentes extratos preparados a partir de diversas espécies de *Lippia*, e os trabalhos de isolamento de substâncias e de estudos detalhando seus efeitos farmacológicos são escassos, fazendo-se necessária uma maior investigação científica a fim de se validar o uso popular da *Lippia alba* (Mill), paralelamente é necessário fazer o levantamento etnobotânico das espécies medicinais de cada região fitogeográfica do Brasil (MATOS, 1997; MARQUES DE CARVALHO, 2006).

Ainda, dados que descrevam acerca dos mecanismos moleculares/neurobiológicos envolvidos na expressão de atividades farmacológicas ligadas ao SNC são insignificantes ou ausentes. A caracterização neuroquímica do extrato de

folhas da *Lippia alba* (Mill), avaliando suas atividades na recaptação e ligação a receptores GABAérgicos/glutamatérgicos, poderão contribuir para o desenvolvimento mais avançado e a compreensão mecanística mais alargada de compostos de potencial interesse farmacológico. Porém, a despeito do uso popular de plantas medicinais por muitos séculos, somente um número relativamente pequeno de espécies foi efetivamente estudado para possibilitar sua aplicação médica com segurança (ZHANG, 1998).



Figura 3 - Exemplar da planta medicinal *Lippia alba* (Mill), pertencente a coleção de plantas medicinais da Unidade de Biotecnologia da UNAERP. (Foto de acervo pessoal).

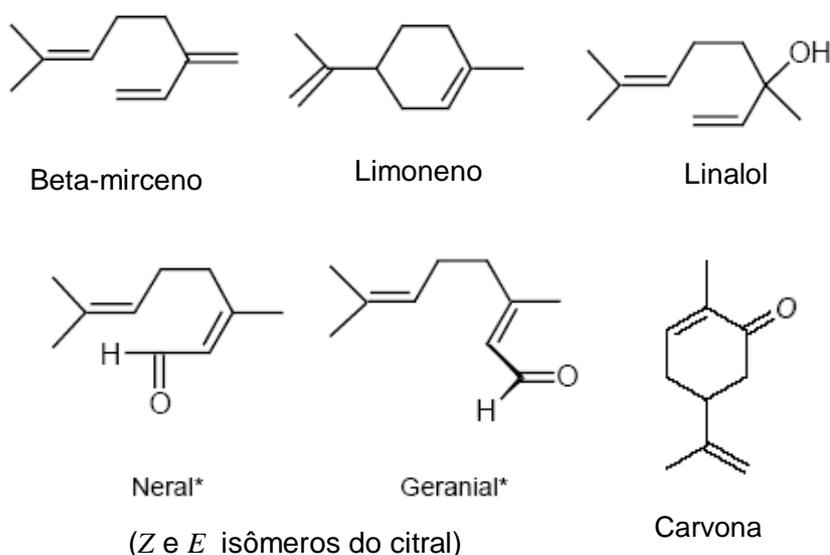


Figura 3.1 - Beta-mirceno, limoneno, linalol e isômeros do citral e carvona substâncias encontradas no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill). (SMITH *et al.*, 2006)

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o de estudar o efeito neuroquímico e neuroetológico do(s) extrato(s) hidroalcoólico(s) da(s) folha(s) do(s) quimiotipo(s) de *Lippia alba* (Mill.), bem como o de providenciar a análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais dos diferentes quimiotipos em estudo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir os diferentes quimiotipos de *Lippia Alba* (Mill.) em esquema de estaquia;
2. Caracterizar do ponto de vista fitoquímico os diferentes quimiotipos (07) de *Lippia alba* (Mill) por meio de Cromatografia em camada delgada (CCDC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) através da análise dos respectivos extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais;
3. Caracterizar do ponto vista neuroetológico os diferentes quimiotipos da planta através do modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos, avaliando a potencia/eficácia dos diferentes extratos hidroalcoólicos provenientes dos quimiotipos em estudo;
4. Tendo por base as análises neuroetológicas, providenciar a caracterização neuroquímica do extrato hidroalcoólico de um quimiotipo em particular (LP3) através de estudos de recaptção e/ou ligação a receptores (*binding*) do GABA e/ou glutamato por meio de ensaios em sinaptosomas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção, plantio de mudas e coleta de *Lippia Alba* (Mill.)

Sete quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) (07) foram plantados por estaquia e de modo a garantir as mesmas condições de desenvolvimento. A preparação e plantio das mudas deu-se como se segue:

1) As variedades de *Lippia alba* (Mill.) foram coletadas em Setembro de 2005, sendo cinco da região de Botucatu-SP e duas da coleção de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto-SP (UNAERP);

2) Preparou-se 100 mudas de cada variedade compreendendo um total de final de 700 preparações;

3) Como dito, o método de propagação utilizado foi o de estaquia, cada estaca apresentou um tamanho médio de 18 cm, com 2 pares de gemas laterais para formação de raízes e com um par de folhas (Figura 4);

4) O substrato utilizado para o cultivo das mudas foi uma mistura de terra, areia e adubo orgânico (Vitasolo) (1:1:1p/p). Este substrato foi acondicionado em saco plástico com 12 cm de comprimento e 6 de largura. As estacas foram mantidas em casa de vegetação por quatro meses na Unidade de Biotecnologia – UNAERP.

5) As mudas então foram transferidas para a Unidade Agrícola da UNAERP, situada no sítio Irmãos Marie (Terra de Ismael-Jaboticabal-SP). As mudas foram plantadas em uma área de aproximadamente 40m², como demonstrado no esquema abaixo (Figura 5). Após seis meses de cultivo, no mês de março de 2006, as partes aéreas foram colhidas e secas em estufa a 40 °C pelo período de uma semana.



Figura 4 - Preparação das estacas das variedades de *Lippia alba* (Mill.) na Unidade de Biotecnologia da UNAERP. (Fotos do acervo pessoal)

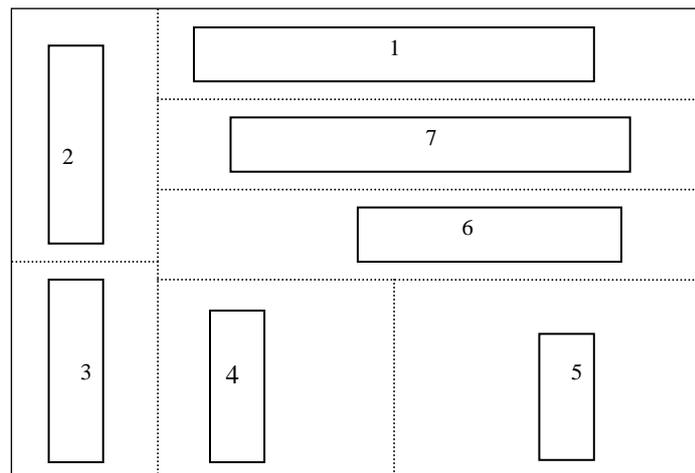


Figura 5 - Disposição esquemática do plantio das 07 variedades de *Lippia Alba*(Mill.) em terreno adequado de aproximadamente 40 m² no sítio Terra de Ismael (Jardinópolis-SP).

3.2 Fitoquímica

3.2.1. Preparação dos extratos vegetais e extração de óleos essenciais

Efetuuou-se a obtenção dos extratos e óleos essenciais dos sete quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.), enumerados de LP1-LP7, no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Unidade de Biotecnologia da UNAERP.

Óleos Essenciais: Para cada 20 gramas de folhas secas foram adicionados 250mL de água destilada, sendo cada um dos óleos essenciais obtidos após duas horas de extração em aparelho de “*clevenger*” (Figura 6). Salienta-se que a extração deu-se por hidrodestilação ou arraste por vapor d’água.

Extratos hidroalcoólicos: Para cada 100 gramas de folhas secas foram adicionados de 2L de álcool etílico 80% (v/v). A maceração ocorreu por 72 horas, o material obtido foi rotaevaporado a cada 24 horas para obtenção dos extratos brutos que posteriormente foram liofilizados (Figura 7).

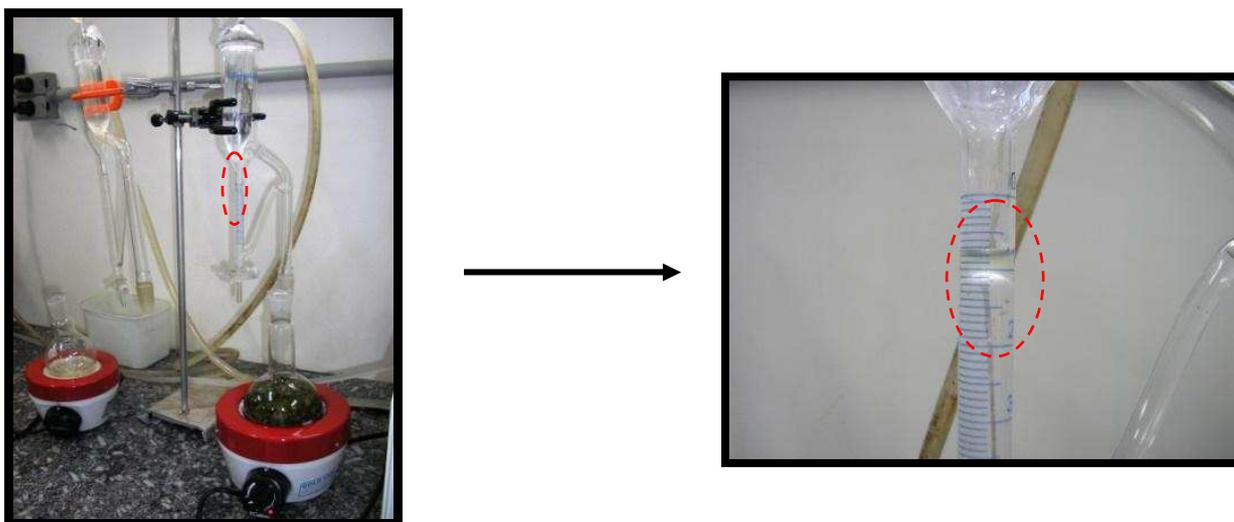


Figura 6 - Aparelho de “*clevenger*” e amostra de óleo essencial de um dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) em destaque. (Foto do arquivo pessoal)



Figura 7 - Extratos hidroalcoólicos de *Lippia alba* (Mill.) sendo rotaevaporados. (Foto do arquivo pessoal)

3.2.2. Análises Fitoquímicas por CCDC e CG-EM

Para as análises de CCDC, os diferentes extratos hidroalcoólicos (10mg/mL) foram aplicados em placas de sílica gel PF₂₅₄ (10 x 10 cm) tendo o hexano:acetado de etila (9:1) e BAW como fase móvel. As corridas em placa foram acompanhadas pelos respectivos padrões de identificação, em um tempo médio de corrida de 30 minutos e para BAW 60 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2004). A visualização foi realizada através dos reveladores de Caráter ácido/neutro ou luz UV: a) Luz UV ($\lambda=264\text{nm}$); b) Vapores de Iodo; c) Reativo de vanilina sulfúrica (AZEREDO *et al.*, 2004). O extrato LP3 foi fracionado em coluna de sephadex (6cm x 2,80m) usando como fase móvel o metanol puro (Merck), com fluxo contínuo de 2mL/minutos. Para a corrida das frações obtidas, usou-se uma placa de sílica gel PF₂₅₄ (10 x 20 cm) tendo o *n*-butanol/ácido acético/água (4:1:5, v/v) com fase móvel, perfazendo um tempo médio de corrida de 60 minutos. A revelação foi realizada seguindo os critérios supramencionados.

A análise fitoquímica dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos das sete variedades de *Lippia alba* por meio de CG-EM foi realizada em colaboração com o

IAC – Instituto Agronômico de Campinas, sob os cuidados da Prof^a. Dr^a Márcia Ortiz Mayo Marques, despendendo um tempo médio de 30 dias para as análises. O equipamento utilizado foi o Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas (Shimadzu, QP-5000) em que as condições de análise foram as que se seguem: Coluna capilar: DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm); Injetor: 240 °C; Detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL/min.; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/minuto; Volume de Injeção: 1 µL de solução (1 µL óleo essencial ou extrato/1mL Hexano). A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (McLafferty, 1989; Adams, 1995).

3.3. Procedimento experimental neuroetológicos utilizando o modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol (PTZ)

Foram empregados 11 grupos de 07 camundongos cada (Swiss, machos, 18-25g), onde um grupo recebeu o pré-tratamento com solução salina a 0,9% (grupo controle negativo), outro o diazepam (1mg/kg) (grupo controle positivo), e os 07 grupos restantes receberam os extratos hidroalcoólicos de cada um dos quimiotipos de *Lippia alba* (grupo experimental), separadamente, na concentração de 300mg/kg. Todas as administrações foram feitas via intraperitoneal (i.p.). Após 60 min., administrou-se o PTZ em todos os grupos na dose de 80 mg/kg, também pela via i.p. Os animais foram imediatamente observados por um período de 30 min., quanto aos seguintes parâmetros de avaliação: latência para o animal entrar em convulsão, duração das crises e número de mortes (Velisek *et al.*, 1991). Além disso, os resultados obtidos para cada um dos grupos foram avaliados através do grau de

intensidade (severidade) de acordo com o quadro abaixo, denominado como painel de “score”.

<u>Graus de intensidade</u>	
0	⇒ nenhum comportamento convulsivo
1	⇒ abalos mioclônicos
2	⇒ crises clônicas sem perda do reflexo de endireitamento
3	⇒ crises clônicas com perda do reflexo postural
4	⇒ convulsão com extensão das patas posteriores
5	⇒ extensão tônica com morte



Figura 8 - Camundongo em crise clônica com perda do reflexo postural, obtendo o score 3, após tratamento com PTZ. (Foto do arquivo pessoal)

Todo o experimento foi repetido por 03 vezes. Os dados foram analisados utilizando-se o teste *t* de Student ($p < 0,05$).

3.4. Neuroquímica

3.4.1. Preparação dos sinaptosomas

Os sinaptosomas foram confeccionados de acordo com método descrito por GRAY e WHITTAKER (1962), modificado por COUTINHO-NETTO (1980). Brevemente, as coleções de córtices (Ratos Wistar 200-250g) em sacarose 0,32 M (10-15% m/v), mantidas em banho de gelo, foram homogeneizadas a 900 rpm em homogeneizador Potter-Elhvejen, Labo-Stirrer LS-50 da Yamato (“Clearance” de 0,25 mm).

Em seguida, o homogeneizado obtido foi centrifugado a 1700 xg por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante coletado e novamente centrifugado a 21200xg, por 20 minutos a 4 °C. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e o precipitado reconstituído e lavados em tampão Krebs-Fosfato (NaCl 124 mM; KCl 5 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 0,75 mM; MgSO₄ 1,2 mM; Na₂HPO₄ 20 mM; glicose 10 mM, pH 7.4) (MERCK; Reagen). Os sinaptosomas assim confeccionados foram recolhidos e utilizados nos ensaios de recaptação ou para a feitura das membranas sinaptosomais utilizadas nos experimentos de “*binding*”.

3.4.2. Estudo da recaptação do ³H-GABA e ³H-glutamato em sinaptosomas (curvas dose-resposta)

O precipitado sinaptosomal ressuspendido em Krebs-fosfato foi suavemente homogeneizado em Potter, e seu conteúdo protéico determinado pelo método de LOWRY (1951), modificado por HARTREE (1972).

Os materiais radioativos ³H-GABA e ³H-glutamato foram adquiridos junto à Amersham Pharmacia Biotech. Os experimentos de captação foram iniciados pela

adição de 05 nM ^3H -GABA ou 10 nM de ^3H -glutamato (concentrações finais) à suspensão de sinaptosomas (0,1 mg de proteínas/mL, concentração final), sendo então todos os tubos incubados à 25⁰C (Experimentos com ^3H -GABA) ou 37⁰C (Experimentos com ^3H -glutamato) por 05 minutos, na presença ou ausência de diferentes concentrações (0,001235 à 0,1 mg/mL) de extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* (Quimiotipo LP3), para um volume final de 0,5 mL/tubo completado com o tampão Krebs-fosfato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos por 03 vezes.

A escolha do tempo de incubação, da concentração do substrato radioativo e de sinaptosomas foi feita de modo que os parâmetros permanecessem dentro da porção linear da curva de captação, como definido por experimentos prévios (dados não apresentados). As captações não-específicas foram determinadas através de amostras incubadas na presença de dos referidos transmissores não-marcados (concentração final de 1 mM). Os valores de captações inespecíficas que ficaram em torno de 5-15% para os experimentos de recaptação.

Após a incubação, o conteúdo dos tubos Eppendorf foi sedimentado por centrifugação por 3 minutos a 3000xg (microcentrífuga Eppendorf 5415C). Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados em água destilada gelada e acrescidos de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, agitados, e centrifugados por mais 3 minutos a 3000xg. Duzentos microlitros de cada sobrenadante obtido foram transferidos para frascos de cintilação contendo 5,0 mL de líquido de cintilação miscível em água (250 mL de Antarox, 750 mL de tolueno, 100 mg de POPOP e 5 g de PPO, para 1 litro) (SIGMA; MERCK). A radioatividade foi determinada em cintilador líquido LS-6800, da Beckman, com 2% de erro e eficiência de contagem para o ^3H de aproximadamente 35 a 40%.

As contagens obtidas pelo cintilador líquido (CPM) foram decrescidas dos valores de recaptção inespecífica e tratadas como porcentagens dos controles. A análise estatística foi feita por meio do teste *t*-Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.4.3. Preparação das membranas sinaptosomais para os estudos de “*binding*”

O precipitado sinaptosomal ressuspendido em tampão Tris-HCl (5mM, pH=7,4) foi homogeneizado em Potter e acrescido de maiores quantidades do mesmo tampão em banho de gelo sob agitação branda por 30 min., após o que fora novamente centrifugado a 16.000rpm por 5min. à 4⁰C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido e lavado por 07 vezes com tampão Tris-HCl (50mM, pH=7,4) (16000rpm/5min./ 4⁰C) e seu conteúdo protéico determinado pelo método de LOWRY (1951), modificado por HARTREE (1972). O material obtido (membranas sinaptosomais) é então aliqotado, centrifugado (16.000 rpm/5min./ 4⁰C) e armazenado a -20 ⁰C por pelo menos 18 horas.

3.4.4. Estudo do “*binding*” do ³H-GABA e ³H-glutamato em membranas sinaptosomas (curvas dose-resposta)

O sedimento congelado por pelo menos 18 horas é descongelado e novamente lavado por mais 05 vezes com tampão Tris-HCl (50mM, pH=7,4) (13.000rpm/5min./ 4⁰C), sendo finalmente ressuspendido em quantidade suficiente do mesmo tampão.

Os materiais radioativos ³H-GABA e ³H-glutamato foram adquiridos junto à *Amersham Pharmacia Biotech*. Os experimentos de “*binding*” foram iniciados pela adição de 10 nM ³H-GABA ou 25 nM de ³H-glutamato (concentrações finais) à

suspensão de membranas sinaptosomais (0,5 – 1 mg de proteínas mL, concentração final), sendo então todos os tubos incubados à 25⁰C (Experimentos com ³H-GABA) ou 30⁰C (Experimentos com ³H-glutamato) por 30 minutos, na presença ou ausência de diferentes concentrações (0,001235 à 0,1 mg/mL) de extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* (Quimiotipo LP3), para um volume final de 0,3 mL/tubo completado com o tampão Tris-HCl (50mM, pH=7,4). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos por 03 vezes.

As captações não-específicas foram determinadas através de amostras incubadas na presença de dos referidos transmissores não-marcados (concentração final de 1 mM).

Após a incubação, o conteúdo dos tubos Eppendorf foi sedimentado por centrifugação por 3 minutos a 3000xg (microcentrífuga Eppendorf 5415C). Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados em água destilada gelada e acrescidos de 0,21 mL de tampão Tris-HCl (50mM, pH=7,4) e homogeneizados. Cento e noventa microlitros de cada sobrenadante obtido foram transferidos para frascos de cintilação contendo 5,0 mL de líquido de cintilação miscível em água (250 mL de AntaroX, 750 mL de tolueno, 100 mg de POPOP e 5 g de PPO, para 1 litro) (SIGMA; MERCK). A radioatividade foi determinada em cintilador líquido LS-6800, da Beckman, com 2% de erro e eficiência de contagem para o ³H de aproximadamente 35 a 40%.

As contagens obtidas pelo cintilador líquido (CPM) foram decrescidas dos valores de “binding” inespecífico e tratadas como porcentagens dos controles. A análise estatística foi feita por meio do teste *t*-Student. Os valores de $p < 0,05$ e $0,01$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Análises Fitoquímicas

A Figura 9 mostra na placa de CCDC os perfis fitoquímicos dos extratos hidroalcoólicos provenientes dos diferentes quimiotipos de *L. alba* (Mill). Enquanto a figura 9.1 e a tabela 2 mostram a variedade de classes fitoquímicas presentes no extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3.

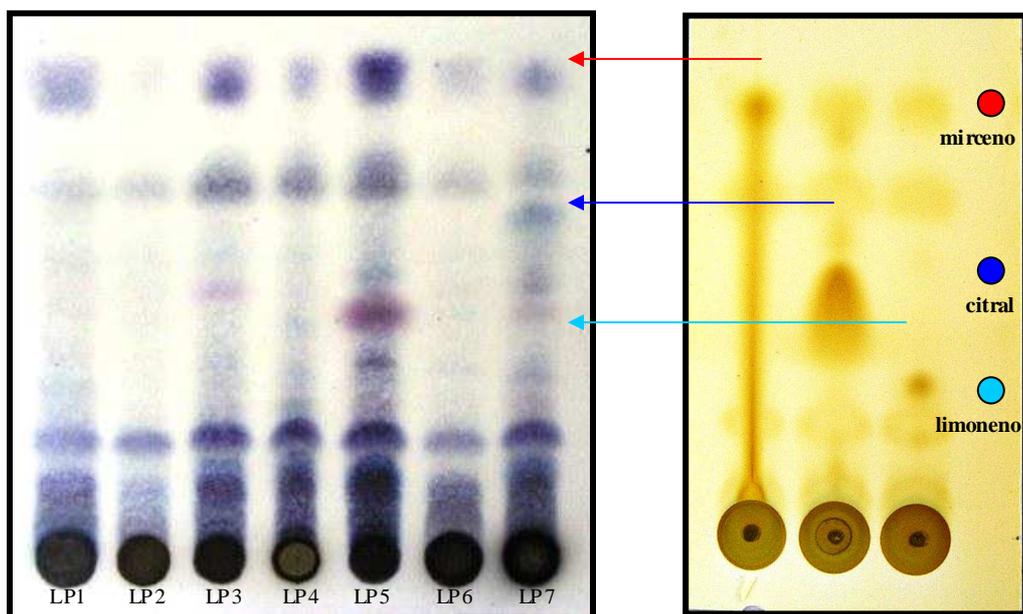


Figura 9 - Placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCDC), revelada com vanilina sulfúrica e vapores de iodo, demonstrando o perfil fitoquímico do extrato dos sete quimiotipos e os padrões de mirreno, limoneno e citral. (Foto do arquivo pessoal)

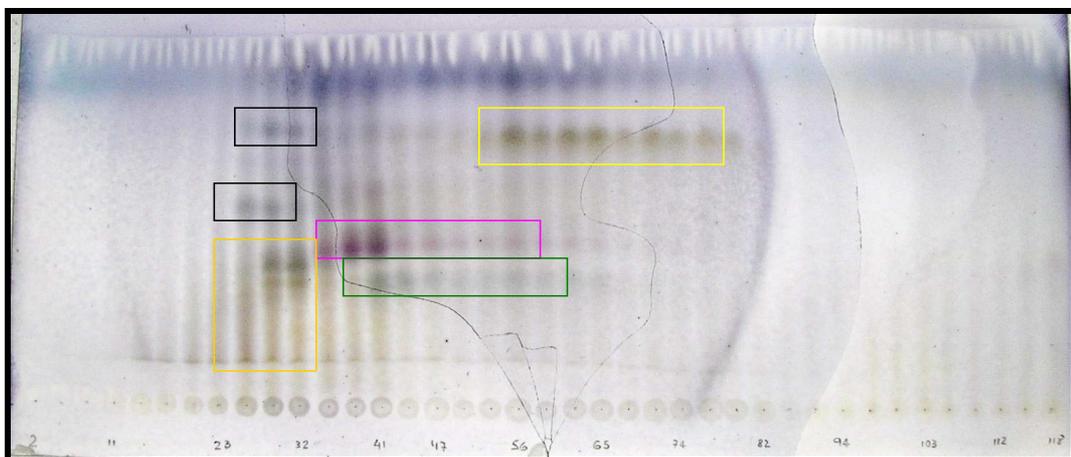


Figura 9.1 – Placa de CCDC, revelada com vanilina sulfúrica, demonstrando o perfil variado de frações do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3. (Foto do arquivo pessoal)

A Tabela 1 mostra os perfis fitoquímicos dos óleos essenciais dos diferentes quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) analisados por CG-EM, As mesmas análises realizadas para os extratos hidroalcoólicos não revelaram a presença de compostos voláteis, como os apresentados abaixo (Dados não apresentados), do mesmo modo que observado para a Figura 9.

Tabela1: Porcentagem das substâncias no óleo essencial dos quimiotipos de *Lippia alba*, analisados por CG-EM.

N° componente do óleo	IK ² *	IK ² **	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	LP6	LP7
α-pineno	932	926	-	-	-	5,62	-	-	-
sabineno	970	967	0,77	-	-	4,25	-	-	0,92
6-metil-5-hepten-2-one	979	985	-	tr	1,06	-	-	2,13	3,29
mircenol	988	991	-	4,95	15,42	52,03	-	14,07	1,75
limoneno	1026	1031	-	tr	-	1,43	17,54	-	16,62
1,8-cineol	1027	1033	8,80	-	-	-	-	-	-
Linalol	1098	1101	77,95	-	-	-	-	-	-
trans-sabinol	1140	1140	-	-	-	7,80	-	-	-
neo-iso-dihidro carveol	1225	1226	-	1,36	-	-	-	2,13	3,29
acetato de mirtenila	1235	1235	-	24,27	23,4	-	-	25,58	29,13
carvona	1244	1242	5,53	-	-	-	78,46	-	-
geraniol	1250	1255	-	1,53	-	-	-	-	0,95
geranial (Z-citral)	1265	1270	-	36,69	33,49	-	-	35,98	38,32
acetato de geranila	1379	1383	-	-	-	-	-	-	0,52
β-bourboneno	1383	1384	-	-	-	-	-	-	0,44
trans-cariofileno	1419	1418	2,13	11,00	14,17	7,07	-	12,14	-
α-guaieno	1438	1439	-	-	-	5,32	-	-	-
α-humuleno	1452	1454	-	-	-	2,39	-	-	-
germagreno D	1480	1480	-	2,13	1,77	3,65	1,94	-	4,69
α-(E-E)-farneseno	1504	1508	-	-	-	4,41	-	-	-
cubebol	1514	1514	-	-	-	-	-	-	0,35
óxido de cariofileno	1580	1581	-	5,71	3,99	-	-	4,30	-
[] Total % do óleo			95,18	87,64	94,12	85,17	97,94	94,20	96,79

* = IK² experimental; ** = IK² literatura; LP = variedade de *Lippia alba*; tr = traços (% ≥ 0,32).

Tabela 2: Perfil fitoquímico qualitativo do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3.

Substância(s)	Presente
Flavonóides	+
Terpenóides	+
Taninos	-
Saponinas	-
Alcalóides	-

4.2. Análises Neuroetológicas

As figuras apresentadas abaixo demonstram a atividade anticonvulsivante dos extratos hidroalcoólicos dos diferentes quimiotipos de *Lippia alba* (Mill), utilizados todos na mesma dose. Os animais foram tratados inicialmente com salina 0,9% para o controle negativo do teste, e os demais grupos foram tratados com os extratos dos sete quimiotipos de *Lippia alba* (300mg/kg) e o diazepam (1mg/kg) (controle positivo). Após 1 hora das administrações iniciais administrou-se o PTZ (80mg/kg), sendo os animais observados nos 30 min. subseqüentes.

A porcentagem de animais que apresentaram convulsão no grupo controle negativo de cerca de 76,2% dentro dos 30 minutos propostos para observação. Para os grupos tratados com os diferentes extratos a média ficou em torno de 40,21%, destacando-se o quimiotipo (LP1 e LP6 - 23,81% e LP3 - 28,57%), enquanto que nenhum dos animais convulsionou quando tratados com diazepam (controle positivo). (Figura 10).

A sobrevivência dos animais é evidenciada na Figura 11 de modo independente de os mesmos terem ou não apresentado crises convulsivas. Salienta-se que todos

os grupos experimentais mais o grupo controle positivo apresentaram altos índices de sobrevivência, destacando-se novamente os quimiotipos LP1, LP3 e LP6 (76,19%; 71,43% e 76,19%, respectivamente).

O tempo necessário para o que os animais que entraram em crise morressem (Latência para a morte) também é estendido em relação ao grupo controle positivo. Destacam-se aqui também o quimiotipo LP2 (Figura 11).

A latência ou espaço de tempo (minutos) até o primeiro evento convulsivo foi significativa para o extrato do quimiotipo LP7 (12,89%), prolongando assim, o estado de normalidade até o momento da primeira crise (Figura 12). Porém, somente os extratos dos quimiotipos LP1 (14" 03 seg.) e LP3 (09" 22 seg.) foram significativos em diminuir a duração da primeira crise convulsiva (Figura 13).

A análise de "score" avaliou a pontuação obtida pelos grupos controles e experimentais seguindo o critério de avaliação indicado no painel de "score" (item 3.3), supramencionado na secção metodológica. Nesta figura é demonstrado o grau de severidade das crises atingidas pelos animais, destacando-se novamente os tratamentos com os quimiotipos LP1 ($21,7 \pm 8,08$) e LP3 ($22,7 \pm 7,50$), onde na ocorrência de crises estas se mostraram mais brandas que nos demais grupos, a exceção do grupo controle positivo (Figura 14).

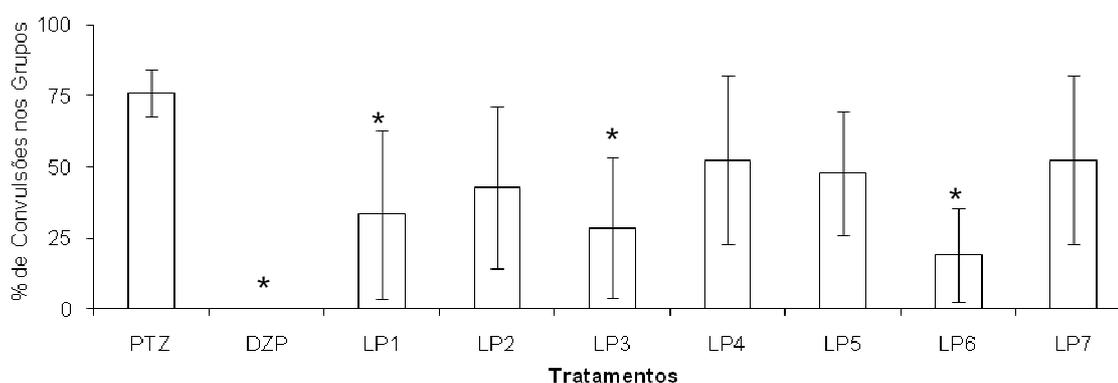


Figura 10 - Porcentagem de animais que entraram em convulsões induzidas por PTZ, 1h após os diferentes tratamentos. * $p < 0,05$.

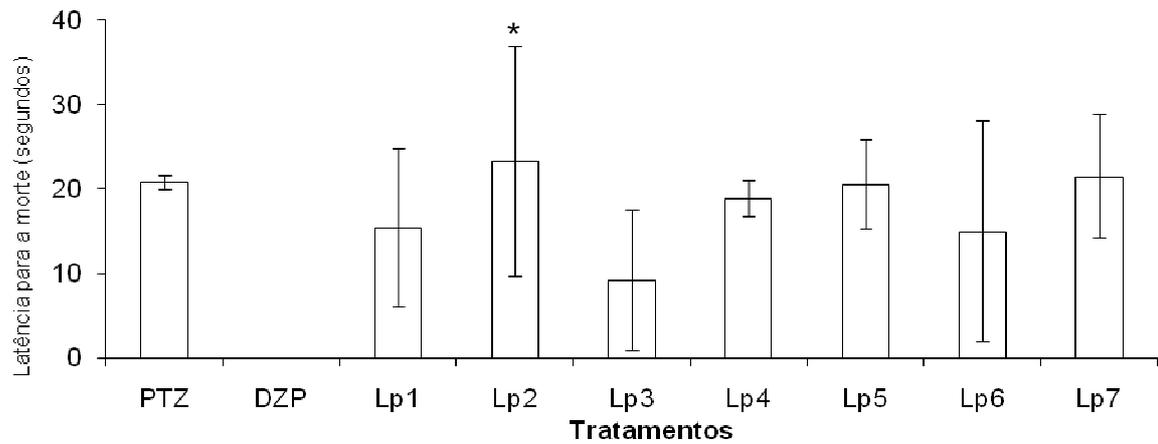


Figura 11 – Tempo de Latência para a Morte dos animais que entraram em convulsão entre os diferentes tratamentos. * $p < 0,05$.

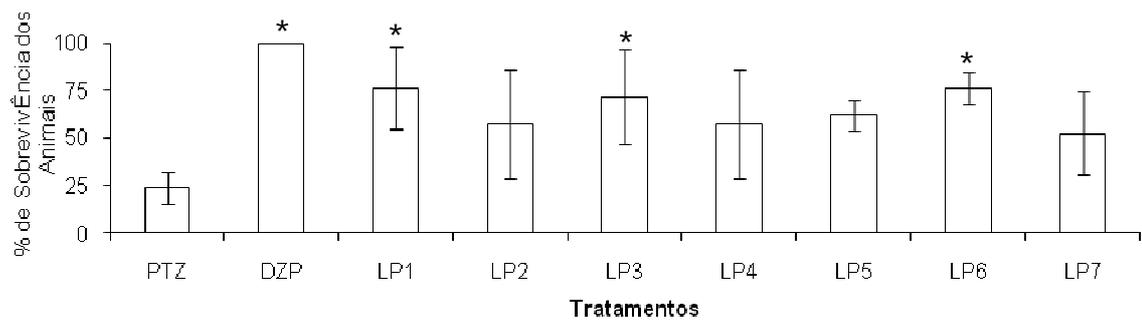


Figura 12 - Porcentagem de sobrevivência dos animais após os 30 min. da administração do PTZ entre os diferentes tratamentos. * $p < 0,05$.

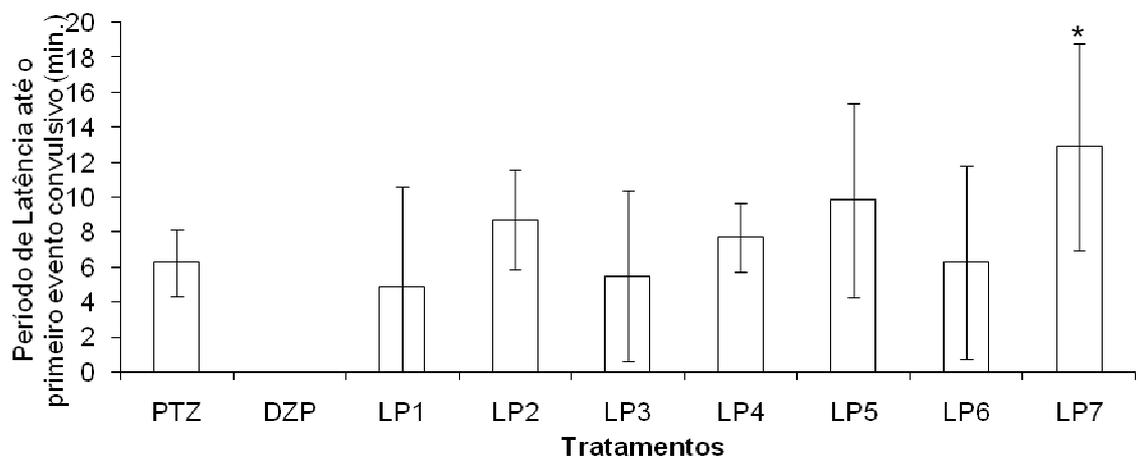


Figura 13 - Tempo médio decorrido para o aparecimento da primeira crise convulsiva nos diferentes tratamentos (Latência). * $p < 0,05$.

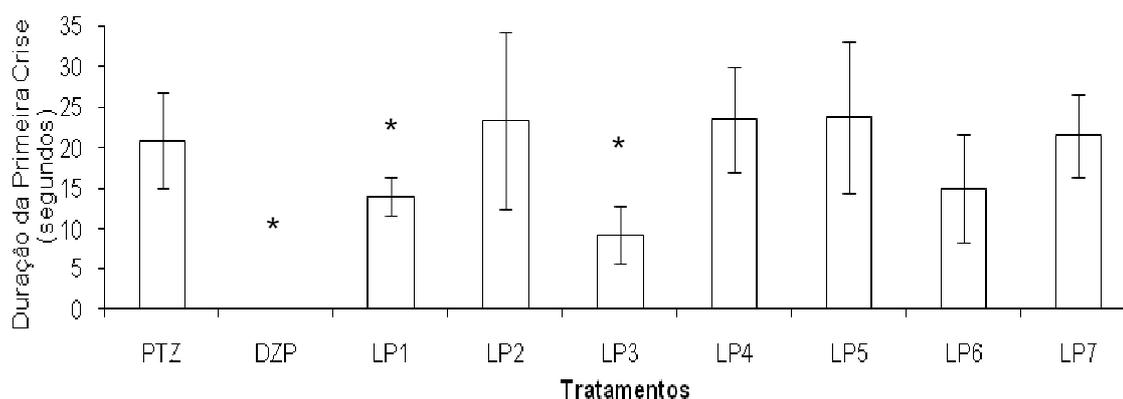


Figura 14 - Duração média em segundos da primeira crise convulsiva registrada nos diferentes grupos. * $p < 0,05$.

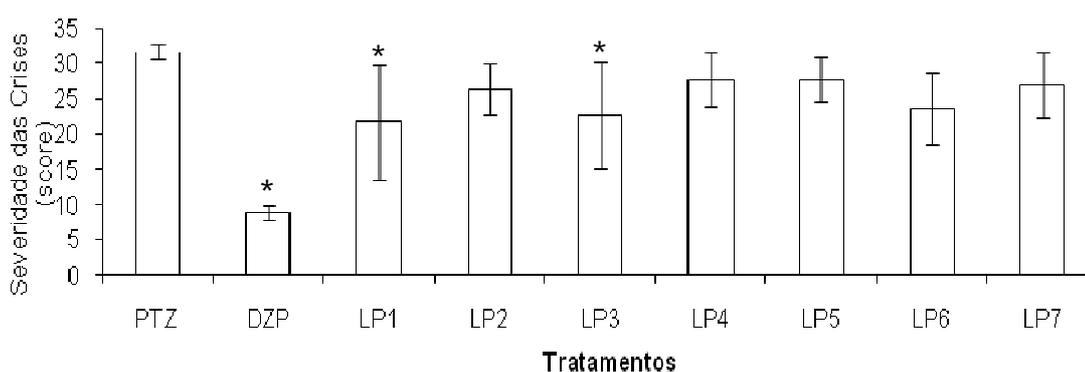


Figura 15 - Pontuação com base no grau de severidade das crises durante as convulsões induzidas por PTZ 1h após os diferentes tratamentos. * $p < 0,05$.

4.3. Análises Neuroquímicas

As Figuras 16 e 17 mostram os resultados da recaptação sinaptossomal de H^3 -GABA e H^3 -glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *Lippia alba* (Mill.). Pode-se observar o efeito inibitório dose-dependente do extrato sobre a recaptação de H^3 -GABA, com alterações relativamente muito pouco expressivas ou significantes para o caso da recaptação de H^3 -glutamato.

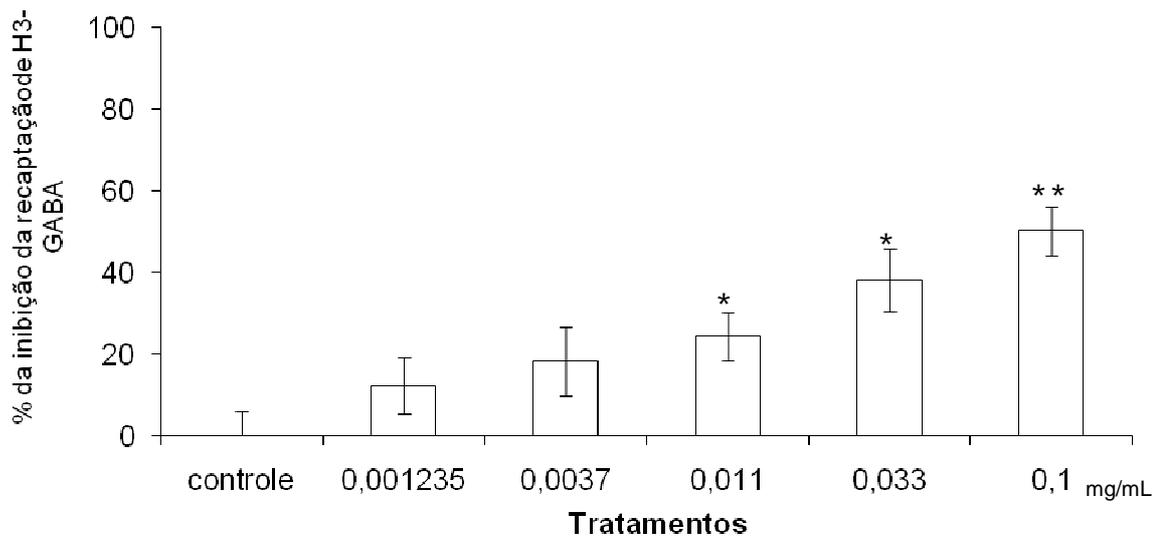


Figura 16 - Curva dose-resposta mostrando o efeito inibitório do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) na recaptação H^3 -GABA em sinaptosomas cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

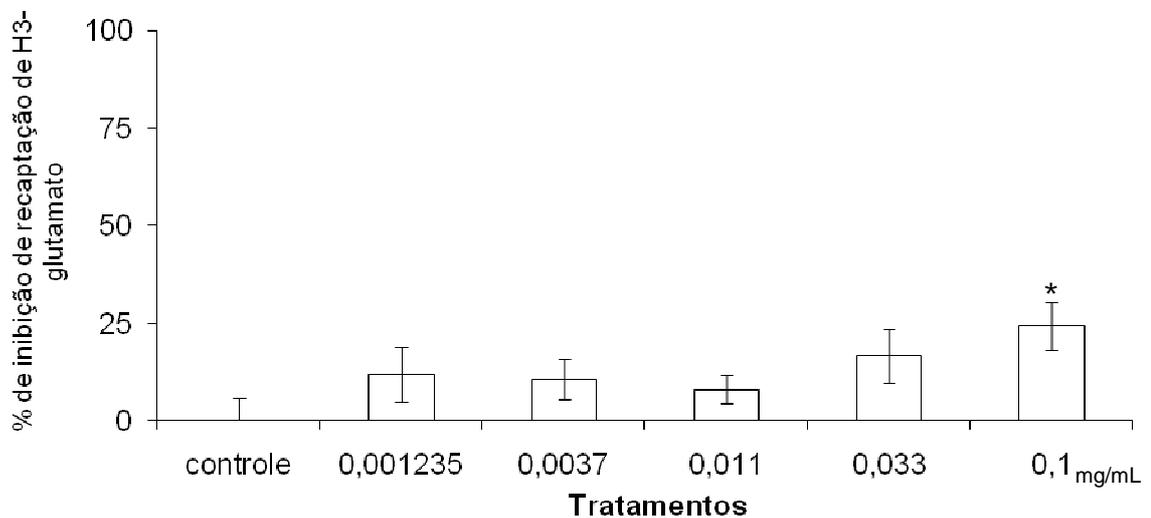


Figura 17 - Curva mostrando o discreto efeito inibitório do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) na recaptação H^3 -glutamato em sinaptosomas cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

As Figuras 18 e 19 mostram os resultados do “binding” de H^3 -GABA e H^3 -glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato

hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *Lippia alba* (Mill.). Novamente, pode-se observar o efeito inibitório dose-dependente do extrato sobre “*binding*” de H³-GABA, com alterações relativamente pouco expressivas para o caso do “*binding*” de H³-glutamato.

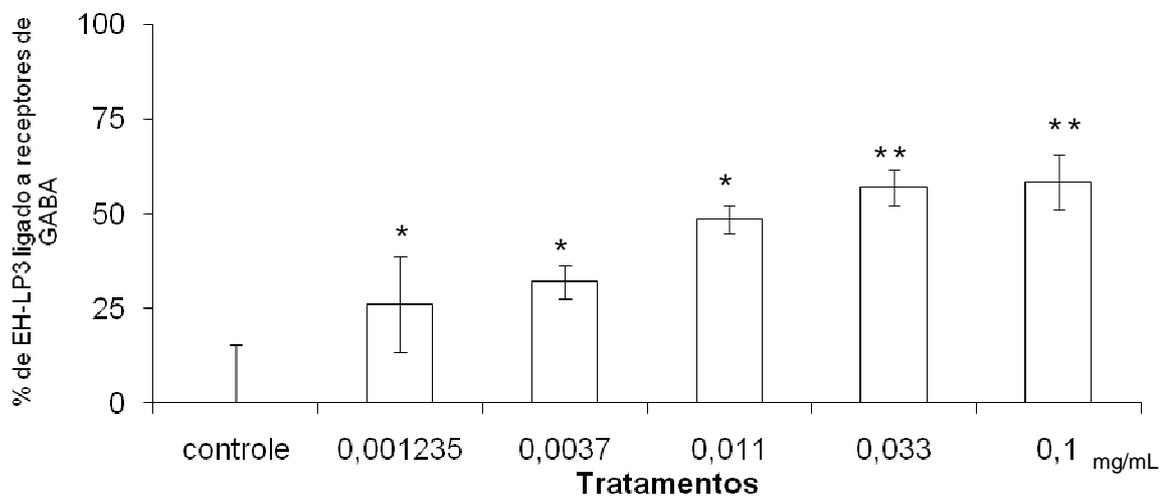


Figura 18 - Curva dose-resposta mostrando o efeito inibitório do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) no “*binding*” H³-GABA em membranas sinaptosomais cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

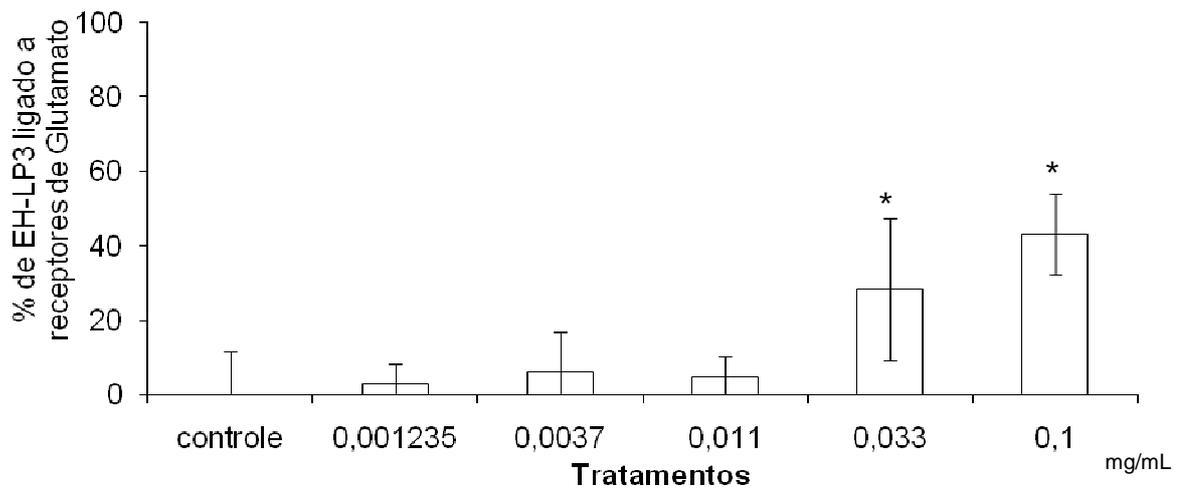


Figura 19 - Curva o discreto efeito inibitório do extrato hidroalcoólico do quimiotipo LP3 de *L. alba* (Mill) no “*binding*” de H³-glutamato em membranas sinaptosomais cerebocorticais de ratos na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (0,001235 à 0,1 mg/mL – concentração final). A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,05.

5. DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais remonta de priscas eras. A ampla utilização de plantas medicinais documentadas já por civilizações antigas existentes nas regiões da China, Índia e Europa, fez com que as técnicas de extração e conservação de partes de plantas fossem desenvolvidas (ELISABETSKY e SETZER, 1985). A contribuição da biodiversidade tem sido essencial para melhorar e aumentar o arsenal terapêutico, haja visto que a grande maioria dos produtos farmacêuticos disponíveis no mesmo no panorama recente é de origem natural (CLARK, 1996). O empenho para se obter fármacos a partir de fontes naturais é bastante árduo, dado que uma fração mínima da biodiversidade é estudada. Contudo, as técnicas para a identificação química são eficientes e reconhecidas na área biológica, o que torna a busca por uma substância com atividade anticonvulsivante de origem natural mais coerente (CLARK, 1996; TYLER, 1999; GRABLEY e TRIERICKE 1999).

Estima-se que 65-80% da população mundial, segundo a Organização Mundial de Saúde, utiliza plantas medicinais tradicionais para suprir necessidades básicas de saúde, tendo em vista que hospitais adequados e médicos vêm se tornando escassos em diversas partes do Terceiro mundo (BALICK, 1990; CALIXTO, 2000). Na gama variada de substâncias naturais muitas são provenientes de plantas, sendo utilizadas na terapêutica, com ou sem a necessidade de modificação estrutural da molécula original. FARNSWORTH (1990) cita alguns exemplos: atropina, bromelina, cafeína, quimopapaia, codeína, deslanosídeo, digitoxina, digoxina, emetina, efedrina, fisostigmina, morfina, papaverina, pilocarpina, quinidina, reserpina, escopolamina, teofilina, tubocurarina, vimblastina e vincristina.

Em 1995 foram identificadas as 20 substâncias mais vendidas no mundo, 11 delas apresentavam uma estrutura baseada em moléculas advindas da natureza;

apenas esse grupo de medicamentos representou uma renda de 16,53 bilhões de dólares no mercado farmacêutico mundial (O'NEILL, 1998), mesmo diante de tal valor, o potencial biológico das plantas como fonte de novos medicamentos ainda é pouco explorado (BOTH, 2005). Embora tendo poucos dados disponíveis, especialistas neste mercado estimam que as vendas de produtos fitoterápicos, no varejo, situam-se na ordem de 14 bilhões de dólares/ano, dispostos da seguinte maneira: 7 bilhões na Europa, 2 bilhões nos Estados Unidos, 1 bilhão na América Latina e 4 bilhões na Ásia e África. A estimativa é que este mercado triplique na próxima década (GRÜNWALD, 1997)

Algumas espécies tidas como anticonvulsivantes são descritas por diversos autores, tais como: *Apium graveolens*; *Pimpinella anisum*, *Ferula gummosa* e *Radix bupleuri* (Umbelliferae) (PORTILLA, 1951; ZHANG, 1990; LIU *et al.*, 2002), *Bauhinia outimouta*, *Ximenia americana* e *Rauvolfia ligustrina*, também apresentam evidências de atividade anticonvulsivantes segundo QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002, a *Erythrina velutina* é outra planta que apresenta atividades no SNC, tais como: insônia, convulsões e tosses nervosas (TESKE *et al.*, 1995), o óleo essencial de *H. suaveolens* tem sido estudado como anticonvulsivante (AKAH *et al.*, 1993). Outra variedade de *Lippia*, a *Lippia sindoides* apresentou atividade anticolinesterase (TREVISAN e MACEDO, 2003).

Neste contexto, a *L. alba*, alvo de nosso trabalho já há muito tempo é utilizada como planta medicinal de ação calmante, sedativa, anticonvulsivante, espasmolítica suave, analgésica, ansiolítica, miorelaxante, antiulcerogênica, antimicrobiana, antifúngica, larvicida e antioxidante (CHATURVEDI *et al.*, 1976; ADESINA 1982; ASHORKY *et al.*, 1987; BOORHEM *et al.*, 1999; MORS *et al.*, 2000; VIANA *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2001; PASCUAL *et al.*, 2001; VALE *et al.*, 2002; ZETÓLA *et*

al.,2002; STASHENKO *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2005). De fato por estas propriedades amplas, facilidade de cultivo e identificação, ampla localização no território nacional, grande descrição de seus efeitos na literatura, e uma já relatada baixa toxicidade, a *L. alba* se torna atraente para o desenvolvimento de um novo fitoterápico ou como fonte natural para o isolar de ativos de interesse farmacológico, de forma a agregar valor a nossa enorme biodiversidade e ainda poder diminuir os custos de medicamentos.

O cultivo dos diferentes quimiotipos de *L. Alba* pelo método de estaquia se relevou bastante eficiente, gerando grande aporte de material ao laboratório. De fato, este método tem sido apontado como um dos mais eficientes para propagar espécies herbáceas, como a estudada neste trabalho (BIASI e COSTA 2003).

Numa investigação fitoquímica com o objetivo de se isolar ou identificar, mesmo que de maneira preliminar, os princípios ativos de uma planta medicinal, o primeiro passo é a escolha do material vegetal. Esta escolha pode ser bastante difícil, pois se sabe que existem aproximadamente 350.000 espécies de plantas sobre a superfície terrestre que ainda não foram submetidas a qualquer tipo de estudo fitoquímico ou farmacológico (HOSTETTMANN, 1997). A escolha da *L. Alba*, em nosso trabalho deveu-se a sua ampla distribuição no território nacional, pelo corrente e costumeiro uso popular, por ser desprovida de ações tóxicas, podem ser consumidas em altas dosagens (MATOS, 1998) e ainda pela carência de dados que descrevam seu modo de ação.

As técnicas fitoquímicas utilizadas nesse trabalho foram: maceração, rotaevaporação, cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa de alta eficiência com espectrometria de massa acoplada e araste a vapor em aparelho de *clevenger*, todas apropriadas ao propósito inicial deste trabalho, ou seja, a

identificação do quimiotipo de maior potência anticonvulsivante e a identificação preliminar da classe fitoquímica do(s) composto(s) ativo(s) descritos neste trabalho e estudo do mecanismo de ação.

As análises fitoquímicas por meio de CCDC e CG-EM realizadas neste trabalho com os óleos essenciais e/ou extrato(s) hidroalcólico(s) dos diferentes quimiotipos de *L. alba*, revelaram a presença de uma quantidade diversificada e variada de compostos fitoquímicos, incluindo a presença de terpenos, flavonóides, destacando-se, principalmente os flavonóides (Tabela 2) e (Figuras 9 e 9.1), o que também acontece na análise do quimiotipo LP3 em separado (Figura 9.1). A análise dos óleos essenciais revelou também uma variação fitoquímica muito grande entre os quimiotipos, especialmente, nos compostos de interesse, ou seja, o conteúdo de β -mirceno, limoneno e citral, especialmente concentrados nos óleos essenciais dos quimiotipos representados na Tabela 1, o que segundo CRAVEIRO *et al.*, 1988 e VIANA *et al.*, 2000, seriam as principais substâncias químicas envolvidas na atividade anticonvulsivante e sedativa observadas nos diferentes ensaios biológicos para tais atividades. Salienta-se que o citral é mais abundante no óleo essencial do quimiotipo LP7, o β -mirceno, limoneno, respectivamente nos quimiotipos LP4 e LP5 (Tabela 1).

Em nossos ensaios utilizando o modelo de convulsão induzido pelo PTZ, foram utilizados extratos hidroalcólicos de cada um dos diferentes quimiotipos, quanto á estes, as análises fitoquímicas em CG-EM não relevaram a presença de compostos voláteis, tais quais, os referidos acima, β -mirceno, limoneno e citral, sendo assim, os mesmos não são os compostos responsáveis pelos efeitos anticonvulsivantes observados neste trabalho (Figuras 10 a 15). Deste modo, sugere-se que além destes compostos voláteis, outros de natureza fixa, são também

responsáveis em boa parte pelo efeito anticonvulsivante observado para a *L. alba*. De fato, a ausência de compostos voláteis neste extrato indica que compostos não voláteis seriam os responsáveis principais pelo efeito anticonvulsivante em nossos experimentos. Como demonstrou ZETÓLA *et al.*, em 2002 com extratos etanólicos (40%, 60% ou 80%) ricos em flavonóides, apresentando efeito sedativo, indicando que, muito provavelmente, esse efeito seja devido à presença destes compostos presentes em um quimiotipo específico de *L. alba*, são os responsáveis pela atividade anticonvulsivante observada naquele trabalho, o que corrobora os dados obtidos no exposto presente. Estes dados são relevantes por atribuir funções a novo(s) composto(s) presente(s) na planta que são também importantes para a atividade observada. A título de comparação, todos os quimiotipos ora ensaiados neste trabalho são ricos em flavonóides (Figura 9), especialmente o LP3 (Figura 9.1). Estes resultados também são importantes do ponto de vista etnofarmacológico: na medicina popular a *L. alba* é utilizada para suas atividades fins como infuso, onde evidentemente os compostos fixos, como os flavonóides, teriam provavelmente uma participação ativa maior do que aqueles constituintes voláteis (SANTOS *et al.*, 1998; ALONSO *et al.* 2004). Com relação à esta classe de compostos, alguns flavonóides, como apigenina e cirsiolol, tem sido descritos como capazes de interagir com os receptores benzodiazepínicos centrais, atuando como agonistas parciais (LEE *et al.*, 1991; VIOLA *et al.*, 1994,1995,1997; AVALLONE *et al.*, 2001). A interação com o complexo receptor GABA_A hiperpolariza as membranas neurais, o que em parte explicaria as atividades ansiolíticas, sedativas, miorelaxantes e anticonvulsivantes observadas para estes tipos de componentes (HAEFELY *et al.*, 1992).

As análises fitoquímicas, como as realizadas neste trabalho, são de substancial importância na definição do melhor quimiotipo para o uso como

anticonvulsivante, caso o mesmo venha ser utilizado como fitoterápico ou mesmo como fonte para o isolar de ativos. Além disso, este tipo de esforço permite comparações de tal modo a definir novos compostos farmacologicamente importantes, somando-se aos anteriormente indicados como ativos.

Como supramencionado, em nossos ensaios neuroetológicos, foi utilizado o modelo de convulsão induzido por PTZ. O teste é muito comum, relativamente simples e barato, e é considerado um modelo para crises generalizadas do tipo crises de ausência e mioclônicas (“pequeno mal”) (SWINYARD, 1969) e tem sido empregado no estudo de fármacos com ação sobre crises de ausência típica humana e crises mioclônicas. O PTZ é uma das principais substâncias indutoras de convulsão utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes e atua inibindo os canais de íons cloreto associados a receptores GABA_A (LÖSCHER e SCHMIDT, 2002), impedindo a ação inibitória do neurotransmissor GABA, o que desencadeia crises convulsivas generalizadas dos tipos ausência, mioclônicas e de crises tônico-clônicas (WADA, 1977; OLIVEIRA *et al.*, 2001). A manifestação epiléptica considerada como parâmetro preditivo por esta via é o abalo mioclônico generalizado inicial, seguindo-se, em ordem de aparecimento: crises clônicas repetidas das patas anteriores e/ou posteriores sem perda dos reflexos de endireitamento; clônus generalizado com crises clônicas repetidas das patas anteriores e posteriores com perda dos reflexos de endireitamento e queda; crises clônicas com queda seguidas de extensão das patas anteriores para trás; extensão tônica das patas posteriores (pode estar ausente) (LÖSCHER *et al.*, 1991; LÖSCHER e FIEDLER, 1996).

Em nossos ensaios neuroetológicos, os quimiotipos LP1 e LP3 se mostraram os mais efetivos, pois são aqueles que apresentaram altos índices de sobrevivência,

menor duração da crise convulsiva, e menor grau de severidade (Figuras 11, 13 e 14). O quimiotipo LP3, devido à eficiência e maior facilidade de obtenção, foi o escolhido para os ensaios de neuroquímica utilizando o modelo sinaptosomal, visando a descrição parcial de seu mecanismo de ação.

O sinaptosoma é uma organela capaz de exercer funções da neurotransmissão, haja vista que contém receptores, transportadores e canais iônicos funcionalmente preservados. As vantagens da técnica para estudos de captação e liberação compreendem a relativa facilidade de obtenção e baixo custo, pureza e ausência de barreiras mecânicas entre os sinaptosomas (GRAY e WHITTAKER, 1962; COUTINHO-NETTO, 1980).

Para as análises neuroquímicas, o extrato hidroalcoólico deste quimiotipo (LP3) foi avaliado quanto aos seus efeitos na recaptção de H^3 -GABA e H^3 -L-glutamato e ligação a receptores GABAérgicos/glutamatérgicos em modelos sinaptosomais, demonstrando particularmente uma inibição da recaptção GABAérgica e alteração da ligação de H^3 -GABA em seus receptores, ambas ações dose-dependentes (Figuras 16 e 18), o que poderia explicar pelo menos parcialmente, os efeitos anticonvulsivantes da *L. alba* em níveis moleculares, contribuindo, pois, para o desenvolvimento mais avançado e a compreensão mecanística de compostos(s) de potencial interesse farmacológico. Novamente, de acordo com as figuras 16 e 18 observamos um efeito máximo da inibição do “*binding*” GABAérgico de 58,40% e inibição da recaptção de 50,31%, na concentração de 0,1 e 0,1mg/mL. Assim a ação direta no receptor GABAérgico se soma à inibição da recaptção, o que aumentaria o conteúdo deste neurotransmissor disposto na fenda sináptica e conseqüentemente sua ação em seus sítios de ligação. Dado o efeito anticonvulsivante observado, é conveniente

supor, que o(s) ativo(s) encontrados no extrato sejam agonistas do(s) receptor(es) GABAérgico(s), muito embora a metodologia neuroquímica empregada não seja *per se* suficiente para atestar definitivamente tal teoria. Os efeitos do extrato no “*binding*” e recaptação de H³-glutamato foram considerados discretos, podendo ser atribuídos a eventos inespecíficos, dadas as altas concentrações que acontecem e ausência da atividade no modelo dose-resposta, como acontece nos ensaios GABAérgicos.

De fato, experimentos realizados com os perfis farmacológicos dos óleos essenciais, com os quais VALE *et al.*, 1999 trabalharam, especialmente os quimiotipos EO I e II, eram muito similares ao dos benzodiazepínicos, isso sucinta a idéia da interação com os receptores benzodiazepínicos localizados junto ao receptor de GABA, caracterizando então a atividade sedativa. Entretanto, ZETÓLA *et al.*, 2002 utilizou o extrato etanólico de *Lippa alba* (Mill), observando o extrato etanólico ES80% e as preparações em spray SDP1 e SDP2, pulverizadas. Uma explanação suposta a estes achados é a presença de compostos flavonóides, que nestas preparações poderiam estar agindo nos mesmos sítios benzodiazepínicos como agonistas totais no receptor de GABA_A, contudo, esta hipótese necessita de mais estudos (PALADINI *et al.*, 1999).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é neurotransmissor (NT) inibitório mais proeminente do SNC de mamíferos, sendo encontrado em altas concentrações no encéfalo e medula espinhal (KROGSGAARD-LARSEN *et al.*, 1998). Com efeito, vários dos aspectos farmacológicos, bioquímicos e fisiológicos relacionados à transmissão GABAérgica vêm sendo descritos desde a descoberta do GABA no cérebro de vertebrados por ROBERTS e FRANKEL, em 1950. O crescente interesse por este sistema, sobretudo despertado nas últimas três décadas, se justifica pelo envolvimento direto ou indireto da sinapse GABAérgica em neuropatologias ou

distúrbios psiquiátricos, como Coréia de Huntington, Parkinsonismo, discinesia tardia, epilepsia, isquemia cerebral, esquizofrenia, ansiedade, depressão e distúrbios do humor ou comportamento (LLOYD *et al.*, 1987; WONG *et al.*, 2003).

A pesquisa por drogas que interfiram com a neurotransmissão GABAérgica ou mesmo glutamatérgica se justifica tendo em vista que disfunções destes sistemas estão envolvidas em diversas neuropatologias humanas, tais como epilepsia, Coréia de Huntington, ansiedade, esclerose amiotrófica lateral e isquemia, dentre outras (MELDRUM, 1989; LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 1992; PLAITAKIS & CONSTANTAKIS, 1993; PENN *et al.*, 1998; CLEMENT & CHAPOUTHIER, 1998).

Como anteriormente aventado, fármacos que atuem sustentando a transmissão GABAérgica, tais como agonistas ou moduladores de receptores (fenobarbital e benzodiazepínicos), inibidores da enzima GABA-T (vigabatrina), inibidores do transporte de GABA (NNC-711) e estimuladores de sua liberação (gabapentina) aparecem como boas opções terapêuticas no tratamento das epilepsias. Neste sentido, o inibidor da recaptção de GABA NNC-711 e os ésteres do ácido nipecótico são potentes anticonvulsivantes em modelos experimentais de epilepsias, bem como algumas das drogas supracitadas, como a vigabatrina e benzodiazepínicos, têm sido largamente empregadas na clínica do cérebro epilético (BERNÁSKOVA *et al.*, 1999). Por outro lado, drogas, como a semicarbazida, que bloqueiam a síntese endógena de GABA, concorrem para promoção de crises epiléticas, evidenciando mais uma vez a relevante participação deste neurotransmissor nos eventos que envolvem as mais variadas formas de epilepsia (MELDRUM, 1989).

Em todo mundo, ano a ano, milhões de pessoas padecem das drásticas conseqüências das epilepsias. A dramática alteração entre o funcionamento cerebral

normal e a crise convulsiva, passando pela perda de consciência e cianose, leva a incapacidade de trabalho para alguns casos, evolução direta ou indireta para o óbito e sérios transtornos sociais. Como supramencionado, a epilepsia caracteriza-se como a desordem neurológica mais evidente e comum, sem limitações por barreiras sócio-étnicas, etárias ou sexuais, atingindo cerca de 1-2% da população mundial. O custo anual com a síndrome nos EUA atinge cerca de 14 bilhões de dólares, afetando por volta de 110-160 mil pessoas anualmente (LOWENSTEIN, 1999). Também no Brasil, como aventado anteriormente, os números da epilepsia são relevantes, 119 casos para cada 10.000 habitantes na cidade de São Paulo (MARINO *et al.*, 1986), e de 165 casos para cada 10.000 habitantes em Porto Alegre (FERNANDES *et al.*, 1992).

Segundo GUERREIRO e colaboradores, apenas 40% dos indivíduos epiléticos conseguem controlar totalmente as crises convulsivas mediante o uso dos tratamentos anticonvulsivantes convencionais. Além disso, a terapia convencional, especialmente a administração profilática de barbitúricos, causa grandes transtornos aos pacientes, como forte sonolência e prejuízo de aprendizado (GUERREIRO *et al.*, 2000). Além disso, como também supramencionado, grandes avanços farmacológicos precisam ser empenhados de modo a corrigir distúrbios de potência, toxicidade, solubilidade e estabilidade química de fármacos anticonvulsivantes atuais (KROGSGAARD-LARSEN *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2001; PERUCCA, 2005). Com efeito, a prospecção avançada de novas drogas anticonvulsivantes de diferentes naturezas químicas e de variadas fontes biológicas, aliada a modificações estruturais de compostos conhecidos e ao estudo do mecanismo de ação, poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras e eficientes que as atualmente empregadas no tratamento

clínico das epilepsias, seja por meio de fitoterápicos ou ainda de maneira convencional.

6. CONCLUSÃO

As conclusões obtidas deste trabalho são:

- 1) A propagação por estaquia foi eficiente para a multiplicação dos sete quimiotipos de *Lippia alba* (Mill);
- 2) As análises fitoquímicas dos extratos e óleos essenciais revelaram uma grande diversidade e variedade de compostos, o que por sua vez pode explicar a grande variedade de respostas observados nos ensaios neuroetológicos, bem como poderão contribuir para correta seleção da(s) variedade(s) para a formulação mais adequada de fitoterápico(s) que poderão surgir em um momento vindouro;
- 3) Nenhum extrato é significativamente letal na dose de 300mg/kg, quando comparado com o PTZ. Todos diferentes extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade anticonvulsivante como demonstrado pelo teste do PTZ, embora com características e potencias variáveis entre os mesmos. Os quimiotipos LP1 e LP3 se mostraram como sendo os mais efetivos como anticonvulsivantes, uma vez que diminuem mais significativamente o número de animais que entram em crises convulsivas (23,81% e 28,57% respectivamente), bem como aumentam a sobrevivência dos animais (76,19% e 71,43% respectivamente) e diminuem a duração da primeira crise (14"03 e 09"22 seg. respectivamente). Além disso, proporcionam um menor índice de severidade nas crises convulsivas observadas de acordo com o painel de "score" ($21,7 \pm 8,08$ e $22,7 \pm 7,50$, respectivamente).

- 4) Tendo por base os resultados obtidos nos ensaios neuroetológicos, o extrato do quimiotipo LP3 foi selecionado para os testes de neuroquímica. O mesmo demonstrou, particularmente, a capacidade de inibir ou alterar de maneira dose-dependente a recaptação e o “*binding*” de H³-GABA em ensaios utilizando sinaptosomas ou membranas sinaptosomais, o que pode explicar pelo menos parcialmente, os efeitos anticonvulsivantes da *L. alba* em níveis moleculares, contribuindo, pois, para o desenvolvimento mais avançado e a compreensão mecanística de compostos(s) ou extratos de potencial interesse farmacológico.
- 5) Os efeitos observados neste trabalho se deve(m) a composto(s) químico(s) fixo(s), que deve(m) ser considerado(s) na atividade anticonvulsivante promovida pela *L. alba*, além dos estabelecidos β -mirceno, limoneno e citral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp, Carol Stream, (1995).

ADESINA S. K. Studies on some plants used as anticonvulsants in Amerindian and African traditional medicine. Fitoterapia; v. 53(5-6), p. 146-62. (1982).

AKAH, P., NWANBIE, A. I. "Nigerian plants with anti-convulsant property." Fitoterapia. v.64 (1): p. 42-44 (1993).

ALONSO, J.R. Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos. Argentina, corpus libros, p. 953 (2004).

ANDERSEN, K. E.; LAU, J.; LUNDT, B. F.; PETERSEN, H.; HUUSFELDT, P. O.; SUZDAK, P. D.; e SWEDBERG, M. D. Synthesis of novel GABA uptake inhibitors. Part 6: preparation and evaluation of N-Omega asymmetrically substituted nipecotic acid derivatives. Bioorg. Med. Chem. v. 9, p. 2773-2785 (2001).

ARORA R.B.; SHARMA P. L.; KANTI K. Antiarrhythmic and anticonvulsant activity of Jatamans. Indian Med Res; v. 46, p.782-91. (1958).

ASHOKY, K, MAHAVEER, P, BRUWAN, C. J. A review of medicinal plants showing anticonvulsant activity. J. Ethopharmacol. v. 22, p.11-23. (1988).

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUJA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. Biochemical Pharmacology. v.,59, p.1387-1394 (2001).

AZEREDO, F. S., et al Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. Núcleo de estudos e pesquisas tóxico – farmacológicas (NEPET-UFG), 2004, <<http://www.farmacia.ufg.br/revista/3.pdf>>; acessado em 24/06/05

BALICK, M. J. Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. IN: *Bioactive Compounds from Plants*. Edit. Chadwick, D. L.; MARSH, J., p. 22-31 Chischester (Ciba Foundation Symposium), (1990)

BELEBONI, R.O.; CAROLINO, R.O.G.; PIZZO, A.B.; CASTELAN-BALDAN, L.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F.; COIMBRA, N.C. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. Cell Mol. Neurobiol. v. 0, p. 0, (2004). *In Press*.

BERNÁSKOVÁ, K.; SLAMBEROVÁ, R.; MARES, P. GABA uptake blocker NNC-771 exhibits marked anticonvulsant action in two cortical epileptic models in immature rats. Epilepsia. v. 40(9), p. 1184-1189 (1999).

BIASI, L. A.; COSTA G. - Vegetative propagation of *Lippia alba* - Universidade Federal de Santa Maria – Centro de Ciências Rurais; Cienc. Rural vol.33 nº.3 Santa Maria May/June; labiasi@agrarias.ufpr.br; Paraná (2003).

BOORHEM, R. L.. Reader's Digest – Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais. Reader's Digest Braisl Ltda., Rio de Janeiro. p. 416 (1999).

BOTH, F. L. Avaliação do perfil Psicofarmacológico de Psicolatina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae). Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (aprovada em 03.10.2005).

BRADFORD, H.F. Glutamate, GABA and Epilepsy. Prog. Neurobiol. v. 47, p. 477-511, (1995).

BRADFORD, H.F.; e DODD, P.R. Biochemistry and basic mechanisms in Epilepsy. Ch. 3. In: Biochemistry and Neurological Disease. Ed. A. N. Davison. Blackwells: Oxford (1976).

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz. J. Med. And Biol. Res., v.33, p. 179-189 (2000).

CALLEGARI, L. Análise Setorial – A Indústria Farmacêutica – Panorama Setorial – Gazeta Mercantil. v. 1, p. 204 (2000).

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e clorobenzapam. Rev. Ass. Bras. Psiqu. São Paulo, v.1, p.25 – 31, (1979).

CHATURVEDI, A. K.; PARMAR, S. S.; NIGAM, S. K.; BHATNAGAR, S. C. Antiinflammatory and anticonvulsant properties of some natural plants triterpenoids. Pharmacol Res Commun. v. 8(2), p. 199-210 (1976).

CLARK, A.M. Natural products as a resource for new drugs, Pharm. Res., v.13, 1133 (1996).

CLEMENT, Y.; e CHAPOUTHIER, G. Biological bases of anxiety. Neurosc. Biobehav. Rev. v. 22, p. 623-633 (1998).

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt., Wilson - erva-cidreira. Rev. Bras. Farm., Rio de Janeiro, v.73, n.3, p.57 – 64, jul./set. (1992).

COUTINHO-NETTO, J. Estudo bioquímico em epilepsia: liberação de neurotransmissores *in vivo* e *in vitro* com especial referência às ações do glutamato no desencadeamento de epilepsia focal. Tese de livre docência apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. (1980).

COUTINHO-NETTO, J.; ABDUL-GHANI, A.S.; COLLINS, J.F.; e BRADFORD, H.F. Is glutamate a trigger factor in epileptic hyperactivity? Epilepsia. v. 22, p. 289-296 (1981).

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Sucedaneos nacionais de bisabolol, citral, timol e carvacrol. Ciência e Cultura v.40 (7) 604 Suppl., Deutsches Arzneibuch. 9, 1986. Ausgabe. Wissenschaftliche, Stuttgart. (1988).

CROUCHER, M.J.; COTTERELL, K.L.; e BRADFORD, H.F. Amygdaloid kindling by repeated focal N-methyl-D-aspartate administration: comparison with electrical kindling. Eur. J. Pharmacol. v. 286, p. 265-271 (1995).

CROUCHER, M.J.; COTTERELL, K.L.; e BRADFORD, H.F. Effects of daily focal NMDA pretreatment on the parametrs of amygdaloid electrical kindling. Br. J. Pharmacol. v. 103, p. 216 (1992).

DE LIMA, T.C.M.; CEMIN, L.; SONAGLIO, D.; FARIAS, M.R. Avaliação da atividade anticonvulsivante de diferentes frações de *Lippia alba* Miller. XVI REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DA SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL- FeSBE, Caxambu- MG, Resumos. Caxambu, , p. 206 (12.081) (2001).

DE SMET, P.A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. Drugs, 54: 801 – 40, 1997. *Apud*: CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. Pharmacol. Biochem. Behav., v.75, p.501 – 512, 2003.

DELGADO-ESCUETA, A. V.; WILSON, W.A.; OLSEN, R.W; e PORTER, R.J. New waves of research in the epilepsies: crossing into the third millennium. In: Delgado-Escueta, AV, Wilson, WA, Olsen RW, and PORTER, RJ. Third Edition: Advances in Neurology, 79. Lippincott Willians e Wilkins, Philadelphia, (1999).

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; RECHER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. J. of Ethnopharmacology. v.97, p. 305-311 (2005).

DURING, M.J.; e SPENCER, D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizures in the conscious human brain. Lancet. v. 341, p. 1607-1610 (1993).

DURING, M.J.; RYDER, K.M.; e SPENCER, D.D. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. Nature. v. 376, p. 174-177 (1995).

ELISABETSKY, E; SETZER, R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. IN: PARKER, E. P. The Amazonian Caboclo: Historical and Contemporary Perspectives, v.32, p. 243-278, Studies on Third World Societie Publication series, Williamsburg (1985)

ENGEL, J.Jr. Surgical treatment of bthe epilepsies. Second edition. Ravel Press, Ltd., New York, (1993).

ERDELMEIER, C.A.J.; KÖNING, G.M. New planar techniques in natural product analysis. Phytochemical Analysis, v. 2, p. 3 (1991).

FARNSWORTH, N. R. the role of Ethnopharmacology in Drug Development. In: Chadwick, D. J. and Marsch, J. (Eds), Biactive Compounds from Plants, New York, Ciba Foundation, p.2-10 (1990).

FERNANDES, J.G.; SCHIMIDT, M.I.; MONTE, T.L.; TOZZI, S.; e SANDER, J.W.A.S. Prevalence of epilepsy: Porto Alegre study. Epilepsia. v. 33, p. 132, (1992).

GEDDES, J.W.; CAHAN, L.D.; COOPER, S.M.; KIM, R.C.; CHOI, B.H.; e COTMAN, C.W. Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. Exp. Neurol. v. 108, p. 214-220 (1990).

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A.; FILHO, A.W. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). Rev. Bras. Farm., v.74, n.2, p.29 - 32, abril/jun.(1993).

GOMES, M.M. Epidemiologia: distribuição, fatores de risco e considerações prognósticas. In. Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes, F, Lopes-Cendes I, Eds, Epilepsia, Lemos Editorial, São Paulo, p. 11-21 (2000).

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., v.64, 101 (1999).

GRAY, E. G.; e WHITTAKER, V. P. The isolation of nerve ending from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. J. Anatomy. v. 96, p. 79-87 (1962).

GRÜNWARD, J. 1997. The market situation and marketing of Herbal Medicinal Products (HMP) in Europe. In: ICMAP/ISHS/SAIPA. Abstracts. ICMAP/ISHS/SAIPA: Buenos Aires. L. 33. II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, Mendoza (Argentina), 10-15 nov. (1997).

GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; e LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In Guerreiro *et al* (eds). Epilepsia, Lemos Editorial, São Paulo, p. 1-10 (2000).

GURGEL DO VALE, T.; COUTO FURTADO, E.; SANTOS JR., J.G.; VIANA, G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Phytomedicine, v.9, n.8, p.709 – 714, (2002).

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method gives a linear photometric response. Anal. Biochem., v. 48, p.422-477 (1972).

HOSTETTMANN, K. Tout savoir sur le pouvoir de Plantes. Editons Favre, Lausanne (1997).

KAURA, S.; BRADFORD, H. F.; YOUNG, A. M. J.; CROUCHER, M. J.; e HUNGHERS, P. D. The effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: *In vivo in vitro* studies. J. Neurochem. v. 65, p. 1240-1249 (1995).

KLÜGER, P.A.; TEUBER, C.A.; DAROS, M.R.; FARIAS, M.R.; DE LIMA, T.C.M. Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de *Lippia alba* (Miller) Will. N. E. Br.(Verbenaceae). SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XIV, Florianópolis, 1996. Resumos. Florianópolis, F-142, p.118 (1996).

KLÜGER, P.A.; DAROS, M.R.; SILVA, R.M.; FARIAS, M.R., DE LIMA, T.C.M. Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* (Miller) Will. N. E. Br.(Verbenaceae). In: INTERNATIONAL JOINT SYMPOSIUM - IOCD/CYTED, 1997, Panamá. Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medical Plants from the Americas. Panamá, (1997).

KROGSGAARD-LARSEN, P.; FALCH, E.; LARSSON, O. M.; e SCHOUSBOE, A. GABA uptake inhibitors: relevance to antiepileptic drug research. Epilepsy Res. v. 1, p. 77-93 (1987).

KROGSGAARD-LARSEN, P.; FROLUND, B. F.; e FALCH, E. Inhibitors of gamma-aminobutyric acid transport as experimental tools and therapeutic agents. Methods Enzymol. v. 296, p. 165-175 (1998).

LEE, C. M.; WONG, H. N. C.; CHUI, K. Y.; CHOANG, T. F.; HON, P. M.; CHANG, H. M. Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* . Neuroscience Letters. v.127, p.237-241 (1991).

LIU, Y.; WU, H.; GE, F., Chemical constituents analysis on anticonvulsive effect of three extracts from *Radix bupleuri*, Zhong Yao Cai., v.25, p. 635 (2002).

LORENZI, H. e ABREU MATOS, F. T. – Plantas Medicinais no Brasil – nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. p. 488 – 489 (2002).

LÖSCHER, W.; e SCHWARK, W.S. Further evidence for abnormal GABAergic circuits in amygdala-kindled rats. Brain Res. v. 420, p. 385-390 (1987).

LÖSCHER, W.; HÖNACK, D.; FASSBENDER, C.P.; *et al* . The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. Epilepsy Research, v. 8, p. 171-189, (1991).

LÖSCHER, W.; FIEDLER, M. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VI. Seasonal influences on maximal electroshock and pentylentetrazol seizure thresholds. Epilepsy Research, v. 25, p. 3-10, (1996).

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. Eur. J. Pharmacol. v. 342, p. 1-13 (1998).

LÖSCHER, W.; e SCHMIDT D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. Epilepsy Ressearch, v. 50, p. 3-16 (2002).

LLOYD, K. G.; MORSELLI, P. L.; e BARTHOLINI, G. GABA and affective disorders. Med. Biol. v. 65, p.159-165 (1987).

LOUZADA-JR, P.; DIAS J. J.; SANTOS, W. F.; LACHAT, J. J.; BRADFORD, H. F.; e COUTINHO-NETTO, J. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. J. Neurochem. v. 59 (1), p. 358-363 (1992).

LOWENSTEIN, D.H. Status epilepticus: an overview of clinical problem. Epilepsia. v. 40, p. S3-S8 (1999).

LOWRY, O. H.; ROSENBROUCH, N. J.; FARR, A. L.; e RANDALL, R. J. Protein measurent with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265-275 (1951).

MARINO, J.R.; CUKIERT, A.; e PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. Um estudo de prevalência. Arq. Neuro-Psiquiatr. v. 44, p. 243-254 (1986).

MARQUES DE CARVALHO, R. S.. Investigação Da Atividade Farmacológica Central Dos Extratos Aquoso E Hidroalcoólico, Da Fração Butanólica E Do Verbascosídeo De *Lippia Alba* (Miller) N. E. Brown (Falsa Melissa) – Verbenaceae. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

MATOS, F.J.A. O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha. 2ª Ed. Universidade Federal do Ceará Edições, Fortaleza, CE. 257 pp. (1997).

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas: sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza, UFC, pp. 180 (1998).

McLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley Sons, New York, (1989).

MELDRUM, B.S. GABAergic mechanism in the pathogenesis and treatment of epilepsy. Br. J. Clin. Pharmacol. v. 2, p. 3S-11S (1989).

METCALF, B. W. Inhibitors of GABA metabolism. Biochem. Pharmacol. v. 28, p. 1705-1712 (1979).

MILLER, A.A.; SAWYER, D.A.; ROTH, B.; PECK, A.W.; LEACH, M.J.; WHEATLEY, P.L.; PARSONS, D.N.; e MORGAN, R.J. Lamotrigine. In. New Anticonvulsant drugs, pp. 165-177. Eds. B. S. Meldrum and R.J. Porter. John Libbey: London (1986).

MINAMOTO, Y.; ITANO, T.; TOKUDA, M.; MATSUI, H.; JANJUA, N.A.; HOSOKAWA, K.; OKADA, Y.; MURAKAMI, T.H.; NEGI, T.; HATASE, O. Department of Physiology, Kagawa Medical School, Japan. In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindled rat. Brain Res. Feb.; v. 28; 573(2): p. 345-8 (1992).

MODY, I.; HEINEMANN, U. NMDA receptors of dentate gyrus participate in synaptic transmission following kindling. Nature, v. 326, p. 701-703 (1987).

MORS, W. B.; RIZZINI, C.T. e PEREIRA, N.A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan. p. 501 (2000).

MUTANI, R.; MÔNACO, F.; DURELLI, C.; e DELSEDIME, M. Levels of free amino acids in serum and CSF after administration of taurine to epileptic and normal subjects. Epilepsia v. 16, p. 765-769 (1975).

OLIVEIRA, C. C. *Fitoterapia: história e conhecimento*. Ano 3, n. 14, 2003 Disponível em:
http://www.unifran.br/2007/processoSeletivo/pesquisa/tcc/Klever_Gabriel_Pinheiro.pdf Acesso em Jan. 2007.

OLIVEIRA, C.M.A.; et al Chemical composition and antifungal activity of the Essential Oil of *Hyptis ovalifolia* Benth (Lamiaceae), J. Braz. Chem. Soc., v. 15, nº. 5, p. 756 – 759 (2004).

OLIVEIRA, F.A.; ALMEIDA, R.N.; SOUZA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DINIZ, S.A.; MEDEIROS, I.A. Anticonvulsivant propeties of *N*-Sali-cyloyltryptamine in mice. Pharmacology biochemistry and Behavior. v. 68, p. 199-202 (2001).

O'NEILL, M. Screening plnats for leads to novel medicines. J. Pharm. Med. V.12, p. 211-217 (1998).

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae). IL Farmaco. V.56, p. 501-504 (2001).

PALADINI, A. C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. Journal of Pharmacy and Pharmacology. v.51, p. 519_ 526. (1999).

PENN, R. D.; KROIN, J. S.; REINKENSMAYER, A.; e CORCOS, D. M. Injections of GABA-agonist into globus pallidus in pacient with Parkinson's disease. Lancet. v. 351, p. 340-341 (1998).

PERRY, T.L.; e HANSEN, S. Amino acid abnormalities in epileptogenic foci. Neurology. v. 31, p. 872-876 (1981).

PERUCCA, E. An introduction to antiepileptic drugs. Epilepsia. v. 46 Suppl 4, p. 31-7. (2005)

PITA-CALANDRE, E. Antiepilépticos de acción gabérgica: perfil farmacológico y espectro de actividad clínica de la tiagabamina. Rev. Neurol. v. 28(5), p. 495-498 (1999).

PLAITAKIS, A.; e CONSTANTAKIS, E. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. Bull. v. 30, p. 381-386 (1993).

PLUM, M.C. Free amino acid levels in CSF of normal humans and their variation in cases of epilepsy and Spielmeier-Vogt-Batten disease. J. Neurochem. v. 23, p. 595-600 (1974).

PORTILLA, A. "Divulgación de conocimientos científicos sobre las plantas más útiles y conocidas en Colombia.", Ed. Luz, Pasto, p. 331. (1951).

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE ALMEIDA, R. N.; FALÇÃO, A. C. G. M.; DE F. AGRA, M.; DE SOUSA, M. DE F. V.; BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. Acta Farm. Bonaerense. v.21 (3): p. 179-84 (2002).

ROBERTS, E.; e FRANKEL, S. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. J. Biol. Chem. v. 187, p. 55-63 (1950).

SANTOS, P.D.; CARDOSO, V.; SONAGLIO, D.; DE LIMA, T.C.M. Efeito farmacológico de diferentes extratos de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae) no comportamento de camundongos. SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV, Águas de Lindóia - SP. Resumos. Águas de Lindóia: XV SPMB, p. 83 (01.166) (1998).

SHERIF, F. M.; e AHMED, S. S. Basic aspects of GABA-transaminase in neuropsychiatric disorders. Clin. Biochem. v. 28, p. 145-54 (1995).

SMITH, D, C.; FORLAND, S.; BACHANOS, E.; MATEJKA, M. Qualitative Analysis of Citrus Fruit Extracts By GC/MS: An Undergraduate Experiment Department of Chemistry California State University San Bernardino. p. 5 (2006).

SOARES, L. Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico da *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex Britt & Wils (falsa melissa) Verbenácea. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, (2001).

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparación of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba*(Mill) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. Journal of Chromatography A, v.1025, p. 93-103 (2004).

SWINYARD, E.A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods. Epilepsia, v. 10, p. 107-119 (1969).

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M.; Herbarium: Compêndio de Fitoterapia. 2ª Ed. Herbarium Laboratório Botânico , Curitiba, PR., pp. 317 (1995).

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de Plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. Quim. Nova, v. 26, No. 3, p. 301-304 (2003).

TYLER, V.E., Phytomedicines: back to the Future, J. Nat. Prod., 62, 1489 (1999)

UEDA, Y.; e TSURU, N. Bilateral seizures-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampi during development of amygdaloid kindling. Epilepsy Res. v. 18, p. 85-88 (1994).

Vale, T. G.; Matos, F. J. A.; De Lima, T. C. M.; Viana, G. S. B.. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. Journal of Ethnopharmacology. v.67, p.127-133 (1999).

VELISEK, I.; VERESOVÁ, S.; PÔBISOVÁ, H., MARES, P. Excitatory aminoacid antagonist and pentilenotetrazol-induced seizures during ontogenesis II: the effects of MK-801. Psychopharmacology. v. 104, p. 510-4 (1991).

VIANA, G. S.; DO VALE, T. G.; SILVA, C. M. e MATOS, F. J. Anticonvulsant activity of essential oil and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. – Biol. Pharm. Bull. Nov; v. 23 (11), p. 1314-17 (2000).

VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN, M.; WASOWSKI, C.; PENˆ A. C.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). Journal of Ethnopharmacology. v.44, p.47-53. (1994).

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F. and MEDINA, J. H. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptorsligand with anxiolytic effects. Planta Medica. v.61, 213-216 (1995).

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; MARDER, M.; WOLFMAN, C.; PALADINI, A. C.; MEDINA, J.H. Sedative and hypnotic properties of *Salvia guaranitica* St. Hil, and of its active principle, cirsioliol. Phytomedicine. v.4 (1),p. 47-52. (1997).

WADA, W. C. A neuropharmacological study of epilepsy. Behav. Brian Res., v. 22, p. 181-190 (1977).

WONG, C. G.; BOTTIGLIERI, T.; e SNEAD, O. C. 3rd. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. Ann. Neurol. v. 54, p. 3-12 (2003).

ZETOLA, M.; DE LIMA, T.;SONAGLIO, G.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.; PETROVICK, P. e BASSANI, V. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian *false melissa*) – J. Ethnopharmacology. v. 82, p. 207-215 (2002).

ZHANG, J. T. and LI, X. M. ABP, a new type of antiepileptic agent, Eur. J.Pharmacol., p.183, 609 (1990).

ZHANG, X. Regulatory situation of herbal medicines—a worldwide review. Geneva: WHO, (1998). in: http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TRM_98.1.pdf, Acesso em: 05/12/2006

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)