

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**FLADMIR DE SOUSA CLAUDINO**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE  
EPÓXI-CARVONA EM MODELOS ANIMAIS**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FLADMIR DE SOUSA CLAUDINO**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE  
EPÓXI-CARVONA EM MODELOS ANIMAIS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de  
Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros  
da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de  
DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS  
BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA**

**Orientador:**

**Prof. Dr. REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA**

**Co-orientador**

**Prof. Dr. DAMIÃO PERGENTINO DE SOUSA**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2007**

C615 c Claudino, Fladmir de Sousa

Caracterização da atividade anticonvulsivante de epóxi-carvona em modelos animais. / Fladmir de Sousa Claudino. – João Pessoa, 2007.

152 p.

Orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida

Tese (doutorado) UFPB / CCS

1. Psicofarmacologia 2. epóxi-carvona. 3. Produtos Naturais. I. Título

UFPB / BC

CDU: 615:159.9 (043)

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**FLADMIR DE SOUSA CLAUDINO**

## **CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE EPÓXI-CARVONA EM MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. REINALDO NÓBREGA DE  
ALMEIDA (Orientador)**

---

**Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa  
(Examinador)**

---

**Prof. Dr. Diego Nunes Guedes  
(Examinador)**

---

**Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam  
(Examinadora)**

---

**Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado  
de Araújo (Examinador)**

---

**Prof. Dr. José Roberto Leite  
(Examinador)**

---

# *Dedicatórias*

À Deus pela coragem e força para enfrentar obstáculos e por estar presente na minha vida em todos os momentos.

A mim, pela coragem e desafio de enfrentar as adversidades e não ter desistido.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida por ter me aceitado como seu orientando, mesmo numa situação difícil e delicada, que confiou em mim e mostrou ser um exemplo de ser humano tanto profissional quanto pessoalmente, demonstrando caráter, honestidade, sabedoria e humildade.

À Michele Holanda por ter aberto meus olhos e me fazer acordar para a vida, e ter contribuído sempre de forma decisiva e fundamental na minha mudança, além da presença e participação fundamentais nos momentos importantes e difíceis.

Mimi você é especial e está em meu coração.

À meu Psicoterapeuta Dr. Aureliano Lima por ter me dado o suporte terapêutico e me ajudado nos momentos mais difíceis e que me mostrou que a nossa saúde depende de como nós vivemos a vida e que ela começa pela saúde mental.

# *Agradecimientos*



Ao Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa pela co-orientação, pelos ensinamentos químicos e pela síntese e fornecimento do monoterpene epóxi-carvona

À Profa. Dra. Rita Mattei e seus alunos do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo pela colaboração na realização dos ensaios da atividade antioxidante.

Ao Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo pela oportunidade de realização de experimentos no laboratório de eletrofisiologia e seus alunos Juan Carlos e Aron pelo auxílio na técnica de *single sucrose gap*.

À Profa. Dra. Temilce pela ajuda final na revisão do inglês dos artigos submetidos à publicação.

Ao Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara pelos ensinamentos na parte de síntese orgânica e pela oportunidade de ser seu co-orientador no meu segundo projeto de tese, que infelizmente não pode ser continuado.

À José Crispim Duarte, Luís Cordeiro da Silva e Adriano Silva, pelo apoio técnico incondicional e indispensável à realização deste trabalho.

Aos amigos Luciano Augusto de Araújo Ribeiro, Marcos Antônio Alves de Medeiros e Julianeli Tolentino de Lima pelo apoio e incentivo na pós-graduação.

À Profa. Dra. Liana Clébia pela amizade, companheirismo, carinho e ensinamentos, além de ter aberto as portas do laboratório de Psicofarmacologia para mim.

À Franklin e Rubens do nosso laboratório de Psicofarmacologia pela imensa ajuda na parte experimental deste trabalho.

À Fernando de Sousa Oliveira pelas discussões científicas e ensinamentos práticos nos modelos animais.

A todos os que fazem o laboratório de Psicofarmacologia (Alessandra, André Pinho, Camila Carolina, Carlúcia, Leandra Eugênia, Marcela Rodrigues, Naiana Gondim, Flávia Negromonte, Leilane Cristina, e todos os outros novatos) pela ajuda e oportunidade de transmiti-los algum conhecimento.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e poderem contribuir para a versão final desta Tese.

Ao Diretor do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, pela sua enorme contribuição no exame de qualificação e ser um exemplo de seriedade, profissionalismo e competência.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pelo tratamento sempre cordial, apoio e incentivo durante toda a minha pós-graduação.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, representada por Tânia.

Ao Biotério do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo fornecimento dos animais.

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção desta Tese.

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre...”*

(Paulo Freire)

Que eu não perca a VONTADE DE VIVER, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa...

Que eu não perca a vontade de TER GRANDES AMIGOS, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas...

Que eu não perca a vontade de AJUDAR AS PESSOAS, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, reconhecer e retribuir, esta ajuda...

Que eu não perca o EQUILÍBRIO, mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu caia...

Que eu não perca a LUZ E O BRILHO NO OLHAR, mesmo sabendo que muitas coisas que verei no mundo escurecerão meus olhos...

Que eu não perca a GARRA, mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários extremamente perigosos...

Que eu não perca o SENTIMENTO DE JUSTIÇA, mesmo sabendo que o prejudicado possa ser eu...

Que eu não perca o meu FORTE ABRAÇO, mesmo sabendo que um dia meus braços estarão fracos...

Que eu não perca a BELEZA E A ALEGRIA DE VER, mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma...

E acima de tudo...

Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente!

(Francisco Cândido Xavier)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XXI</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
1. GERAL .....	49
2. ESPECÍFICOS .....	49
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>50</b>
1. Local de Realização da Pesquisa .....	51
2. Revisão Bibliográfica .....	51
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
1. ANIMAIS.....	53
2. DROGAS E REAGENTES .....	53
3. APARELHAGEM .....	54
3.1. Aparelho da movimentação espontânea .....	54
3.2. Aparelho do Rotarod .....	55
3.3. Aparelho do labirinto em cruz elevado. ....	55
3.4. Aparelho da placa perfurada (“Hole-board”).....	56
3.5. Aparelho de Eletrochoque (auricular).....	57
3.6. Aparato do <i>Single sucrose gap</i> .....	58

4. MÉTODOS .....	59
4.1. Estudo da Toxicidade Aguda (DL <sub>50</sub> ) .....	59
4.2. Avaliação geral da Atividade no Sistema Nervoso Central .....	59
4.2.1. Triagem Farmacológica Comportamental .....	59
4.2.2. Teste da Movimentação Espontânea .....	62
4.2.3. Teste da potencialização do sono induzido por pentobarbital .....	62
4.2.4. Avaliação da coordenação motora (teste do Rotarod) .....	63
4.3. Avaliação específica da atividade no Sistema Nervoso Central .....	64
4.3.1 Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa .....	64
4.3.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado .....	64
4.3.1.2. Teste da placa perfurada (“Hole-board”) .....	64
4.3.2. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante .....	66
4.3.2.1. Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) .....	66
4.3.2.2. Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES) .....	66
4.4. Estudo do mecanismo da atividade anticonvulsivante .....	68
4.4.1. Avaliação temporal da atividade anticonvulsivante .....	68
4.4.2. Teste das convulsões induzidas pela picrotoxina .....	68
4.4.3. Avaliação da participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA <sub>A</sub> .....	69
4.4.4. Avaliação da atividade antioxidante .....	70
4.4.5. Técnica de <i>Single sucrose gap</i> .....	71
4.5. Análise Estatística .....	73
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
1. Estudo da Toxicidade Aguda (DL <sub>50</sub> ) .....	75
2. Avaliação geral da Atividade no Sistema Nervoso Central .....	75
2.1. Triagem Farmacológica Comportamental .....	75

2.2. Teste da Movimentação Espontânea .....	77
2.3. Teste da potencialização do sono induzido por pentobarbital .....	78
2.4. Avaliação da coordenação motora (teste do Rotarod) .....	80
3. Avaliação específica da atividade no Sistema Nervoso Central.....	81
3.1 Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa .....	81
3.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado.....	81
3.1.2. Teste da placa perfurada (“Hole-board”) .....	84
3.2. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante .....	86
3.2.1. Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ).....	86
3.2.2. Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES) .....	87
4. Estudo do mecanismo da atividade anticonvulsivante .....	87
4.1. Avaliação temporal da atividade anticonvulsivante .....	88
4.2. Teste das convulsões induzidas pela picrotoxina.....	90
4.3. Avaliação da participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA <sub>A</sub> .....	92
4.4. Avaliação da atividade antioxidante .....	94
4.5. Técnica de <i>Single sucrose gap</i> .....	96
<b>VI. DISCUSSÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>VII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química das principais drogas antiepilépticas: (A) lamotrigina, (B) gabapentina, (C) fenitoína, (D) carbamazepina e (E) diazepam... 31
- Figura 2.** Seqüência de eventos para o desenvolvimento de novas drogas com duração aproximada de cada fase..... 36
- Figura 3.** Estrutura química dos compostos: (A) isopreno, (B) monoterpeno e (C) sesquiterpeno..... 41
- Figura 4.** Estruturas químicas da  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (A) e de outros monoterpenos com atividade no SNC: limoneno (B), mentol (C), carvona (D) e hidroxidihidrocarvona (E)..... 45
- Figura 5.** Aparelho para registro da movimentação espontânea..... 55
- Figura 6.** Aparelho de Rotarod..... 55
- Figura 7.** Aparelho do labirinto em cruz elevado..... 56
- Figura 8.** Aparelho da placa perfurada..... 57
- Figura 9.** Aparelho de eletrochoque-auricular..... 57
- Figura 10.** Aparato do *Single sucrose gap*..... 58



<b>Figura 11.</b> Câmara para montagem experimental para obtenção dos registros do Potencial de ação composto (PAC).....	72
<b>Figura 12.</b> Esquema ilustrativo da montagem experimental para obtenção dos registros do PAC .....	72
<b>Figura 13.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre a atividade locomotora em camundongos.....	77
<b>Figura 14.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre a hipnose induzida pelo pentobarbital em camundongos.....	79
<b>Figura 15.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre a coordenação motora de camundongos no teste do Rotarod.....	80
<b>Figura 16.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.....	82
<b>Figura 17.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.....	83
<b>Figura 18.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) no teste da placa perfurada em camundongos.....	85
<b>Figura 19.</b> Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em camundongos.....	86

<b>Figura 20.</b> Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo em camundongos .....	87
<b>Figura 21.</b> Efeito da epóxi-carvona na dose de 300 mg/kg i.p. sobre as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em camundongos.....	89
<b>Figura 22.</b> Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas quimicamente pelo picrotoxina em camundongos.....	91
<b>Figura 23.</b> Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em camundongos.....	93
<b>Figura 24.</b> Efeito antioxidante <i>in vitro</i> da epóxi-carvona em diferentes concentrações.....	95
<b>Figura 25.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre os parâmetros do PAC.....	97
<b>Figura 26.</b> Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre os parâmetros do PAC.....	98
<b>Figura 27.</b> Efeito da lidocaína (5 mM) no registro do PAC. A figura mostra registro representativo de quatro experimentos realizados. ....	99
<b>Figura 28.</b> Efeito da lidocaína na amplitude do PAC em função da incubação de 1 mM (A) ou 5 mM (B) de lidocaína.....	100
<b>Figura 29.</b> Efeito da lidocaína (1 mM) na constante de tempo de repolarização do PAC em função da incubação de lidocaína. ....	101

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Classificação dos terpenos e algumas funções. ....	41
<b>Quadro 2.</b> Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica. ....	61
<b>Quadro 3.</b> Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração da EC .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>DAEs</b>	Drogas antiepilépticas
<b>DL<sub>50</sub></b>	dose letal 50%
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>EC</b>	$\alpha,\beta$ -epóxi-carvona
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da média
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FLU</b>	Flumazenil
<b>FNB</b>	Fenobarbital
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor tipo A do GABA
<b>HEPES</b>	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina – N`-[2-etanosulfônico]
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MES</b>	Eletrochoque auricular máximo
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>PAC</b>	Potencial de ação composto
<b>PIC</b>	Picrotoxina
<b>PTZ</b>	Pentilenotetrazol
<b>Q<sub>1/2</sub></b>	Concentração da substância que inibe 50% da peroxidação
<b>r.p.m.</b>	Rotações por minuto
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>seg</b>	Segundo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b><i>Tau</i></b>	Constante de tempo de repolarização
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>Tween 80</b>	Polioxetileno Sorbitano Monoleato

**OBS:** As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Claudino, F. S. Caracterização da atividade anticonvulsivante de epóxi-carvona em modelos animais. 2007. 152f. Tese de Doutorado – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

## RESUMO

No presente trabalho investigou-se os efeitos psicofarmacológicos em modelos animais da  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (EC), monoterpene monocíclico obtido por síntese a partir da R-(-)-carvona. A  $DL_{50}$  por via i.p. da EC para camundongos foi de 922,6 mg/kg. Na triagem farmacológica comportamental, para avaliar o possível efeito no SNC da EC, observou-se que os camundongos tratados apresentaram alterações comportamentais semelhantes às apresentadas por drogas que diminuem a atividade do SNC, tais como: diminuição da ambulação, ptose palpebral, resposta ao toque diminuída, sedação e analgesia. Animais tratados com EC (200, 300 ou 400 mg/kg) apresentaram diminuição da atividade motora quando comparados com animais não tratados (controle), até 120 minutos após a administração. As doses de 300 ou 400 mg/kg induziram um aumento significativo do tempo de sono dos animais não alterando, no entanto, a sua latência. EC na dose de 400 mg/kg induziu uma redução no tempo de permanência dos animais na barra giratória (teste do rotarod). No teste do labirinto em cruz elevado, os animais tratados com EC na dose de 300 mg/kg apresentaram aumento no número de entradas e tempo total de permanência nos braços abertos, além de promover uma redução no número de entradas e tempo total de permanência nos braços fechados quando comparado com o grupo controle, sugerindo uma ação ansiolítica. EC apenas na dose de 400 mg/kg apresentou um aumento significativo na latência para o início dos mergulhos no teste da placa perfurada e as doses de 200, 300 ou 400 mg/kg promoveram uma redução no número de mergulhos apresentando assim perfil de droga sedativa. EC nas doses de 300 ou 400 mg/kg promoveu proteção de 75 % e 87,5 %, respectivamente, contra as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ, e foram eficazes em prevenir as convulsões tônicas induzidas pelo MES nas doses de 200 (25 %), 300 (25 %) ou 400 mg/kg (95,5 % de proteção). A epóxi-carvona foi capaz de promover um aumento na latência para o desenvolvimento das convulsões induzidas pela PIC nas doses de 300 e 400 mg/kg e promoveu proteção significativa contra as convulsões nas doses de 200 (12,5 %), 300 (12,5 %) ou 400 mg/kg (87,5 % proteção). A presença do flumazenil, um antagonista seletivo do sítio benzodiazepínico dos receptores  $GABA_A$ , não foi capaz de reverter o efeito anticonvulsivante da EC. A epóxi-carvona reduziu os níveis de lipoperoxidação *in vitro* apresentando portanto, um perfil de droga antioxidante, e promoveu redução da amplitude do PAC após 20 ou 30 minutos da incubação de EC na dose de 1 mM e essa redução do PAC é um indicativo do bloqueio de canais de  $Na^+$  dependentes de voltagem. Conclui-se que EC apresenta efeitos psicofarmacológicos, com perfil de droga anticonvulsivante e antioxidante, e seu mecanismo de ação não envolve a ativação, pelo menos de forma direta, do sítio benzodiazepínico dos receptores  $GABA_A$  e envolve o bloqueio dos canais para sódio dependentes de voltagem.

**PALAVRAS CHAVE:** monoterpene, óleo essencial,  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona, anticonvulsivante, antioxidante.

## ABSTRACT

In the present work was investigated the psychopharmacological effects of  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone (EC) monoterpene monocyclic obtained by synthesis from R-(-)-carvone in animals models. LD<sub>50</sub> by i.p. of EC was 922.6 mg/kg and in the behavioral screening the evaluate possible effects in CNS of EC was observed that the treated mice presented behavioral alterations similar to that observed by drugs that reduce the CNS activity such as: reduction of the ambulation, palpebral ptosis, ataxia, sedation and analgesy. Animals treated with EC (200, 300 or 400 mg/kg) presented reduction of the motor activity when was compared to not treated animals (control) at 120 minutes after administration. The doses of 300 or 400 mg/kg induced a significant increase of the total time of sleep of the animals, but did not have an increase in the sleep latency. EC at dose of 400 mg/kg induced a reduction in the time of permanence on the revolving bar (Rotarod test). In elevated plus-maze test the animals treated with EC at dose of 300 mg/kg showed increase of number of entries and total time spent in open arms beyond of promoted a reduction of the number of the entries and total time spent in enclosed arms as compared to control group suggesting an anxiolytic-like action. EC only at the dose of 400 mg/kg presented a significant increase of latency for beginning of the head-dips in hole-board test and at doses of 200, 300 or 400 mg/kg promoted a reduction in the number of the head-dips showing a sedative drug profile. EC at the doses of 300 or 400 mg/kg promoted protection of 75 % and 87.5 %, respectively, against convulsions induced chemically by PTZ and was efficient in prevents the tonic convulsions induced by MES in doses of 200 (25 %), 300 (25 %) e 400 mg/kg (95.5 % of protection).  $\alpha,\beta$ -Epoxy-carvone was capable to promote an increase of latency for development of convulsions induced by PIC at the doses of 300 or 400 mg/kg and promoted significant protection against convulsions at doses of 200 (12.5 %), 300 (12.5 %) or 400 mg/kg (87.5 % of protection). The presence of flumazenil, a selective antagonist of benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptor was not capable to reverts the anticonvulsant effect of EC.  $\alpha,\beta$ -Epoxy-carvone reduced the levels of *in vitro* lipoperoxidation therefore presented a antioxidant drug profile and reduced in a significant manner the amplitude of CAP (compound action potential) after 20 or 30 minutes of incubation of EC in dose of 1 mM and this reduction of CAP is an indicative of voltage-operated Na<sup>+</sup> channels blockade. It was concluded that EC presented psychopharmacological effects with anticonvulsant and antioxidant drug profile, and the mechanism of action seems not involve an activation at least in direct form the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors and involves voltage-operated Na<sup>+</sup> channels blockade.

**KEY WORDS:** monoterpene, essential oil,  $\alpha,\beta$ -Epoxy-carvone, anticonvulsant, antioxidant.

# Capítulo I

## *Introdução*

## **I. INTRODUÇÃO**

### **1. Considerações gerais sobre drogas psicotrópicas**

Psicotrópicos são aquelas drogas que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) e que modificam o funcionamento cerebral, sendo a psicofarmacologia é a área da farmacologia que se dedica ao estudo das drogas psicotrópicas, nos seus mais variados aspectos. Há milênios são conhecidas substâncias químicas que exercem seus efeitos no SNC e que de alguma forma influenciam a vivência e o psiquismo, ou seja, promovem modificações comportamentais, no humor ou nos aspectos emocionais. Fazendo-se uma análise do uso dessas drogas psicoativas ao longo da história, podem ser distinguidas duas finalidades correlatas, a primeira delas diz respeito à busca da modificação do comportamento e a outra visa produzir estados alterados de consciência com fins religiosos, cerimoniais e recreativos (ALMEIDA, 2006).

As drogas que atuam no SNC estão entre as primeiras que foram descobertas pelos seres humanos primitivos e ainda constituem o grupo de compostos farmacológicos mais amplamente estudados (COOPER et al., 1996).

As funções do SNC são complexas e a classificação dos efeitos das drogas que atuam nele (psicotrópicos) está muito longe de ser simples, e ainda não existe nenhuma base única satisfatória para esta classificação. Assim, a classificação numa base química, que estabelece categorias como os benzodiazepínicos e butiroferonas, não proporciona muita orientação para os efeitos farmacológicos. Por outro lado, a classificação farmacológica ou bioquímica é relativamente simples para drogas cujo mecanismo de ação está razoavelmente bem esclarecido (inibidores da monoamina oxidase e inibidores da recaptação de aminas), porém ainda existem casos, como por exemplo, dos alucinógenos, em que o mecanismo de ação é pouco conhecido (KATZUNG, 2003, GILMAN, 2003).

Outra possibilidade é adotar uma classificação empírica, baseada no efeito farmacológico global (exemplo: estimulante psicomotor) ou no uso



clínico (antidepressivos, antipsicóticos, antiepiléticos), mas isto apresenta a desvantagem pelo fato de que as indicações das drogas psicotrópicas podem frequentemente mudar de acordo com a conduta clínica (RANG et al., 2004).

De acordo com Almeida (2006), na classificação das drogas psicotrópicas podemos distinguir quatro divisões: psicoanalépticos (estimulantes da atividade do SNC), psicolépticos (depressores da atividade do SNC), psicodislépticos (alucinógenos ou perturbadores da atividade do SNC) e parapsicotrópicos (não apresentam um perfil adequado a nenhuma das classes anteriores).

As principais e mais estudadas classes dos psicotrópicos são: os antidepressivos, anticonvulsivantes, relaxantes musculares, ansiolíticos, hipnóticos e neurolépticos (POLATIN; DERSH, 2004).

Os antidepressivos podem ser divididos em: tricíclicos (imipramina e amitriptilina), agentes heterocíclicos (amoxapina e bupropiona), inibidores seletivos da recaptção de neurotransmissores e inibidores da monoamina oxidase (fenelzina e tranilcipromina). Todos eles exercem seus efeitos terapêuticos aumentando seletivamente as aminas biogênicas neurotransmissoras em múltiplas vias no SNC (SAWYNOK et al., 2001; BLIER; ABBOT, 2001).

Na classe dos anticonvulsivantes, o fenobarbital foi o primeiro agente orgânico sintetizado que se reconheceu como dotado de atividade anticonvulsivante. Os dois principais mecanismos de ação das drogas anticonvulsivantes são a potencialização da ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e a inibição dos canais para sódio dependentes de voltagem, onde podemos citar o fenobarbital, diazepam, tiagabina, fenitoína e carbamazepina (ATTAL, 2000; CLUFF, 2002).

Os relaxantes musculares incluem as drogas que não possuem efeitos periféricos no tônus muscular, mas sim efeitos no SNC, que causam relaxamento muscular, incluindo-se nesse grupo o baclofeno, mefenesina e alguns benzodiazepínicos (SCHOFFERMAN, 2003).

Os ansiolíticos e hipnóticos são drogas utilizadas no tratamento dos sintomas da ansiedade e no tratamento da insônia, respectivamente. Apesar dos objetivos clínicos serem diferentes, as mesmas drogas são frequentemente, usadas para ambas as finalidades. Os principais grupos de

drogas utilizados com esta finalidade são os benzodiazepínicos (diazepam e clordiazepóxido), barbitúricos (zolpidem, fenobarbital e pentobarbital), antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos (propranolol) e outras drogas (hidrato de cloral e meprobamato)(SCHATZBERG, 2003; RANG et al., 2004).

Na última classe estão os neurolépticos, também chamados de tranqüilizantes maiores ou ainda de agentes antipsicóticos. Do ponto de vista farmacológico caracterizam-se como antagonistas dos receptores da dopamina, embora muitas drogas atuem sobre outros alvos, particularmente os receptores da 5-HT, o que pode contribuir para sua eficácia clínica. As principais indicações para essas drogas são as psicoses (delírios, alucinações e perda de contato com a realidade) e sintomas associados com transtorno afetivo (bipolar) e transtornos severos de personalidade. Incluem as drogas típicas (clopromazina e haloperidol) e àquelas que têm menor tendência de causar efeitos colaterais motores indesejáveis, chamados de atípicos (clozapina, risperidona e sulpirida)(LIM et al., 2001; GILMAN, 2003)

## **2. Considerações gerais sobre a epilepsia**

Na antiga Grécia, a epilepsia era chamada de "doença sagrada". Naquela época acreditava-se que os portadores da doença possuíam características espirituais próprias, sendo passíveis de comunicação direta com os deuses. O tratamento dava ênfase nas medidas dietéticas, além de banhos de imersão e lavagens rituais. Apesar deste aspecto eminentemente espiritual, Hipócrates já acreditava em alterações orgânicas associadas à epilepsia. O conceito de cérebro, mente e corpo ainda não havia atingido o estágio de divisão pragmática que caracterizou os trabalhos de Galeno e Vesálio (JUNIOR, 2003)

Do ponto de vista semiológico, Hipócrates fez observações quanto à natureza dos ataques, dividindo-os em perda de consciência imediata e aqueles precedidos por auras. Sua idéia de fisiopatologia partia de interações entre o corpo e a natureza, influência das estações e dos ventos, além do regime alimentar. Em seus trabalhos refutava a hipótese de uma doença causada pelos deuses (ENCYCLOPEDIA BRÍTANNICA, 1952).

Durante o século XIX, Hughlings Jackson estabeleceu as bases da moderna epileptologia ao descrever as crises chamadas de psicomotoras (HUGHLINGS-JACKSON, 1880; TAYLOR, 1980) e teorizar pioneiramente o papel de descargas elétricas cerebrais na origem dos fenômenos epiléticos.

A primeira cirurgia funcional para epilepsia foi executada por Sir Victor Horsley no final do século XIX, em um paciente portador de gliose pós-traumática na região frontal, encaminhado por Hughlings Jackson (TAYLOR, 1986).

O aspecto macroscópico de endurecimento e redução volumétrica das estruturas mesiais do lobo temporal em pacientes epiléticos foi descrito pela primeira vez por Bouchet e Cazauvieilh em 1825. Em 1880, Sommer descreveu pela primeira vez os seus correlatos microscópicos e por volta de 1930, Berger descreveu os primeiros registros de atividade elétrica *in vivo*, que levaram a descrição do eletrencefalograma e possibilitaram o estudo das alterações epiléticas de forma funcional (FALCONER; TAYLOR, 1968).

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns e dados recentes da Organização Mundial de Saúde relatam que a doença chega a atingir cerca de 50 milhões de pessoas no mundo tendo uma prevalência em torno de 1% da população mundial. Há estimativas de que mais que 80% das pessoas com epilepsia vivem em países em vias de desenvolvimento (WHO, 2005). Entretanto, pouco progresso tem se obtido na compreensão da fisiopatogenia das convulsões e dos próprios tipos de epilepsias (McNAMARA, 1999).

As epilepsias caracterizam-se por alterações crônicas, recorrentes e paroxísticas na função neuronal, decorrentes de anormalidade na atividade elétrica cerebral (ALMEIDA, 2006). A disfunção neurológica na sua fase aguda é chamada de crise epilética, a qual pode manifestar-se por alterações sensitivas, emocionais ou cognitivas (COSTA et al., 1992). Na verdade, o evento mais dramático de alguns quadros de epilepsia é a convulsão, estando associado à atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupamento neuronal do córtex cerebral e estruturas hipocâmpais, cuja distribuição anatômica e duração de sua atividade determinam a natureza da crise (AVANZINI; FRANCESCHETTI, 2003).

As crises convulsivas podem ser associadas às diversas mudanças bioquímicas em algumas áreas cerebrais afetando vários neurotransmissores (monoaminas, aminoácidos e peptídios) (MICHOTTE et al., 1997, 2000), o metabolismo dos carboidratos, os sistemas de segundos mensageiros (AMPc, DAG e IP<sub>3</sub>) e a expressão gênica, que poderia estar envolvidas na fisiopatologia responsável pelas alterações ao longo do tempo nos neurônios (MELDRUM; GARTHWAITE, 1990; SIMONIÉ et al., 2000).

A crise epiléptica pode ser definida como uma manifestação excessiva e/ou hipersincrônica resultante da atividade epiléptica, usualmente auto-limitada ou não de neurônios cerebrais. As crises não auto-limitadas são denominadas crises contínuas e configuram o quadro de estado epiléptico. Este pode ser definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual da maioria das crises recorrentes sem que a função do SNC retorne ao período interictal (ENGEL, 2001).

O estado epiléptico pode se desenvolver com graus diferentes de envolvimento muscular. O evento motor consiste de um aumento ou diminuição da contração muscular. O aumento da contração pode ser do tipo tônico (contração mantida durante segundos ou minutos), clônico (contrações, seguidas de relaxamentos gerando abalos musculares sucessivos) ou mioclônico (abalos muito breves, na forma de abalos). A diminuição da contração caracteriza as mioclonias negativas e as crises atônicas (ENGEL, 2001).

Segundo a Classificação Internacional das Crises Epilépticas de 1981, (Comissão de Classificação e Terminologia do ILAE, 1981); há três grupos de crises: as parciais ou focais, as generalizadas e as crises não classificáveis.

As crises parciais ou focais, clínica e eletroencefalograficamente, são caracterizadas pela ativação de uma parte do cérebro, sendo subdivididas em crises parciais simples, quando há preservação da consciência e crises parciais complexas, quando há comprometimento da mesma. As crises generalizadas são aquelas em que há envolvimento, desde o início, de amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais. As crises não classificáveis não se enquadram nos dois subtipos acima descritos (ENGEL, 2001).

De acordo com a nova proposição da ILAE de 2001, a classificação passa a ser uma lista dos diferentes tipos de crises que são agora consideradas entidades diagnósticas (ENGEL, 2001). Isto significa que sua classificação se baseia simplesmente nas características semiológicas dos eventos, as quais deixam de apresentar qualquer conotação anatômica ou patofisiológica (LUDERS et al., 1998). É bem descrito que existem fatores que podem precipitar crises em pacientes susceptíveis, onde podemos citar: estímulos visuais (luz intermitente), pensamentos, música, leitura, alimentação, água quente, estímulos sensitivos-sensoriais e propioceptivos (ENGEL, 2001).

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema GABAérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (COSTA-LOTUFO et al., 2002; FREITAS et al., 2004). O sistema GABAérgico tem como neurotransmissor o GABA (ALMEIDA, 2006). O GABA está presente em todo o tecido cerebral, porém não em outros tecidos de mamíferos, exceto em quantidade mínimas. No cérebro é um importante neurotransmissor inibitório (CHEBIB et al., 2003), presente em quantidade abundante (LUDENS; WISDEN, 1991), e compostos que bloqueiam a síntese, a liberação sináptica ou a ação pós-sináptica do GABA induzem convulsões (CHEBIB et al., 2003).

Por meio de técnicas de biologia molecular foram identificados 3 subtipos de receptores GABAérgicos: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub> (BORMANN, 1988; FUKUSHIMA et al., 2007). GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> são receptores acoplados à canais iônicos, enquanto que o GABA<sub>B</sub> é um receptor acoplado à proteína G (CHEBIB; JOHNSTON, 1999).

Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. O subtipo GABA<sub>A</sub>, é um receptor ionotrópico (canal para cloreto) que medeia a capacidade de inibição rápida da neurotransmissão no cérebro de mamíferos, já o subtipo GABA<sub>B</sub> está localizado principalmente nos terminais pré-sinápticos e pertence a família de receptores metabotrópicos que são acoplados a proteína Gs e atuam na formação de segundos mensageiros (BORMANN, 1988; STRUZYNSKA; SULKOWSKI, 2004; ALMEIDA, 2006).

A inibição é um processo fundamental na atividade cerebral e a maioria das células neuronais cerebrais expressam estes receptores em suas membranas. Os mecanismos GABAérgicos estão diretamente envolvidos em

todos os processos fisiológicos e comportamentais e, indiretamente em várias doenças neuropsiquiátricas. Assim, várias drogas que atuam nos receptores GABA<sub>A</sub> têm sido utilizadas com sucesso na clínica no tratamento da ansiedade, epilepsia, distúrbios do sono, e indução e manutenção de anestesia, tais como benzodiazepínicos, barbitúricos, esteróides neuroativos, e o propofol (KORPI et al., 2002).

Ligantes que interagem com o sítio de ligação dos benzodiazepínicos têm um largo espectro de atividade desde agonistas totais e parciais a antagonistas. Agonistas parciais produzem uma resposta menor com ocupação total dos receptores e produzem curvas de concentração-efeito semelhantes aos agonistas totais na presença de um antagonista, que são substâncias que se ligam aos receptores sem promover alterações na função celular (KATZUNG, 2003; GILMAN, 2003).

Enquanto que agonistas dos benzodiazepínicos potencializam as correntes de cloreto induzidas pelo GABA, os agonistas inversos mostram propriedades nas descargas neuronais reduzindo assim a atividade GABAérgica. Do ponto de vista comportamental, agonistas inversos do sítio de ligação dos benzodiazepínicos produzem uma variedade de efeitos que são opostos aqueles dos clássicos agonistas benzodiazepínicos, como o diazepam (CRESTANI et al., 2002).

A década de 90 foi marcada por inúmeros avanços no desenvolvimento de Drogas antiepilépticas (DAEs), e desde 1993 novas drogas têm sido comercializadas em um ou mais países no mundo e isso leva à perspectiva de uma nova terapêutica para pacientes que até agora não tinham tratamento adequado com a utilização dos fármacos disponíveis no mercado (WHITE, 1999). A descoberta do fenobarbital em 1912 marcou o início da farmacoterapia moderna da epilepsia (ALMEIDA, 2006) e desde então a pesquisa tem se concentrado na descoberta de novas drogas com mecanismos de ação diferentes. A estratégia para a descoberta de novas DAEs é baseada em três caminhos: (a) triagem aleatória de drogas, (b) desenvolvimento direcionado de drogas (modificações estruturais para melhor efeito clínico e farmacológico) e (c) desenvolvimento baseado no mecanismo de ação. Todos os três caminhos têm levado à descoberta e identificação de novas drogas para o tratamento da epilepsia (WHITE, 1999).

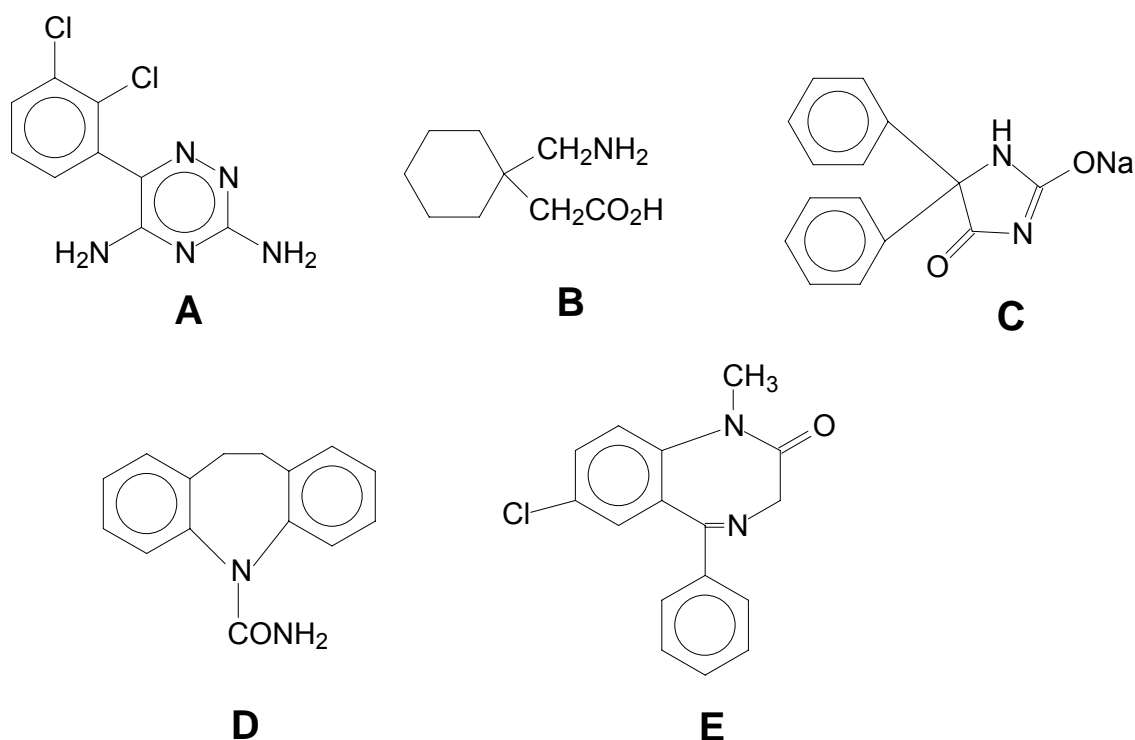
---

Apesar da ausência de fatores etiológicos bem compreendidos ser um limitante no uso da DAEs e da própria terapêutica, vários estudos têm mostrado que o mistério em determinar as bases celulares específicas da epilepsia vem promovendo um tratamento medicamentoso muito mais direcionado para o controle dos sintomas, em especial, das convulsões, do que a supressão da própria epileptogênese (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002).

Atualmente, apesar de um arsenal vasto de DAEs existentes no mercado e de agirem com certa seletividade no SNC, cerca de 30 % dos pacientes não conseguem ter um tratamento adequado com esses fármacos (HERMAN; PEDLEY, 1999; LÖSCHER; SCHMIDT, 2002). Um dos fatores importantes é a “farmacoresistência” que algumas DAEs apresentam chegando a acometer cerca de 40% dos doentes com epilepsia (REGESTA; TANGANELLI, 1999). Apesar desse importante registro, os mecanismos desencadeadores da farmacoresistência são pouco compreendidos (JEUB et al., 2002). As DAEs de primeira geração (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, diazepam e valproato de sódio) apresentam um número significativo de efeitos adversos tais como sedação, retenção hídrica, hepatotoxicidade, depressão, bradicardia, acidose respiratória, anemia megaloblástica e tolerância (HERMAN; PEDLEY 1999; CHIOZA et al., 2001; PEDLEY, 2001; BITTIGAU et al., 2002; ALMEIDA, 2006).

É verdade que nas duas últimas décadas, com o surgimento das DAEs de segunda geração (lamotrigina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina e leviracetam) e de terceira geração (remacemida, fosfenitoína e deznamida), o tratamento da epilepsia têm apresentado muitos avanços e várias outras substâncias têm sido propostas como novos agentes antiepilépticos. Contudo, o percentual de pacientes que não tem um controle apropriado continua sem modificações significativas (JOHANNESSEN et al., 1995; LÖSCHER; SCHMIDT, 2002; ALMEIDA, 2006). A figura 1 mostra as estruturas químicas das principais drogas antiepilépticas.

A farmacoresistência de certos tipos de drogas na epilepsia é geralmente considerada como sendo multifatorial, mas duas hipóteses recebem ultimamente maior atenção: a hipótese do alvo e a hipótese do transportador multidroga (SCHMIDT; LÖSCHER, 2005; LÖSCHER; POTSCHKA, 2005).



**Figura 1.** Estrutura química das principais drogas antiepilépticas: (A) lamotrigina, (B) gabapentina, (C) fenitoína, (D) carbamazepina e (E) diazepam.

Baseado na hipótese do alvo, mudanças intrínsecas ou adquiridas nos alvos das DAEs no cérebro levam ao desenvolvimento da farmacoresistência, enquanto que na hipótese do transportador multidroga o alvo nunca é alcançado por causa da maior expressão intrínseca ou adquirida de transportadores multidroga na barreira sanguínea cerebral restringindo a captação das drogas (SCHMIDT; LÖSCHER, 2005; LÖSCHER; POTSCHKA, 2005).

Estudos recentes que buscam o desenvolvimento de novas DAEs caminham no horizonte de drogas com potencial anticonvulsivante alto, controlando de forma seletiva os diversos tipos de epilepsias, e que apresentem baixa toxicidade (LÖSCHER; SCHMIDT, 1994; SCHMIDT; LÖSCHER, 2005; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Contudo, pesquisas mais recentes com possíveis anticonvulsivantes estão inseridas em novos conceitos, como drogas que atuem sobre a própria epileptogênese inibindo o desenvolvimento e progressão da epilepsia e abandonando um pouco o enfoque das DAEs tradicionais que agem, de maneira geral, suprimindo a



---

propagação inicial das convulsões tratando, assim, os sintomas (BRODIE, 2001; LÖSCHER; SCHMIDT, 2002; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006).

Numerosos mecanismos têm sido propostos para ação das DAEs, mas, de maneira geral, atuam principalmente por três mecanismos: (1) limitação dos disparos neuronais repetitivos por bloqueio de canais iônicos dependentes de voltagem (canais para  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{+2}$ ), (2) incremento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA (3) bloqueio da transmissão glutamatérgica excitatória (DECKERS et al., 2003).

Com o melhor entendimento dos mecanismos associados com os eventos epileptiformes e a atividade anticonvulsivante dos novos fármacos levaram a síntese de novas drogas especificamente direcionadas para a redução da excitação ou aumento da inibição do SNC. Como resultado muitas novas DAEs atuam em combinação de mecanismos que envolvem a modulação (abertura e fechamento) de canais, mais especificamente canais para  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{+2}$  e interferindo com a transmissão GABAérgica (SUZDAK; JANSEN, 1995; ROGAWSKI; PORTER, 1990; HOSFORD; WANG, 1997)

Por exemplo, a tiagabina que é inibidora da recaptção do GABA (SUZDAK; JANSEN, 1995), e a vigabatrina que é inibidora da GABA transaminase, enzima que é responsável pelo metabolismo do GABA (ROGAWSKI; PORTER, 1990; HOSFORD; WANG, 1997) atuam por modularem a transmissão GABAérgica por meio de um mecanismo diferente que a modulação alostérica direta dos receptores  $\text{GABA}_A$  pós-sinápticos. Além dessas DAEs o felbamato e topiramato atuam em um único mecanismo que é a inibição da neurotransmissão mediada pelo glutamato, seja nos receptores NMDA (felbamato) ou nos receptores AMPA/kainato (topiramato)(WHITE, 1999).

SV2A é uma proteína integral de membrana presente em todas as vesículas sinápticas, e tem papel crucial na regulação da função vesicular como o processo de exocitose (BAJJALIEH et al., 1994; CROWDER et al., 1999), e o descobriu-se que antiepiléptico leviracetam liga-se a essa proteína (LYNCH et al., 2004) e este fato teve importantes implicações para o entendimento da fisiopatologia da epilepsia e para o desenvolvimento de outros agentes antiepilépticos, já que tem sido relatado que esse fármaco possui um novo mecanismo de ação para as DAEs (MARGINEANU; KLITGAARD, 2002).

Essa hipótese é suportada pela ausência de efeito em um dos três principais mecanismos atualmente aceitos para as ações anticonvulsivantes dos antiepiléticos (facilitação GABAérgica, inibição da corrente de Na<sup>+</sup> ou inibição das correntes de Ca<sup>+2</sup> (MARGINEANU; KLITGAARD, 2002).

As novas drogas com atividade antiepilética são identificadas e desenvolvidas como resultado de sua habilidade de bloquear convulsões agudas induzidas em modelos animais de epilepsia. Dentre os numerosos modelos empregados na descoberta de novas drogas, o eletrochoque auricular máximo (MES), o teste do pentilenotetrazol e o abrasamento em ratos são os mais utilizados em programas de descoberta de novas DAEs (WHITE et al., 1998; LÖSCHER, 2002; LÖSCHER; SCHMIDT, 2002; WHITE, 2003; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006; ALMEIDA, 2006).

### **3. Considerações gerais sobre plantas medicinais**

Há milhares de anos que a flora medicinal tem sido utilizada pelas populações de várias partes do mundo face aos benefícios apresentados para manutenção da saúde humana, valor esse reconhecido pela Organização Mundial de Saúde que em 1978 passa a reconhecer a fitoterapia como alternativa de eficácia comprovada (VIEIRA, 1992).

Inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para cura ou mesmo o alívio de moléstias que têm atingido a humanidade (CARLINI, 1995; WILLIAMSON et al., 1996; DE FEO et al., 1996; AHMAD et al., 1998)

Apesar do enorme progresso na química medicinal, o desenvolvimento de uma nova droga tornou-se mais difícil, e as razões são múltiplas, mas incluem o fato que para a maioria das doenças, drogas com resultados clínicos satisfatórios estão disponíveis, e desenvolver uma droga que seja ativa no mesmo alvo e que não seja mais cara financeiramente, torna-se cada vez mais difícil (VERPOORTE; KIM; CHOI, 2006).

Em conseqüência, em 2003 somente 21 novas drogas foram trazidas ao mercado. Fato interessante, das 877 novas drogas que foram desenvolvidas no período 1981 a 2002, 6% eram produtos naturais, 27% eram derivados de produtos naturais, e 16% eram sintéticas desenvolvidos no modelo de um produto natural (NEWMAN, CRAGG; SNADER, 2003), demonstrando que a natureza é uma fonte importante para conduzir a novos fármacos.

A tendência decrescente no número de novas drogas não é uma condição de mudar-se num futuro próximo e o fato que algumas novas drogas importantes estiveram sendo retiradas do mercado devido aos efeitos colaterais sérios significa que no futuro introduzir novos fármacos no mercado será ainda mais difícil (VERPOORTE; KIM; CHOI, 2006).

Os custos para o desenvolvimento de uma nova droga estão entre 500 e 700 milhões de Reais, com de 10.000 a 100.000 compostos testados para encontrar uma nova droga. O tempo de desenvolvimento médio da idéia do fármaco até chegar a introduzi-lo no mercado é agora de 15 anos

(DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003; DICKSON; GAGNON, 2004; BUTCHER, 2005).

Estima-se que 80% da população do mundo continuam a usar a medicina tradicional no cuidado de saúde, incluindo o uso de cerca de 40.000 a 70.000 plantas medicinais (SCHIPPMANN; LEAMAN; CUNNINGHAM, 2006), onde na maioria dos casos, muito pouco é sabido sobre essas plantas (VERPOORTE; KIM; CHOI, 2006), sendo as plantas medicinais uns dos poucos recursos terapêuticos disponíveis para a maioria dessas populações, que as utilizam para tratar diferentes patologias (LAPA; LIMA, 1997; RASKIN et al., 2002).

Até o ano de 2000, aproximadamente apenas 15% de todas as espécies de plantas tinham sido estudadas pela fitoquímica e somente 5% para uma ou mais atividades biológicas (VERPOORTE, 2000).

Embora extensas pesquisas sobre plantas medicinais são publicadas a cada ano, somente algumas plantas foram estudadas detalhadamente para a atividade farmacológica. Considerando estes fatos, as medicinas tradicionais e, obviamente as plantas medicinais representam uma grande fonte para o desenvolvimento de novas drogas (VERPOORTE; KIM; CHOI, 2006).

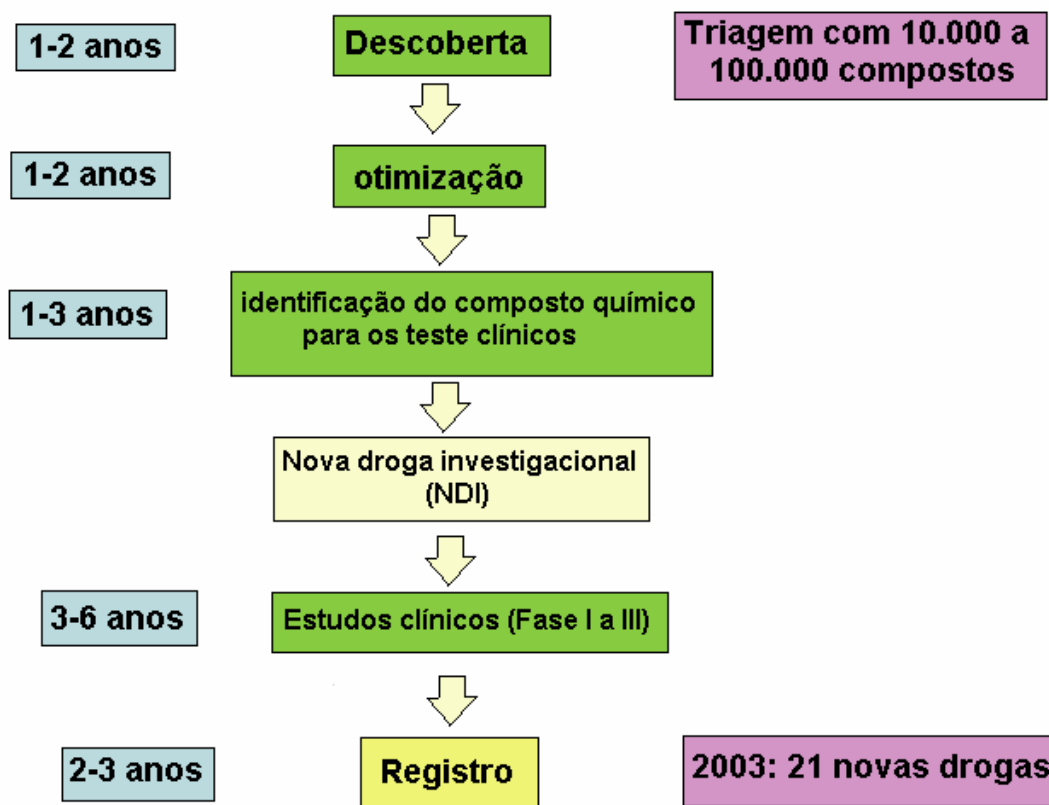
O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Grande parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (FARNSWORTH et al., 1985; KAUR et al., 2005).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área mostram-se impressionados com a diversidade de estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos encontrados na natureza (WALL; WANI, 1996).

Para obtenção de novas drogas, dois caminhos distintos estão disponíveis: reducionista (baseada no paradigma de um único alvo) usada

atualmente no desenvolvimento de drogas, e em um caminho holístico (baseado na medição dos efeitos da medicina tradicional em um sistema *in vivo*) (VERPOORTE; KIM; CHOI, 2006).

O desenvolvimento de uma nova droga consiste basicamente em duas fases: a primeira fase consiste na identificação de um novo composto ativo (usualmente referido como “nova entidade química”), que será aprovada como uma nova droga Investigacional (NDI) para experimentações clínicas (Figura 2). A segunda fase consiste em experimentações clínicas, que são divididas em três fases, onde se a droga passar por todas as três, a última etapa é o registro oficial.



**Figura 2.** Seqüência de eventos para o desenvolvimento de novas drogas com duração aproximada de cada fase (Modificado de VERPOORTE; KIM; CHOI, 2006).

Estudos têm mostrado o significativo papel dos produtos naturais na pesquisa de novas drogas, tanto na descoberta quanto no desenvolvimento. Por exemplo, cerca de 60-75% das novas drogas utilizadas no tratamento de câncer e doenças infecciosas são de origem natural (NEWMAN et al., 2003).

Para ilustrar o papel dos produtos naturais e dos seus derivados, na década de 1980, somente na Europa e nos Estados Unidos, o mercado de preparações fitoterápicas aproximava-se de 6 bilhões de dólares/ano (CARLINI, 1988), já no ano 1999 os valores mundiais chegaram próximos de 12 bilhões de dólares/ano (CALIXTO, 2000), e em 2005 atingiram os 25,5 bilhões de dólares, ficando claro que os produtos naturais continuam a desempenhar importante papel econômico e terapêutico na medicina moderna (RAUHALA, 2006).

Esse mercado tão rico e próspero tem impulsionado várias pesquisas. Atualmente um grande número de estudos científicos tem se concentrado nas chamadas terapias tradicionais como importante fonte para pesquisas (WHO, 1993).

No Brasil, além dos fatores econômicos, o lado social também é de grande importância onde se estima que, aproximadamente, 50 milhões de brasileiros não têm acesso ao medicamento e faz, muitas vezes, do tratamento com plantas sua única opção terapêutica (BARBOSA, 2006).

O desenvolvimento de novos medicamentos ou fármacos encontra-se profundamente alicerçado na história da descoberta da atividade farmacológica exibida por fontes de origens naturais (FARNSWORTH; MORRIS, 1976). Uma enorme variedade de medicamentos teve sua origem na extração direta de fontes naturais, usados praticamente sem modificações estruturais, como encontrados na natureza (DEWICK, 1998).

Desde a antiguidade que culturas indígenas utilizam substâncias com comprovada atividade farmacológica, por exemplo, curare, quinina, digoxina, entre tantos outros exemplos de plantas medicinais existentes no Brasil e no mundo. Até os dias atuais, é marcante o isolamento de substâncias a partir de fontes naturais, com atividades biológicas e potências superiores, como exemplificado pelo taxol, utilizado como anticancer, a huperzina (KHIARI; HASSINI; GRAVEL, 2001) utilizada no tratamento de doenças degenerativas e a artemisinina, promissora como antimalárico (CALIXTO, 2000).

Convém salientar que plantas indicadas para o tratamento de doenças com manifestações neurológicas e distúrbios psiquiátricos têm apresentado uma grande procura, porém, muitas não apresentam nenhum respaldo científico e às vezes nem sequer têm ação no SNC (ALMEIDA et al.,

1999). A maioria das plantas com ação no Sistema Nervoso Central (SNC) está inserida na categoria de drogas depressoras com amplo emprego terapêutico, pois de modo geral atuam por mecanismos que resultam na diminuição da ativação cerebral (ALMEIDA, 2003).

Vários são os exemplos históricos do emprego de plantas medicinais na obtenção e estudo de novas substâncias com ação no SNC, tais como a morfina e a codeína, obtidas a partir da *Papaver somniferum* que promovem analgesia e alterações no humor por atuar, principalmente, nos receptores opióides  $\mu$  (HUANG; KUTCHAN, 2000). A cafeína, extraída da *Paullinia cupana*, que pertence quimicamente a classe das xantinas semelhante à teofilina e teobromina, que promove efeitos estimulantes do SNC (HENMAN, 1986), a mescalina extraída da *lophophora williamsii* e a hiosciamina extraída da *Datura stramonium* que promovem efeitos alucinógenos (ALMEIDA, 2006).

---

#### 4. Considerações gerais sobre óleos essenciais

A origem do termo “óleo essencial” é antigo e seu uso permanece ao longo dos anos. Por mais que os avanços tecnológicos e as descobertas científicas mostrem a sua inadequação, nos setores produtivos, comerciais e científicos se continua empregando o termo “óleo essencial”, em todos os lugares do mundo (BLANCO et al., 2007).

Antes do surgimento da Química moderna, quando se praticava a Alquimia, buscava-se intensamente uma explicação para os aspectos metafísicos, a origem da porção etérea ou alma. Muitos alquimistas buscavam descobrir e isolar esse quinto elemento da matéria (QUINTA ESSÊNCIA), capaz de lhe promover animação, ou o ânima, a alma (BLANCO et al., 2007)

As plantas aromáticas que são aquelas que possuem aroma e/ou perfume, capazes de sensibilizar nosso olfato devem ter incentivado os alquimistas a buscar nelas a quinta essência da matéria, pois podiam perceber sua presença mesmo quando não estavam na sua frente. Ainda após a retirada da matéria, ou seja, da planta aromática ter sido retirada do recinto, sua presença era percebida pelo aroma que havia liberado. Paracelsus, um alquimista do século XVI, usando vapor conseguiu isolar substâncias que continham o aroma da planta, sua alma, ou a quinta essência daquele ser. Daí o uso de essência e óleo essencial para se designar o conjunto de substâncias que o vapor extrai, mas, tal qual o óleo, não se mistura à água. Por isso até hoje, mesmo não havendo substâncias de natureza lipídica ou óleo, nem sendo essencial, o termo óleo essencial ou essência é aceito e usado largamente (BLANCO et al., 2007)

Os óleos essenciais podem também ser chamados de óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físicas, como, por exemplo, a de terem aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a denominação de óleo; entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de semente (CUNHA, 2006)

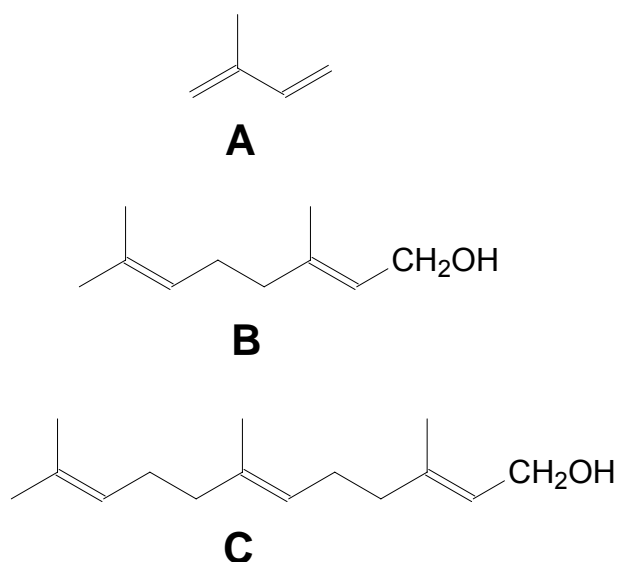
Outra característica importante dos óleos essenciais é o aroma agradável e intenso, sendo, por isso, também chamados de essência. São



solúveis em álcoois e em solventes orgânicos comuns, como éter, recebendo por isso, a denominação de óleo etéreo. Em água, os óleos essenciais apresentam solubilidade muito baixa, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos (COSTA, 1994; SIMÕES, 2003).

Os óleos essenciais, normalmente, são incolores e apresentam densidades inferiores à da água, com algumas exceções. Quase sempre são dotados de atividade óptica, com índices de refração elevados (COSTA, 1994). São princípios imediatos de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies. Caracterizam-se também por apresentarem variação de constituintes, são formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis entre outras (SIMÕES, 2003).

Nas plantas, os óleos apresentam-se em misturas de diferentes concentrações, tendo, normalmente um composto majoritário, que na grande maioria são derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando os últimos. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (90% dos óleos) e os sesquiterpenos (Figura 3).



**Figura 3.** Estrutura química dos compostos: (A) isopreno, (B) monoterpene e (C) sesquiterpene

De acordo com o número de unidades de isoprenos e átomos de carbono os terpenos estão classificados a seguir no quadro 1.

**Quadro 1.** Classificação dos terpenos e algumas funções (MELO, 2005).

Nome	Número de isoprenos	Número de átomos de carbono	Função	Exemplos
Monoterpenos	2	10	Aromas e essências	Geraniol, mentol, limoneno.
Sesquiterpenos	3	15	Intermediário na síntese de colesterol	Farnesol, cariofileno.
Diterpenos	4	20	Pigmentos e vitaminas	Fitol, vitamina A, E e K
Triterpenos	6	30	Intermediário na síntese de colesterol	Escaleno
Tetraterpenos	8	40	Pigmentos vegetais	Carotenos, xantofilas
Politerpenos	> 9	> 45	Isolantes	Látex

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a finalidade de utilização deste. Podemos citar alguns métodos:

- **Enfloração:** Este método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumaria. É principalmente aplicado em algumas plantas com baixo teor de óleo, mas de alto valor comercial. É empregado para extrair o óleo essencial de pétalas de flores; as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo tempo. Em seguida, as pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto é assim obtido (SIMÕES, 2003).
- **Prensagem:** Normalmente esse método é empregado para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES, 2003).
- **Extração com solventes orgânicos:** Os óleos essenciais podem ser extraídos com solvente (éter, éter de petróleo ou diclorometano). Porém, outros compostos lipofílicos são também extraídos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (SIMÕES, 2003).
- **Extração por fluido supercrítico:** Atualmente é um dos métodos de opção para a extração industrial de óleo essencial, pois permite recuperar os aromas naturais de vários tipos, não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO<sub>2</sub> é primeiramente liqüefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO<sub>2</sub> atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO<sub>2</sub> retornar ao

estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES, 1999; FUH, 1996; FAJARDO et al., 1997).

▪ Arraste por vapor d'água: Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações distintas de arraste por vapor d'água. Essa distinção é feita pela forma na qual se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor. A primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira. Na segunda, chamada de destilação pela água e vapor, a amostra permanece contida em um recipiente logo acima da água da caldeira, ficando assim separada da água. Na terceira, chamada propriamente de destilação pelo vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor de água que flui provém de um gerador próprio independente (COSTA, 1994; FAJARDO, 1997; SIMÕES, 2003).

A indústria utiliza, preferencialmente, a extração por vapor d'água por ser reduzido o contato da amostra com a água. Em relação aos métodos anteriores, no arraste por vapor d'água, é menos acentuada a hidrólise dos ésteres, a oxidação de componentes voláteis e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos (FUH et al., 1995; FAJARDO, 1997). A água residual desses métodos de extração é chamada de hidrolato, que normalmente é rica em compostos do óleo essencial solubilizado.

Devido a grande diversidade estrutural dos constituintes dos óleos essenciais, muitos deles apresentam várias atividades biológicas (CRAVEIRO et al., 1981), tais como atividade espasmolítica (LIS-BALCHIN; HART, 1999), antimicrobiana (VILJOEN et al., 2005; CELIKTAS et al., 2007; TEPE et al., 2006), antibacteriana (DELAMARE et al., 2007), antioxidante (EMINAGAOGLU et al., 2007; TEPE et al., 2006), depressora do sistema nervoso central (PERAZZO et al., 2003) e anticonvulsivante (ALMEIDA et al., 2003; KOO et al., 2003; KOO et al., 2004; SAYYAH et al., 2004; POURGHOLAMI et al., 1999; FREIRE et al., 2006).

Os monoterpenos podem ainda ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalool e geraniol); monocíclicos ( $\alpha$ -terpineol e terpinoleno) e bicíclicos ( $\alpha$ -pineno, tujona, cânfora e fenchona) (SANTOS, 2005).

Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados como o limoneno, álcoois como o mentol, aldeídos

---

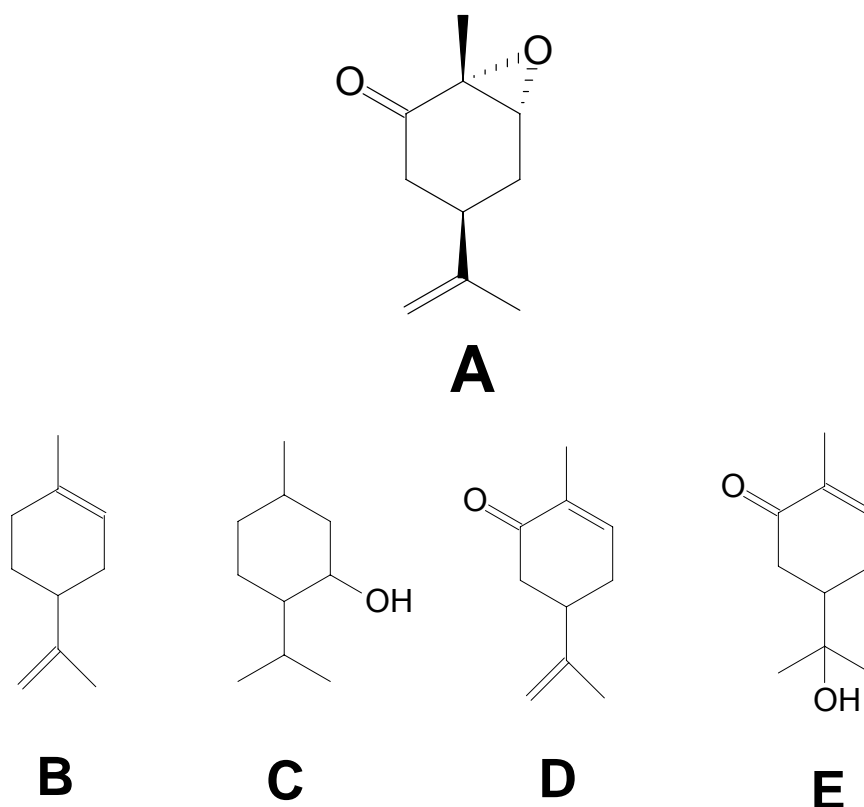
ou cetonas como a mentona e carvona, lactonas (os monoterpenos lactônicos são chamados de iridóides, exemplo nepelactona) e tropolonas como  $\gamma$ -tujaplicina. Em cada um desses subgrupos, classificam-se inúmeras substâncias, caracterizadas por cerca de 200 tipos diferentes de esqueletos. O número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8000, como componentes descritos em óleos essenciais é estimado um número superior a 150 monoterpenos e 1000 sesquiterpenos (SIMÕES, 1999).

Compostos derivados de monoterpenos também apresentam várias propriedades farmacológicas, onde podemos citar algumas delas no SNC tais como antinociceptiva (DE SOUSA et al., 2004), sedativa (DE SOUSA et al., 2006b) e antidepressiva (DE SOUSA et al., 2006c).

Trabalhos têm relatado atividade anticonvulsivante de monoterpenos, tal como o limoneno (VIANA et al., 2000) e citronelol (DE SOUSA et al., 2006a).

O SL-1, um monoterpeno sintético homólogo ao GABA demonstrou atividade no modelo do pentilenotetrazol (PTZ) (LIBROWSKI et al., 2000). Linalol é outro monoterpeno que possui efeito protetor contra as convulsões induzidas por PTZ, picrotoxina e NMDA (SILVA BRUM et al., 2000; ELISABETSKY et al., 1995). Além disso, pineno, eugenol e metileugenol que estão presentes no óleo essencial das folhas de *L. nobilis* exibiram perfil anticonvulsivante em alguns modelos, como o teste do PTZ (CONSROE et al., 1981; DALLMEIER; CARLINI, 1981)

A  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (EC) é um monoterpeno monocíclico que pode ser encontrado no óleo essencial de *Carum carvi* (IACOBELIS et al., 2005) de *kaempferia galanga* (JIROVETZ et al., 2001) e de outras plantas (KAISER, 1997) e que para este estudo foi obtido através de síntese a partir da R-(-)-carvona. É um análogo de vários monoterpenos (UMEZU et al., 2001; ALMEIDA et al., 1996) e apresenta grupos funcionais e estrutura química semelhante com vários outros monoterpenos (Figura 4) que possuem atividade farmacológica no SNC, tais como o limoneno, mentol, mentona, pulegona, carvona e hidroxidihidrocarvona (UMEZU et al., 2001; DE SOUSA et al., 2006a; DE SOUSA et al., 2006b).



**Figura 4.** Estruturas químicas da  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (A) e de outros monoterpenos com atividade no SNC: limoneno (B), mentol (C), carvona (D) e hidroxidiidrocarvona (E).

Pesquisas bibliográficas realizadas em vários bancos de dados como Natural Products ALERT (NAPRALERT), MEDLINE, SCIENCE DIRECT, dentre outros se verificou que o único estudo biológico realizado com a EC foi desenvolvido por Arruda et al. (2006), onde caracterizou a ação antimicrobiana do composto contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Diante do fato de que vários monoterpenos apresentam atividade no SNC, especificando-se atividade anticonvulsivante, e ao fato da EC apresentar estrutura semelhante a tais monoterpenos (Figura 4) é plausível hipotetizar que a EC possua atividade no SNC. Assim o presente trabalho tem por objetivo avaliar e caracterizar a atividade anticonvulsivante da EC utilizando modelos animais.

## **II. JUSTIFICATIVA**

A epilepsia é uma condição neurológica grave de maior prevalência no mundo e que pode induzir a dificuldade na execução das atividades profissionais do paciente (GILLIAM et al., 2004). A incidência da epilepsia varia de acordo com a localização geográfica. Ela ocorre com maior frequência nos países em desenvolvimento, onde há maior índice de desnutrição, doenças infecciosas, deficiência no atendimento médico e carência no tratamento (DE LORENZO et al., 2001).

Em países mais desenvolvidos, a incidência é de aproximadamente 1%, ou seja, cinquenta milhões de pessoas são portadoras desta condição, aumentando para 2% em nações menos desenvolvidas, tornando-se um grave problema de saúde pública (BEAGLEHOLE et al., 1996).

A epilepsia é mais comum na infância, idade na qual ocorre um aumento na vulnerabilidade a infecções do SNC (meningite), acidentes (traumatismos cranianos) e outras doenças, a saber: sarampo, varicela e caxumba, cujas complicações podem causar crises epilépticas. O problema também poderá se manifestar com o envelhecimento e suas complicações vasculares (isquemia e doença de Parkinson) (LEONARD; LLINÁS, 1994).

Estima-se que o número de novos casos por ano está em torno de dois milhões em todo o mundo. Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência, e sabe-se que 70% a 80% das pessoas com epilepsia podem ter uma vida normal sem prejuízo social e psicológico se tiverem um tratamento e um acompanhamento psicológico adequado (BEAGLEHOLE et al., 1996).

Nos países em desenvolvimento, 60 a 90% das pessoas com epilepsia não recebem tratamento devido às deficiências do sistema de saúde e ao próprio estigma social, prejudicando seriamente a qualidade de vida do epiléptico e suas atividades profissionais (BEAGLEHOLE et al., 1996; GILLIAM et al., 2004).

Inúmeras pesquisas visam descobrir novas estratégias farmacológicas antiepilépticas por meio de novos compostos eficazes para a epilepsia de difícil controle ou de compostos com menor toxicidade para

aquelas já tratadas pelo arsenal terapêutico atualmente disponível (BOECK et al., 2004; EYAL et al., 2004; PISANI et al., 2004).

Diante do exposto onde se relata a importância de produtos naturais na descoberta de novos compostos com atividade biológica, especificando-se os monoterpenos, aliado ao fato da epilepsia, como já se sabe é um grave problema de saúde pública em quase todos os países, havendo, assim, uma real necessidade de se conhecer o processo convulsivo, justifica a realização de estudos psicofarmacológicos da EC utilizando modelos animais com o intuito de contribuir para a pesquisa de novas DAEs ou de novas descobertas de alternativas terapêuticas para humanos a partir desses achados.



## Capítulo II

### *Objetivos*

## II. OBJETIVOS

### 1. GERAL

Contribuir para o estudo psicofarmacológico da EC pela investigação de seus efeitos no SNC, utilizando metodologias específicas em animais de laboratório a fim de contribuir com a pesquisa de novas drogas antiepilépticas de ação central.

### 2. ESPECÍFICOS

- Determinar a toxicidade aguda da EC em camundongos pela via intraperitoneal.
- Identificar e caracterizar o efeito sobre o SNC da EC.
- Avaliar o possível efeito ansiolítico, sedativo e anticonvulsivante da EC em modelos animais.
- Caracterizar o efeito anticonvulsivante da EC em camundongos em nível temporal.
- Avaliar a ação no sistema GABAérgico (receptor GABA<sub>A</sub>) na ação anticonvulsivante da EC.
- Estudar o possível efeito de EC na profilaxia de doenças neurodegenerativas com o uso de metodologia para avaliação de atividade antioxidante.
- Avaliar o efeito da EC sobre o potencial de ação composto por meio da técnica de *single sucrose gap*.

## Capítulo III

### *Parte Experimental*

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. Local de Realização da Pesquisa

As atividades experimentais *in vivo* deste estudo foram desenvolvidas na sala de experimentação psicofarmacológica do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) Prof. Delby Fernandes de Medeiros e os ensaios na técnica de *single sucrose gap* foram realizados no laboratório de eletrofisiologia também no LTF da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB).

Os ensaios para a avaliação da atividade antioxidante foram realizados no departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

#### 2. Revisão Bibliográfica

A base desta revisão foi concentrada nas informações obtidas principalmente junto ao NAPRALERT – SM (Natural Products Alert), da Universidade de Illinois nos Estados Unidos da América (E.U.A.), MEDLINE e SCIENCE DIRECT, considerados como os maiores bancos de dados sobre publicações referentes à pesquisa de produtos naturais do mundo, e nos levantamentos bibliográficos no Chemical Abstracts e Biological Abstracts.

## Capítulo IV

### *Material e Métodos*

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

Para realização dos testes farmacológicos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) suíços, machos, albinos, com 3 meses de idade e pesando entre 28 – 35 gramas e ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, machos, albinos com peso variando de 230 – 350 gramas, procedentes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, selecionados e alojados em gaiolas de polipropileno, contendo vinte animais cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de  $21 \pm 2$  °C e ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 06h00 às 18h00 horas e fase escura de 18h00 às 6h00 horas), tendo livre acesso a alimentação (tipo *pellets* de ração da marca comercial Purina®) e água.

Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho (laboratório), por pelo menos trinta minutos de antecedência à execução do experimento, visando à adaptação ao ambiente novo e evitar possíveis alterações comportamentais dos animais. Todos os experimentos foram realizados no período das 07h00 às 13h00 e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em animais do LTF sob o protocolo número: 1105/06.

### 2. DROGAS E REAGENTES

Foram utilizadas nos experimentos as seguintes drogas e reagentes:

O diazepam foi obtido da Roche (Brasil), o pentilenotetrazol, fenobarbital, flumazenil, pentobarbital, picrotoxina, Tween 80 (polioxetileno Sorbitano Monoleato), HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina – N`-[2-etanosulfônico]), ácido tricloroacético foram obtidos da Sigma-USA.

As drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), com exceção do flumazenil que foi administrado por via subcutânea (s.c.), no volume de 0,1 mL/10 g de peso de camundongo. EC foi preparada no

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba como descrito por Klein e Ohloff (1963), e foi dissolvida em solução de Tween 80 a 5% formando uma emulsão, onde para todos os experimentos foi administrado apenas a solução de Tween 80 a 5% (veículo) para verificar a interferência do agente emulsificante na ação farmacológica da EC.

### **3. APARELHAGEM**

#### **3.1. Caixa de atividade**

O aparelho para registro da movimentação espontânea utilizado foi o modelo 7430 da Ugo Basile (Comerio, VA, Itália) que é composto de quatro caixas e uma unidade eletrônica contendo uma tela gráfica onde são efetuadas as operações e os resultados observados.

Cada caixa de atividade é feita de persplex e acrílico de cor cinza, com as dimensões de 35 cm de comprimento, 23 cm de largura e 20 cm de altura, podendo ser utilizada para até quatro camundongos. O seu piso é constituído de 30 barras de aço inoxidável, com 3 mm de diâmetro e espaços entre si de 11 mm. As barras pares são eletrificadas, entretanto, a corrente conduzida através do corpo do animal corresponde a poucos pA estando abaixo do limiar sensitivo, sem provocar danos ao animal.

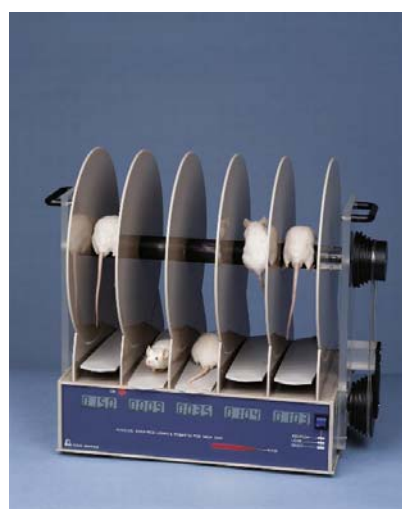
Com a movimentação o animal produz alterações nos pulsos que são enviados, através das barras ativas ligadas à eletricidade, para o detector de resistência e, em seguida, são convertidos em valores numéricos visíveis na tela e que podem ser impressos. A movimentação animal é registrada automaticamente, em intervalos estabelecidos pelo experimentador (Figura 5).



**Figura 5.** Aparelho para registro da movimentação espontânea.

### 3.2. Aparelho do Rotarod

O aparelho de Rotarod foi inicialmente descrito por Dunham e Mya (1957) e constitui-se de uma barra giratória de 5 cm de circunferência e 40 cm de comprimento, dividida em quatro compartimentos iguais, separados por cinco discos de 48 cm de diâmetro. O modelo utilizado foi o 7750 (Ugo Basile (Comerio, VA, Itália) (Figura 6), o qual possui controles para o ajuste da velocidade da barra giratória e contabilizar de forma automática o tempo de permanência dos animais na barra.



**Figura 6.** Aparelho de Rotarod.



### 3.3. Aparelho do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é feito de madeira (Figura 7), possuindo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), que medem 50 cm de comprimento por 10 cm de largura e 30 cm de altura, e dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Os braços abertos e fechados cruzam-se numa área central dotada de uma caixa de contenção removível, onde os animais são colocados e em seguida é retirada para que os animais possam explorar o labirinto. Todo esse aparato é colocado num suporte (34 x 34 cm) com 50 cm elevado em relação ao solo.



**Figura 7.** Aparelho do labirinto em cruz elevado.

### 3.4. Aparelho da placa perfurada (“Hole-board”)

O aparelho da placa perfurada (“hole-board”) utilizado foi o modelo 6650 da Ugo Basile (Comerio, VA, Itália), sendo constituído de uma área de 40 x 40 cm e possuindo 16 orifícios de 3 cm de diâmetro, acoplados a fotocélulas sensíveis ao mergulho da cabeça do animal, as quais são conectadas a um monitor que registra o número de mergulhos e contém também dispositivos para ligar e zerar o aparato. Essa placa é posicionada a 18 cm do balcão por meio de dois suportes localizados na parte inferior do mesmo (Figura 8).



**Figura 8.** Aparelho da placa perfurada.

### 3.5. Aparelho de Eletrochoque (auricular)

O aparelho utilizado na indução das convulsões por impulsos elétricos foi o ECT UNIT 7801 da Ugo Basile (Comerio, VA, Itália) (Figura 9), liberando um pulso na freqüência de 150 pulsos/segundo e 0,2 segundos de duração com uma corrente nominal de 50 mA de intensidade, (THAVENDIRANATHAN et al., 2003).



**Figura 9.** Aparelho de eletrochoque-auricular

### 3.6. Aparato de “single sucrose gap”

O aparato de *single sucrose gap* foi constituído por um estimulador do qual foram disparados estímulos elétricos supramáximos (4-6 V), com pulso de 0,1 ms de duração e uma frequência de aquisição de 11.000 Hz. Uma placa Analógica/Digital (Lynx, São Paulo) fazia a conversão do sinal elétrico para digital e que por sua vez estava conectada a um microcomputador PC-compatível, no qual foram realizadas as leituras do potencial de ação composto (PAC) (Figura 10).

Tanto a aquisição como as análises dos dados foram realizadas utilizando o programa Aqdados (Lynx, São Paulo). Para realizar o ajuste dos pontos experimentais foi utilizado o programa Sigmaplot, v 5.0 for DOS.



**Figura 10.** Aparato de *Single sucrose gap*

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Estudo da Toxicidade Aguda (DL<sub>50</sub>)**

O teste da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) foi introduzindo por Trevan em 1927 e modificado por Litchfield e Wilcoxon (1949). É um importante parâmetro na condução, com segurança, dos estudos farmacológicos, pois, a partir da determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), ou seja, a dose responsável pela morte de 50 % dos animais, pode-se determinar doses relativamente seguras para os ensaios farmacológicos.

Neste teste utilizamos a metodologia descrita por Lorke (1983), com alterações, onde foi avaliada a toxicidade aguda da epóxi-carvona pela via intraperitoneal (i.p.).

Grupos de 10 animais foram separados e receberam as doses de 500, 750, 1000 ou 2000 mg/kg de EC. Um grupo controle recebeu administração da solução de tween 80 a 5% (veículo).

Os animais foram observados diariamente durante 7 dias e foi registrado o número de animais mortos dia após dia. A DL<sub>50</sub> foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism® versão 4.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

### **4.2. Avaliação geral da Atividade no Sistema Nervoso Central**

#### **4.2.1. Triagem Farmacológica Comportamental**

Esse protocolo experimental é baseado no método descrito por Almeida et al. (1999) e Almeida (2006) no qual são estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. De forma que ocorrendo qualquer alteração comportamental em decorrência de tratamentos é possível inferir uma relação com atividade no SNC.

Para tanto, grupos de oito camundongos machos foram tratados com as doses de 200 ou 300 mg/kg de EC.

O grupo controle recebeu solução de tween 80 a 5% (veículo).

Após as respectivas administrações, os camundongos foram colocados em gaiolas de polipropileno (em grupos de quatro animais cada) e observados a cada trinta minutos, durante quatro horas, seguindo-se um protocolo experimental padrão de avaliação comportamental (Quadro 2).

**Quadro 2.** Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica (ALMEIDA 2006).

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
<b>1 – SNC</b>					
<b>A – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>B – Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>C – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					

Observações complementares.: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Responsável Técnico

#### **4.2.2. Teste da Movimentação Espontânea**

Camundongos foram divididos em quatro grupos de oito animais. Veículo (solução de tween 80 a 5%) ou EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg foram administradas. A atividade motora espontânea dos animais foi mensurada utilizando a caixa de atividade (controlador modelo 7441 e caixa de detecção modelo 7432, Ugo Basile, Comerio, VA, Itália) em 30, 60, 90 e 120 minutos após administração (MATTEI; CARLINI, 1995; ALMEIDA, 2006).

O piso da caixa de detecção 7432 é feito de barras de aço inoxidável isolado, onde a movimentação dos animais nas barras é transformada em pulsos elétricos. Os animais foram colocados individualmente em cada caixa de atividade e efetuada a leitura basal da movimentação. Após cada período da administração da EC até 120 min. O número de impulsos elétricos registrados pela caixa de atividade é proporcional à movimentação dos animais.

#### **4.2.3. Teste da potencialização do sono induzido por pentobarbital**

Nesse experimento é possível verificar se a substância em estudo tem ação depressora no SNC, ou seja, se possui atividade neuro-sedativa ou ainda se possui um perfil de droga hipnótica (SANTOS et al., 1996).

Pentobarbital sódico na dose hipnótica de 40 mg/kg foi administrado em quatro grupos de oito animais após 30 min de tratamento com veículo (solução de tween 80 a 5%) ou EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg. A latência (intervalo entre a administração de pentobarbital sódico e a perda do reflexo de endireitamento) e a duração do tempo de sono (o intervalo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento) foram mensuradas (ELISABETSKY et al., 1995; MATTEI et al., 1998; ALMEIDA, 2006).

#### **4.2.4. Avaliação da coordenação motora (teste do Rotarod)**

O efeito sobre a coordenação motora dos animais foi avaliado utilizando-se o aparelho de Rotarod, e consiste na avaliação da coordenação motora dos animais pelo tempo de permanência dos camundongos na barra giratória (CAPASSO, 1996; ALMEIDA, 2006).

Foi realizada uma pré-seleção dos animais, sem administração de substâncias, cujo critério era a permanência na barra giratória (2,5 cm diâmetro, 7 r.p.m., 25 cm acima do solo) do aparelho de Rotarod por pelo menos três minutos (MENDES et al., 2002).

Vinte e quatro horas após a pré-seleção, os camundongos foram divididos em quatro grupos de oito animais. O primeiro grupo, considerado como controle, recebeu solução tween 80 a 5% (veículo); os três grupos experimentais receberam EC nas doses de 200, 300 e 400 mg/kg.

Após 30 minutos os animais foram colocados na barra giratória e avaliou-se o tempo de permanência total dos mesmos no aparelho, com até três reconduções (MORAIS et al., 1998). Animais que falharam mais que uma vez em permanecer por três minutos na barra giratória constitui um resultado positivo para perda da coordenação motora (DUNHAM; MIYA, 1957).



### **4.3. Avaliação específica da atividade no Sistema Nervoso Central**

#### **4.3.1 Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa**

##### **4.3.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado**

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado inicialmente por Handley e Mithani em 1984, a partir de um modelo criado por Montgomery em 1955 (PEREZ, 1998). Este é largamente utilizado em modelo animal de ansiedade e quando colocado nesse aparelho, o animal mostra sinais de medo tais como: congelamento, defecação, micção e aumento do nível plasmático do hormônio do estresse, a cortisona (ALMEIDA, 2006).

O objetivo deste teste é verificar os possíveis efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos das substâncias, uma vez que drogas ansiolíticas levam o animal ao aumento do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas induzem ao aumento dos mesmos parâmetros nos braços fechados (LISTER, 1987).

Neste experimento foram utilizados dois grupos de oito camundongos, um foi tratado com veículo (solução de tween 80 a 5%) e o outro com a EC na dose de 300 mg/kg. Trinta minutos após os tratamentos cada animal foi colocado no centro do labirinto e observado por um período de cinco minutos, registrando-se o número de entradas e o tempo total de permanência em ambos os braços, abertos e fechados.

##### **4.3.1.2. Teste da placa perfurada (“Hole-board”)**

Esse teste tem como objetivo avaliar a emocionalidade, ansiedade e/ou resposta por estresse em animais (RODRIGUIEZ et al., 1987). Foram utilizados cinco grupos de oito animais: um grupo controle, tratado com veículo (solução de tween 80 a 5%), um grupo tratado com diazepam na dose 1 mg/kg e três grupos tratados com a EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg.

Após 30 minutos dos tratamentos os animais foram colocados individualmente no centro da placa, onde por um período de cinco minutos foi registrado o tempo entre a colocação do animal na placa e o primeiro mergulho da cabeça em qualquer das cavidades (latência) e o número de total de mergulhos (MOUNIER; LALONDE, 1995).

### **4.3.2. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante**

#### **4.3.2.1. Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)**

Para determinação de atividade anticonvulsivante, grupos de oito camundongos machos foram pré-tratados com solução tween 80 a 5% (veículo). Os grupos experimentais foram pré-tratados com a EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg.

Um grupo de animais recebeu diazepam (DZP) na dose de 4 mg/kg, considerado como droga padrão de ação antiepiléptica para este teste.

Transcorridos 30 minutos dos pré-tratamentos administrou-se em todos os animais, o PTZ na dose de 60 mg/kg. Imediatamente, após essa administração procedeu-se a observação dos seguintes parâmetros: latência para o aparecimento das convulsões e o percentual de convulsões. Os animais foram observados durante um período de 15 minutos para cada animal (ALMEIDA, 2006)

#### **4.3.2.2. Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)**

O teste das convulsões induzidas por eletrochoque ou eletrochoque máximo foi inicialmente descrito por Merritt e Putnam (1938). Esse protocolo baseia-se no fato que Drogas antiepilépticas eficazes no tratamento do “grande mal” epiléptico, tais como valproato, fenitoína e carbamazepina, bloqueiam as convulsões tônicas produzidas pelo eletrochoque auricular agudo (KITANO et al., 1996). Além disso, alguns estudos têm mostrado que esse modelo animal pode ser utilizado na triagem de drogas com atividade nas epilepsias do tipo “grande mal” (FISHER, 1989; LÖSCHER et al., 1991).

Nesse experimento foram utilizados grupos de oito camundongos machos. O grupo controle recebeu solução tween 80 a 5% (veículo). Os grupos experimentais foram pré-tratados com a EC nas doses de 200, 300 ou 400

mg/kg, e o grupo de animais padrão recebeu fenobarbital (FNB) na dose 25 mg/kg.

Decorridos 30 minutos das administrações, todos os animais foram submetidos a um choque auricular com corrente nominal de 0,5 mA de intensidade, numa frequência de 15 pulsos/segundo e uma duração de 0,5 segundo. O parâmetro avaliado foi o percentual de manifestação ou ausência de convulsões tônicas nos animais.

#### **4.4. Estudo do mecanismo da atividade anticonvulsivante**

##### **4.4.1. Avaliação temporal da atividade anticonvulsivante**

No estabelecimento da atividade anticonvulsivante da epóxi-carvona a nível temporal, grupos de oito camundongos machos foram pré-tratados com solução tween 80 a 5% (veículo). O grupo experimental foi pré-tratado com a EC na dose de 300 mg/kg. Um grupo considerado como padrão recebeu diazepam (DZP) na dose de 4 mg/kg..

Transcorridos 30, 60, 90, 120 e 240 minutos dos pré-tratamentos administraram-se em todos os animais, o PTZ na dose de 60 mg/kg.. Imediatamente, após essa administração procedeu-se a observação dos seguintes parâmetros: latência para o aparecimento das convulsões e o percentual de convulsões. Os animais foram observados durante um período de 15 minutos para cada animal.

##### **4.4.2. Teste das convulsões induzidas pela picrotoxina**

Para este experimento os animais foram divididos em grupos de oito camundongos machos. O grupo controle recebeu solução tween 80 a 5% (veículo). Os grupos experimentais foram pré-tratados com a EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg.

Um grupo recebeu DZP na dose 4 mg/kg como droga padrão. Após 30 minutos das administrações, todos os animais foram tratados com picrotoxina (PIC) na dose 8 mg/kg, e em seguida procedeu-se a observação dos seguintes parâmetros: latência para o aparecimento das convulsões e o percentual de animais que apresentaram convulsões durante um período de 20 minutos para cada animal.

#### **4.4.3. Avaliação da participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub>**

Grupos de oito camundongos machos foram pré-tratados com o flumazenil na dose de 20 mg/kg por via subcutânea (s.c.), que é um antagonista seletivo do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> (FILE et al. 1982; FILE; PELLOW, 1986), e após 15 minutos foram tratados com veículo, EC na dose de 300 mg/kg, ou diazepam (DZP) na dose de 5 mg/kg..

Transcorridos 30 minutos dos tratamentos administrou-se em todos os animais, o PTZ na dose de 60 mg/kg. Imediatamente, após essa administração procedeu-se a observação dos seguintes parâmetros: latência para o aparecimento das convulsões e o percentual de convulsões. Os animais foram observados durante um período de 15 minutos.

#### 4.4.4. Avaliação da atividade antioxidante

O método utilizado para a avaliação antioxidante da EC foi o teste da lipoperoxidação *in vitro* (STOCK et al., 1974; BARROS et al., 2006).

O teste para avaliação da lipoperoxidação *in vitro* representa um importante parâmetro para a caracterização preliminar da capacidade antioxidante de diferentes substâncias.

Foram utilizados cérebros de ratos previamente perfundidos com solução salina ou tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 para a eliminação de íons ferro contaminantes. Esses cérebros (em média, três para cada ensaio) foram centrifugados por 15 min a 3.000 rpm e 4°C e homogeneizados no tampão fosfato, e o sobrenadante, diluído a 1:3 com tampão fosfato, foi utilizado para os ensaios.

O princípio do método envolve a inibição da lipoperoxidação espontânea dos homogenatos de cérebro, quando incubados em condições controladas de temperatura. Foi utilizado o malondialdeído (MDA) como biomarcador para avaliar o processo de auto-oxidação da fração lipídica. O MDA, ao reagir com uma solução 6,7 mg/ml de ácido tiobarbitúrico (TBA), forma um composto colorido cuja absorbância é medida a 535 nm por espectrofotometria simples.

A capacidade antioxidante da EC foi calculada após a incubação por 1 h em banho-maria 37°C do sobrenadante (obtido do homogenato), dessa forma se obteve a concentração da substância que inibe 50% da peroxidação ( $Q_{1/2}$ ).

#### 4.4.5. Técnica de *Single sucrose gap*

Para essa metodologia foi utilizado nervo isquiático de ratos. Inicialmente, os animais foram sacrificados por tração cervical, retirando-se o tronco nervoso (isquiático). O nervo foi imerso em solução fisiológica, conhecida como Locke modificado que possui a seguinte composição (mM): NaCl: 150; KCl: 4; CaCl<sub>2</sub>: 2; MgCl<sub>2</sub>: 1 e HEPES (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina – N'-[2-etanosulfônico]): 5. O pH da solução foi ajustado para 7,3 com NaOH (0,1N). Após o isolamento do tronco foi feita a retirada da bainha de tecido conjuntivo que o envolve. Esse processo foi acompanhado usando-se um microscópio estereoscópico de modo que no final obtenha-se um conjunto de fibras desnudas. Em seguida, o tronco nervoso foi colocado em uma câmara de registros eletrofisiológicos (Figura 11).

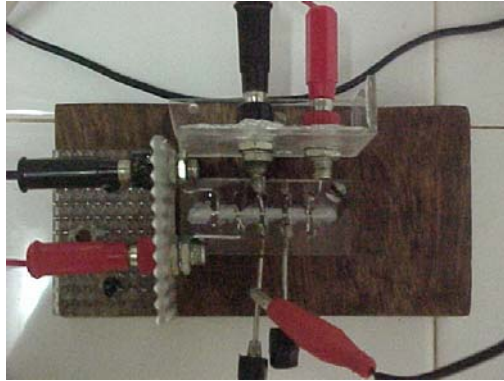
Essa câmara possui cinco compartimentos (poços) os quais foram recobertos por vaselina nas suas interseções. No quarto poço, houve um fluxo constante de solução de sacarose isotônica; o terceiro poço (teste) foi utilizado para incubar a EC em concentrações de 1 e 5 mM. Nos poços (1, 2, 3 e 5) foi preenchido com solução de Locke modificado. Ao primeiro e terceiro poços foram conectados a um estimulador do qual foram disparados estímulos elétricos supramáximos (4-6 V), com duração de 0,1 ms (Figura 12). Os registros foram adquiridos com uma frequência de aquisição de 11.000 Hz., utilizando uma placa Analógica/Digital (A/D) que converteu o sinal analógico para digital e era conectada aos poços três e cinco. Esta placa A/D por sua vez estava conectada a um microcomputador, no qual as leituras do potencial de ação composto (PAC) foram verificadas. Este registro serviu para avaliar o comportamento dos canais para Na<sup>+</sup> e para K<sup>+</sup> dependentes de voltagem, na presença ou não do monoterpeno ou da lidocaína, durante as fases do PAC (DE SOUSA et al., 2006a). Os registros controles (contendo apenas a solução fisiológica) foram gravados e após a troca da solução do poço teste pela solução com EC, foram gravados os registros do potencial de ação obtidos até 40 minutos. Todos os dados foram armazenados em disquetes para posterior análise.

Os parâmetros verificados foram: a amplitude, intervalo (em mV) entre a linha de base e o ponto máximo do PAC e a constante de tempo de

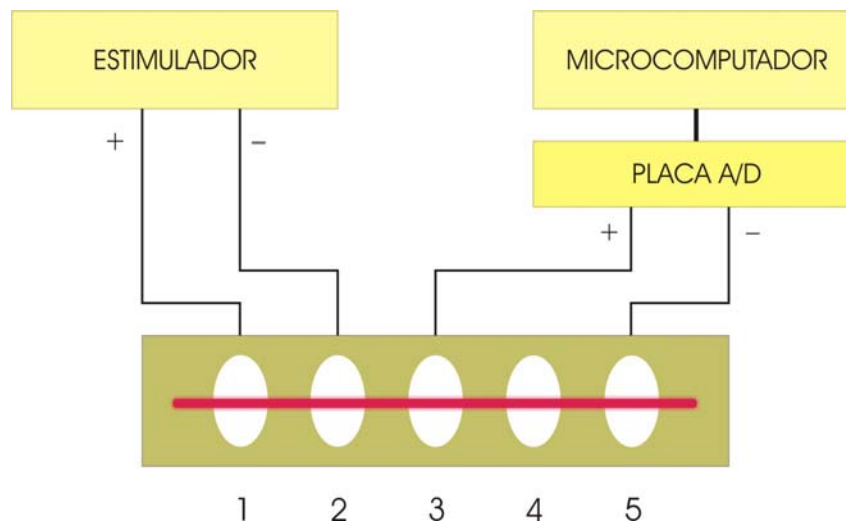


repolarização ( $\tau$ ), definida pela equação:  $V = V_0 \cdot \exp(-t / \tau)$ , onde  $V$ , diferença de potencial,  $V_0$  é o valor do potencial que cruza o eixo das ordenadas,  $t$  é tempo e  $\tau$  é o tau.

Para realizar o ajuste dos pontos experimentais foram utilizados os programas Sigmaplot, v 5.0 for DOS. O ajuste seguiu o método dos quadrados mínimos. Foram realizados quatro experimentos para cada concentração.



**Figura 11.** Câmara para montagem experimental para obtenção dos registros do Potencial de ação composto (PAC).



**Figura 12.** Esquema ilustrativo da montagem experimental para obtenção dos registros do PAC. Este esquema mostra a câmara de registros onde o nervo (barra vermelha) é colocado longitudinalmente sobre os cinco poços. Os poços 1 e 2 estão conectados ao estimulador, o poço teste é o 3 e no poço 4 flui continuamente uma solução isotônica de sacarose. Os poços 3 e 5 estão ligados ao sistema captador do PAC.

#### **4.5. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média e e.p.m. ou percentagem e analisados estatisticamente utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) com uma classificação (one-way), seguido do Teste de Dunnet e teste “t” de Student não pareado para medidas paramétricas, e o teste de Fisher para medidas não paramétricas, e foram considerados significantes quando apresentaram  $p < 0,05$ .

A Toxicidade Aguda ( $DL_{50}$ ) foi estabelecida através de uma regressão não linear de PROBIOS, e o Q1/2 foi calculado por regressão não-linear a partir das concentrações antioxidantes.

Todos os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

## Capítulo V

### *Resultados*

## **V. RESULTADOS**

### **1. Estudo da Toxicidade Aguda (DL<sub>50</sub>)**

Após a administração da epóxi-carvona em grupos de 10 camundongos foi observado que a dose de 500 mg/kg após 7 dias não provocou mortes nos animais tratados e que as doses de 750, 1000 ou 2000 mg/kg promoveram a morte de 1, 7 e 10 animais, respectivamente.

A dose letal 50 % (DL<sub>50</sub>) calculada com base nos resultados observados foi de 922,6 mg/kg com intervalo de confiança de 820 a 1037 mg/kg.

### **2. Avaliação geral da Atividade no Sistema Nervoso Central**

#### **2.1. Triagem Farmacológica Comportamental**

Os animais tratados com a epóxi-carvona (EC) nas doses de 200 ou 300 mg/kg apresentaram os seguintes efeitos: diminuição da ambulação, ptose palpebral, resposta diminuída ao toque, sedação e analgesia.

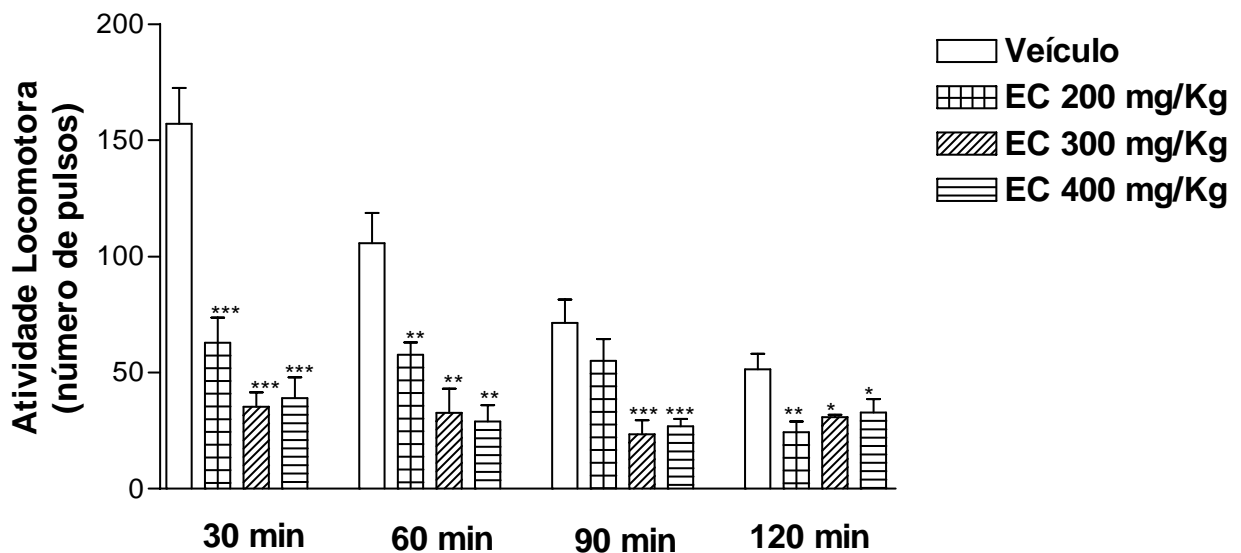
O quadro 3 mostra uma síntese das principais alterações comportamentais observadas nos animais após o tratamento com a EC.

**Quadro 3.** Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração da EC.

Dose (mg/kg)	Principais alterações comportamentais observadas				
	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
200	Diminuição da ambulação, ptose palpebral, resposta ao toque diminuída, sedação e analgesia.	Diminuição da ambulação, ptose palpebral, resposta ao toque diminuída e analgesia.	Não foram observados efeitos	Não foram observados efeitos	Não foram observados efeitos
300	Diminuição da ambulação, ptose palpebral, resposta ao toque diminuída, sedação e analgesia.	Diminuição da ambulação, ptose palpebral, resposta ao toque diminuída e analgesia.	Não foram observados efeitos	Não foram observados efeitos	Não foram observados efeitos

## 2.2. Teste da Movimentação Espontânea

Nas dose de 200, 300 ou 400 mg/kg a EC causou uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da ambulação dos animais com 30, 60, 90 e 120 minutos após sua administração (Figura 13).

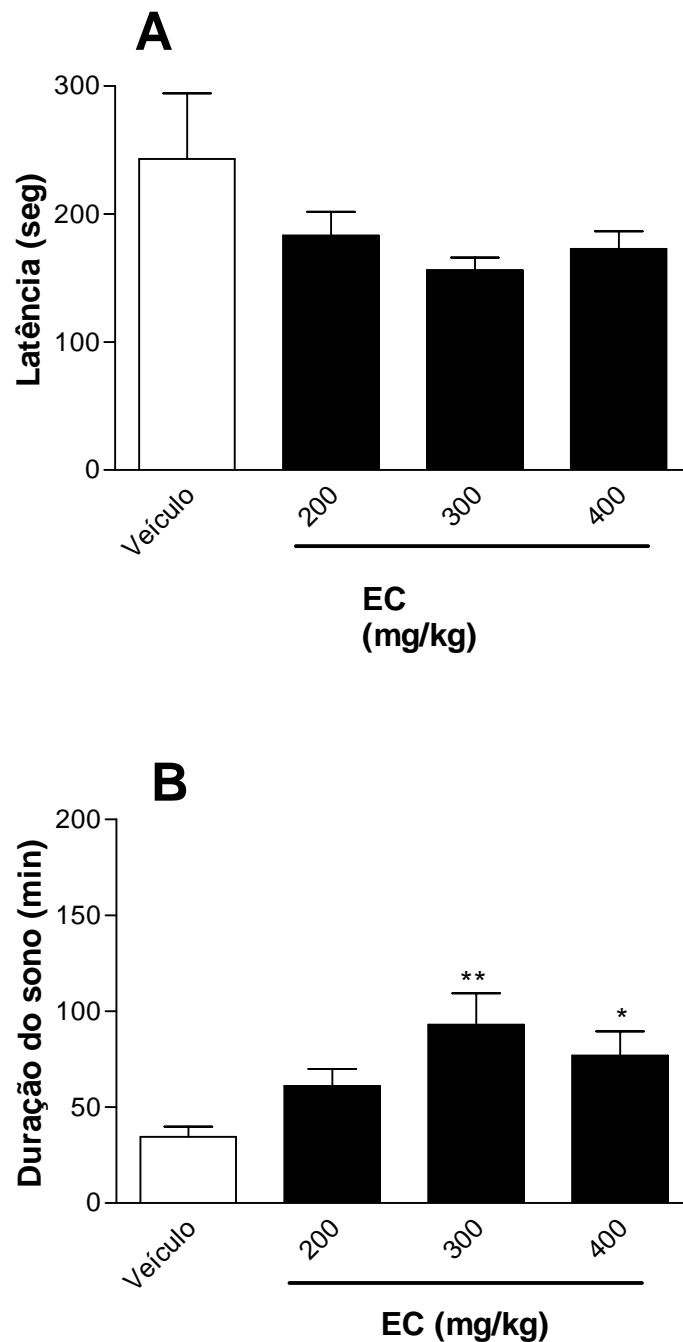


**Figura 13.** Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre a atividade locomotora em camundongos. Os parâmetros avaliados foram o número total de pulsos medidos pela caixa de atividade. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de oito camundongos por grupo. ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Dunnett, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o veículo (controle).

### **2.3. Teste da potencialização do sono induzido por pentobarbital**

A figura 14A mostra que a epóxi-carvona (EC) nas doses de 200 ( $183,3 \pm 18,7$  seg), 300 ( $156,3 \pm 9,8$  seg) ou 400 mg/kg ( $172,8 \pm 14,0$  seg) não afetou a latência da hipnose induzida pelo pentobarbital ( $243,1 \pm 51,3$  seg).

EC na dose de 200mg/kg não promoveu alteração no tempo de sono ( $61 \pm 8,9$  min), mas causou aumento nas doses de 300 ( $61,1 \pm 8,9$  min;  $p < 0,01$ ) ou 400 mg/kg ( $76,9 \pm 12,7$  min;  $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle ( $34,5 \pm 5,4$  min) tratado com o veículo (figura 14B).

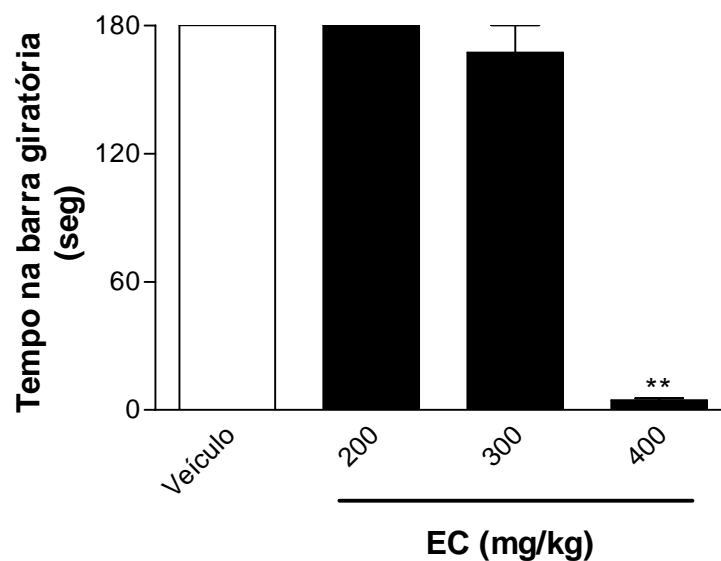


**Figura 14.** Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre a hipnose induzida pelo pentobarbital em camundongos. Os parâmetros avaliados foram a latência para o início do sono induzido (A) e duração do sono (B). Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de oito camundongos por grupo. ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Dunnett, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado com o veículo (controle).



#### 2.4. Avaliação da coordenação motora (teste do Rotarod)

Neste teste, após 30 minutos do tratamento com a epóxi-carvona, apenas a dose de 400 mg/kg. causou uma redução significativa no tempo de permanência dos animais na barra giratória, reduzindo de  $180,0 \pm 0,0$  (controle) para  $4,5 \pm 0,9$  segundos ( $p < 0,01$ ) (Figura 15). Já as doses de 200 ( $180,0 \pm 0,0$  seg) ou 300 mg/kg ( $167,3 \pm 12,7$  seg) não promoveram alterações significantes no tempo de permanência.



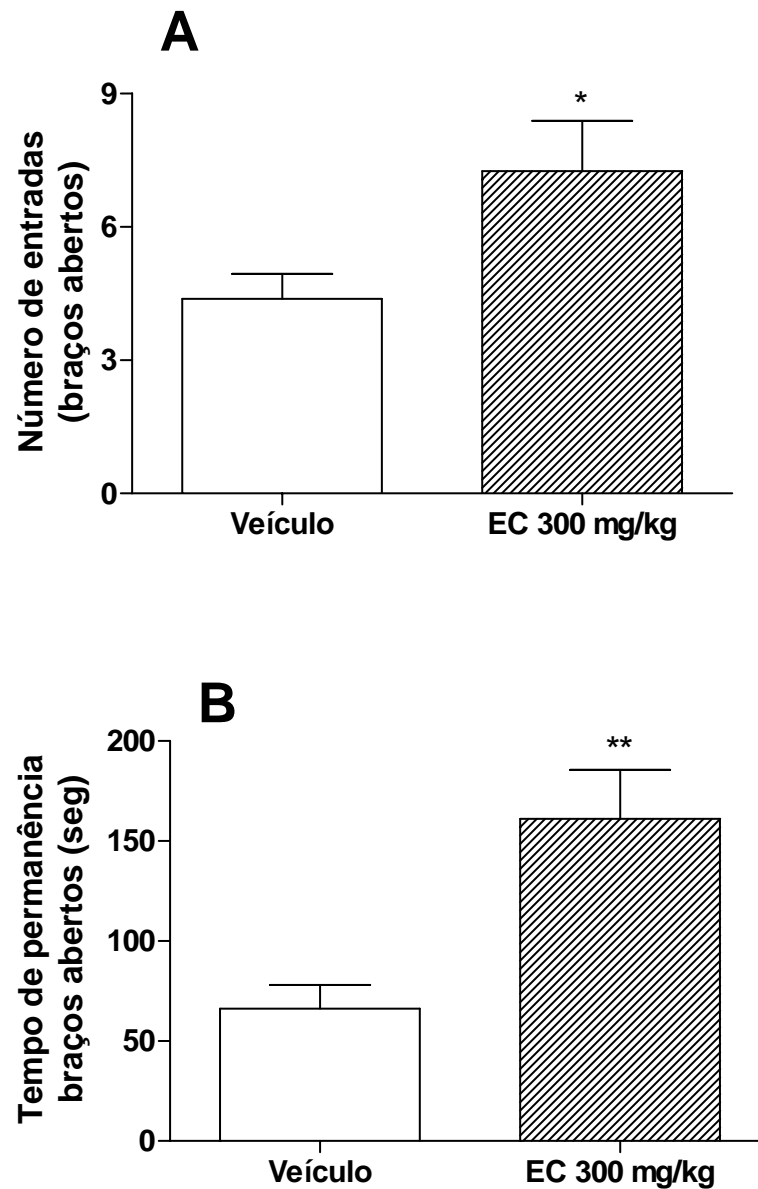
**Figura 15.** Efeito da epóxi-carvona (EC) sobre a coordenação motora de camundongos no teste do Rotarod. Os valores são o tempo total de permanência dos animais na barra giratória mensurados após a administração. ANOVA “one-way” seguido pelo teste de Dunnett, \*\* $p < 0,01$  comparado com o veículo (controle).

### **3. Avaliação específica da atividade no Sistema Nervoso Central**

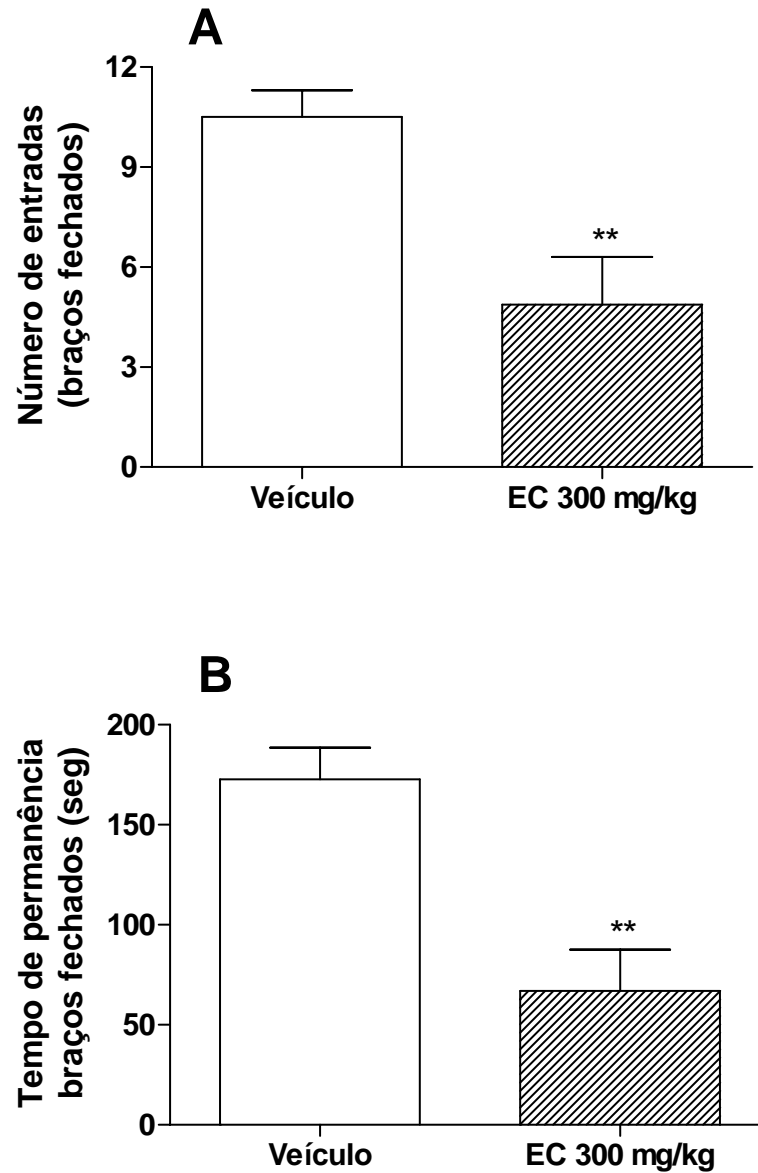
#### **3.1 Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa**

##### **3.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado**

Os animais tratados com a epóxi-carvona na dose de 300 mg/kg apresentaram aumento no número de entradas ( $7,2 \pm 1,1$ ) e tempo total de permanência ( $161,1 \pm 24,5$  seg) nos braços abertos quando comparados com o grupo controle ( $4,3 \pm 0,6$ ;  $66,2 \pm 11,8$  seg, respectivamente)(Figura 16). Além de promover uma redução no número de entradas ( $4,9 \pm 1,4$ ) e tempo total de permanência ( $66,9 \pm 20,7$ ) nos braços fechados quando comparado com o grupo controle tratado com o veículo ( $10,5 \pm 0,8$ ;  $172,8 \pm 15,9$  seg, respectivamente) (Figura 17).



**Figura 16.** Efeito da epóxi-carvona (EC) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos. Os parâmetros avaliados foram o número de entradas (A) e tempo total de permanência (B) nos braços abertos. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de oito camundongos por grupo. Teste "t" de Student, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado com o veículo (controle).



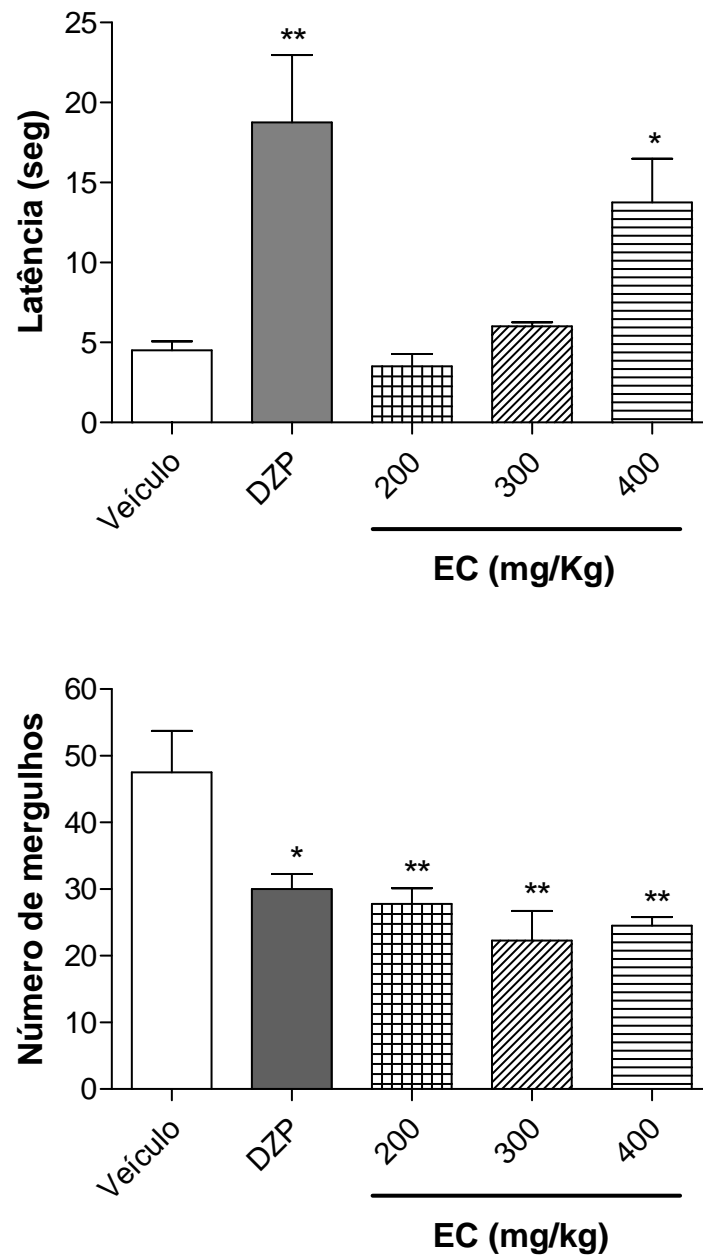
**Figura 17.** Efeito da epóxi-carvona (EC) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos. Os parâmetros avaliados foram o número de entradas (A) e tempo total de permanência (B) nos braços fechados. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de oito camundongos por grupo. Teste "t" de Student, \*\* $p < 0,01$  comparado com o veículo (controle).

### **3.1.1.2. Teste da placa perfurada (“Hole-board”)**

Neste modelo animal, os animais tratados com a epóxi-carvona, (EC) apenas na dose de 400 mg/kg apresentaram um aumento significativo na latência para o início dos mergulhos ( $13,8 \pm 2,7$  seg) quando comparados com os do grupo controle ( $4,5 \pm 0,6$  seg)(Figura 18A).

EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg promoveram uma redução de maneira significativa no número de mergulhos ( $27,8 \pm 2,4$ ;  $22,2 \pm 4,5$  e  $24,5 \pm 1,3$ , respectivamente) quando comparados aos do grupo controle tratado com o veículo ( $47,5 \pm 6,2$ )(Figura18B).

A droga padrão diazepam (1 mg/kg) também foi capaz de aumentar a latência ( $18,8 \pm 4,2$  seg) e reduzir o número de mergulhos ( $30,0 \pm 2,3$ )(Figuras 18A e 18B).

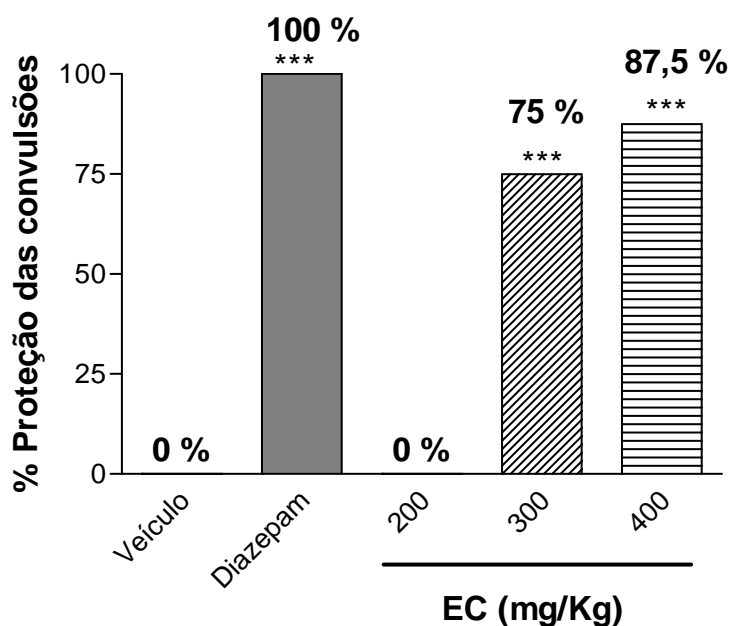


**Figura 18.** Efeito da epóxi-carvona (EC) no teste da placa perfurada em camundongos. Os parâmetros avaliados foram a latência para o primeiro mergulho (A) e o número total de mergulhos (B). Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de oito camundongos por grupo. ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Dunnett, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado com o veículo (controle). DZP (diazepam)

### 3.2. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

#### 3.2.1. Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)

A Epóxi-carvona (EC) nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg promoveram a proteção de 0 %, 75 % e 87,5 %, respectivamente, das convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ, quando comparadas com as do grupo controle. Por outro lado, o grupo tratado com droga padrão o diazepam na dose de 4 mg/kg apresentou 100 % proteção (Figura 19).

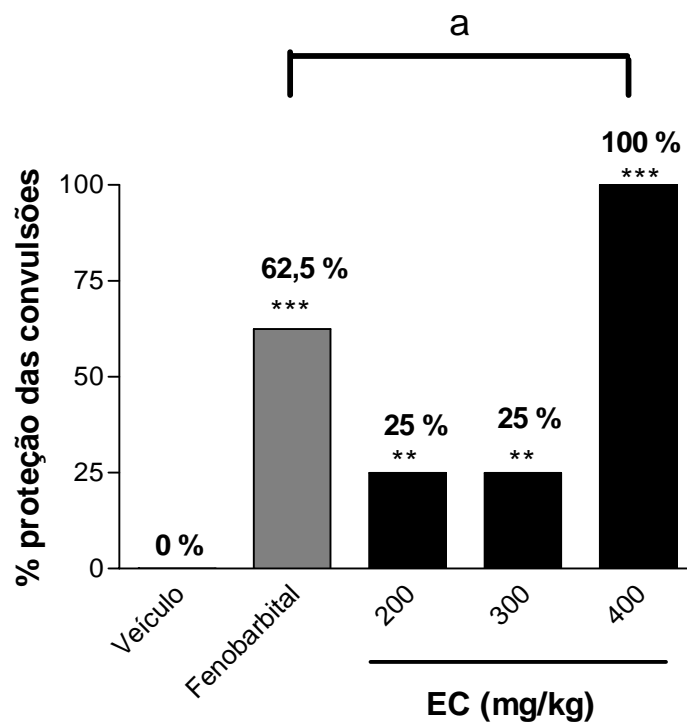


**Figura 19.** Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em camundongos. Valores estão expressos como a porcentagem de proteção contra as convulsões. Os valores são o percentual de oito camundongos por grupo. Teste exato de Fisher, \*\*\* $p < 0,001$ , comparado com o veículo (controle).

### 3.2.2.2. Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)

EC foi eficaz em prevenir as convulsões tônicas induzidas pelo eletrochoque auricular nas doses de 200 (25 %), 300 (25 %) ou 400 mg/kg (95,5 % de proteção)(Figura 20).

A droga referência, o fenobarbital na dose de 25 mg/kg promoveu proteção significativa de 62,5 %, sendo, portanto menos eficaz que a EC na dose de 400 mg/kg em prevenir convulsões tônicas nesse teste.



**Figura 20.** Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo em camundongos. Valores estão expressos como a porcentagem de proteção contra as convulsões. Os valores são o percentual de oito camundongos por grupo. Teste exato de Fisher, \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , comparado com o veículo (controle); <sup>a</sup> $p < 0,001$  (fenobarbital vs EC).

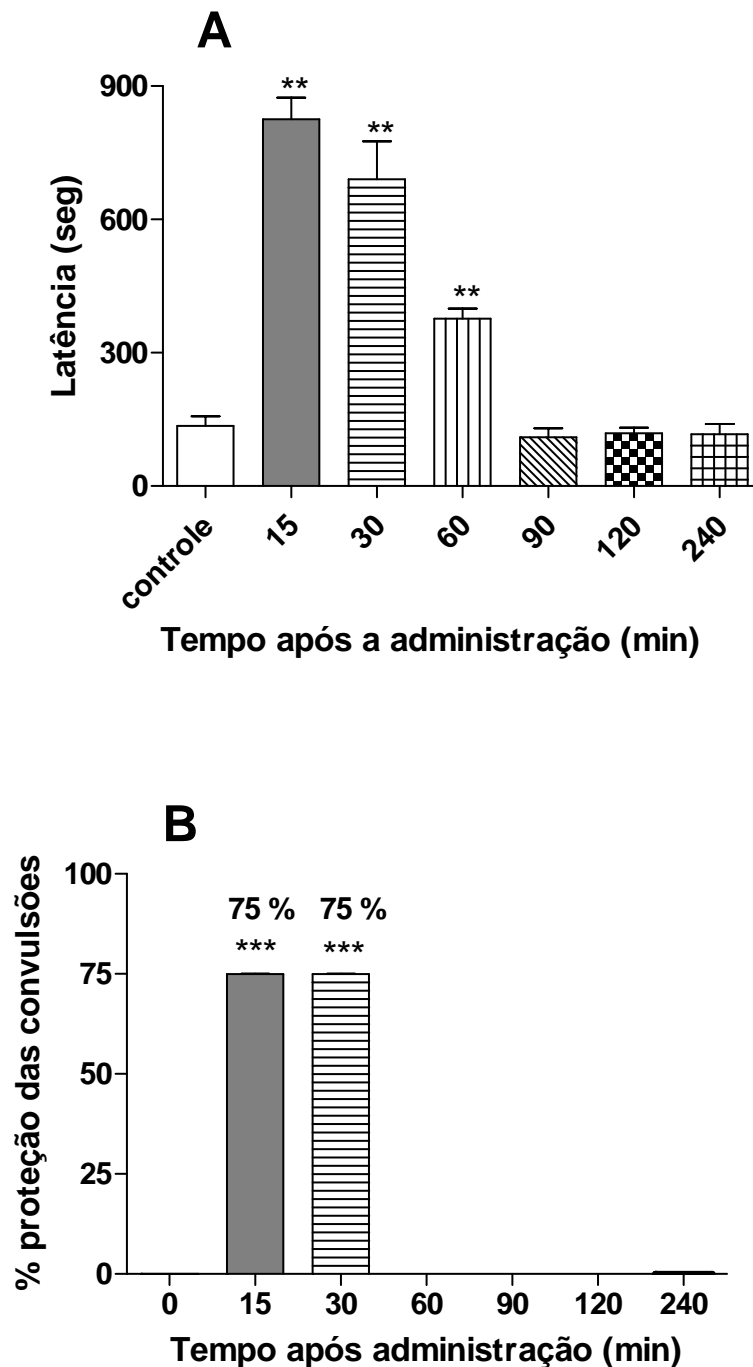


## **4. Estudo do mecanismo da atividade anticonvulsivante**

### **4.1. Avaliação temporal da atividade anticonvulsivante**

A epóxi-carvona na dose de 300 mg/kg foi capaz de promover um aumento na latência para o desenvolvimento das convulsões após 15 ( $825,0 \pm 49,0$  seg), 30 ( $690,0 \pm 85,6$  seg) e 60 minutos ( $376,5 \pm 22,6$  seg) da sua administração (Figura 21A).

A figura 21B mostra que a EC promoveu proteção significativa contra as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ nos tempos de 15 (75 %) e 30 minutos (75 % proteção) após sua administração.

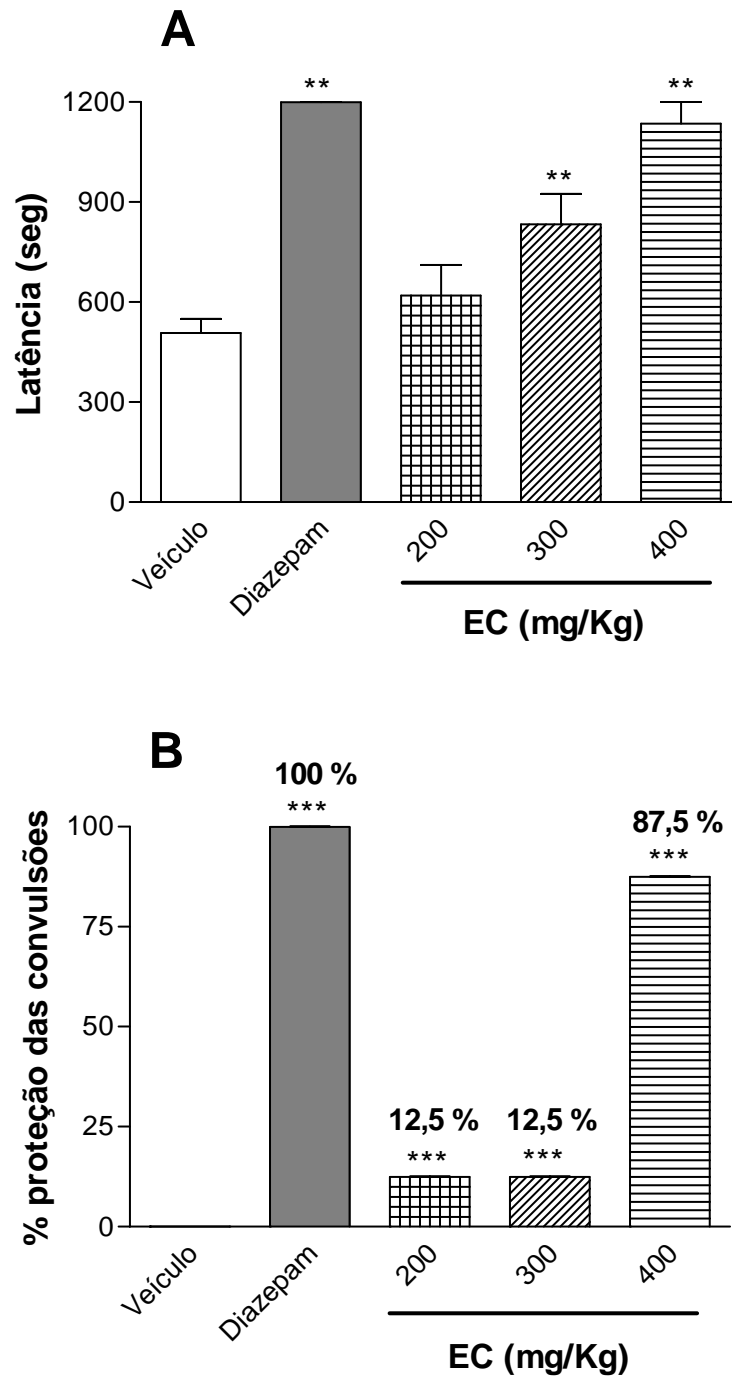


**Figura 21.** Efeito temporal da epóxi-carvona na dose de 300 mg/kg nas as convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em camundongos. Os parâmetros avaliados foram a latência para o início das convulsões (A) e percentual de proteção contra as convulsões (B). Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. (A) e percentual (B) de oito camundongos por grupo. ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett, \*\* $p < 0,01$  e Teste exato de Fisher, \*\*\* $p < 0,01$ , comparado com o controle.

#### **4.2. Teste das convulsões induzidas pela picrotoxina**

A epóxi-carvona foi capaz de promover um aumento na latência para o desenvolvimento das convulsões nas doses de 300 ( $833,6 \pm 91,2$  seg) ou 400 mg/kg ( $1136,0 \pm 64,2$  seg) comparando-se com o grupo controle tratado com o veículo ( $507,1 \pm 42,7$ )(Figura 22A).

A figura 22B mostra que a EC promoveu proteção significativa contra as convulsões nas doses de 200 (12,5 %), 300 (12,5 %) ou 400 mg/kg (87,5 % proteção) tomando como referência o diazepam na dose de 4 mg/kg (100 % proteção).

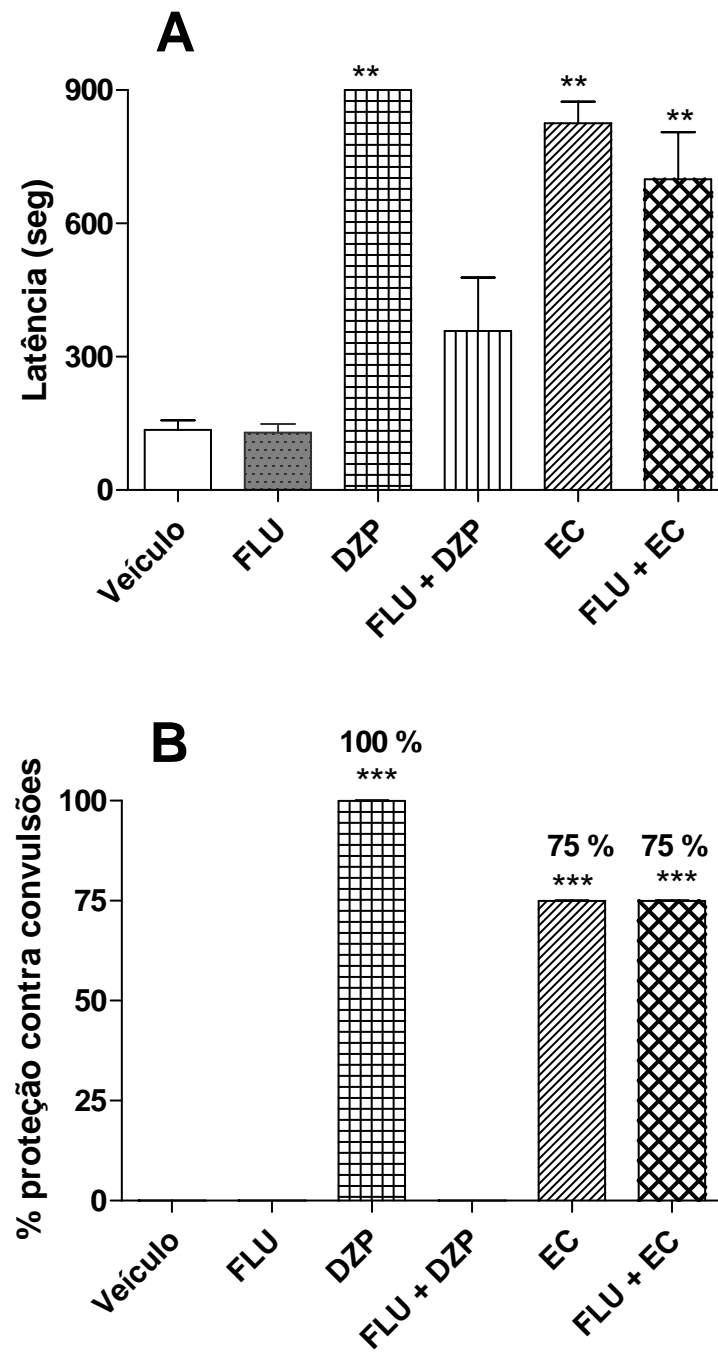


**Figura 22.** Efeito da epóxi-carvona sobre as convulsões induzidas quimicamente pelo picrotoxina em camundongos. Os parâmetros avaliados foram a latência para o início das convulsões (A) e percentual de proteção contra as convulsões (B). Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. (A) e percentual (B) de oito camundongos por grupo. ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Dunnett, \*\* $p < 0,01$  e Teste exato de Fisher, \*\*\* $p < 0,01$ , comparado com o veículo (controle).

### **4.3. Avaliação da participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub>**

A epóxi-carvona na dose de 300 mg/kg foi capaz de aumentar a latência para o início das convulsões ( $825,0 \pm 49,0$  seg) e promoveu uma proteção significativa no desenvolvimento das convulsões (75 %).

A presença do flumazenil, um antagonista seletivo do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> (FILE et al., 1982; FILE; PELLOW; 1986) foi capaz de reverter o efeito promovido pelo diazepam, tanto em relação à latência (Figura 23A) como em relação á proteção contra as convulsões (Figura 23B), o que não foi observado no grupo tratado com a EC, onde o antagonista não foi capaz de reverter o aumento da latência e nem a percentagem de proteção contra as convulsões (Figuras 23A e 23B).

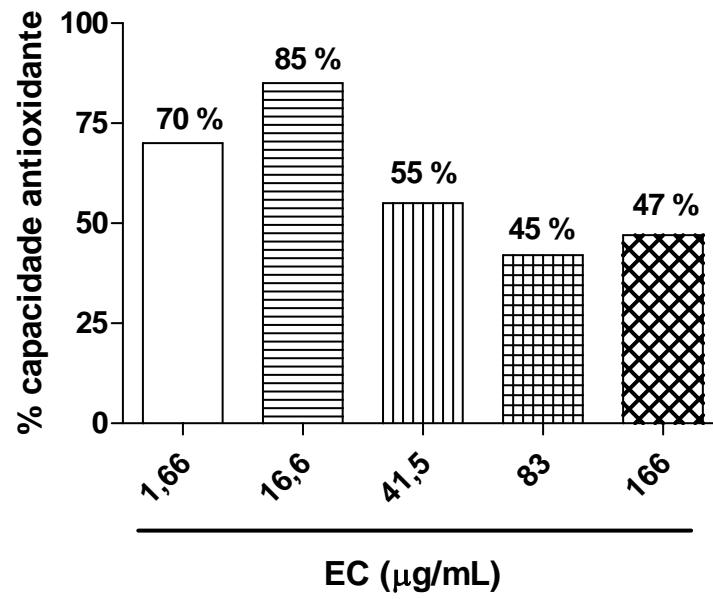


**Figura 23.** Efeito da epóxi-carvona (300 mg/kg) nas convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em camundongos. Os parâmetros avaliados foram a latência para o início das convulsões (A) e percentual de proteção contra as convulsões (B). Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. (A) e percentual (B) de oito camundongos por grupo. ANOVA "one-way" seguido pelo teste de Dunnett,  $**p < 0,01$  e Teste exato de Fisher,  $***p < 0,01$ , comparado com o veículo (controle). FLU (flumazenil), DZP (diazepam) e EC (epóxi-carvona).

#### 4.4. Avaliação da atividade antioxidante

A epóxi-carvona reduziu os níveis de lipoperoxidação *in vitro* avaliados pela quantificação de MDA (malonodialdeído). As diferentes concentrações testadas mostraram um efeito de inibição da oxidação em homogenato de cérebro de rato sendo o  $Q_{1/2}$  (concentração que inibe 50% da lipoperoxidação) equivalente a 50  $\mu\text{g/mL}$  de incubado (Figura 24).

As doses testadas foram de 1,66; 16,6; 41,5; 83 ou 166  $\mu\text{g/mL}$  com inibições de lipoperoxidação de 70, 85, 55, 45 e 47 %, respectivamente.



**Figura 24.** Efeito antioxidante da EC na inibição da oxidação em homogenato de cérebro de rato avaliados pela quantificação de MDA (malonaldeído).

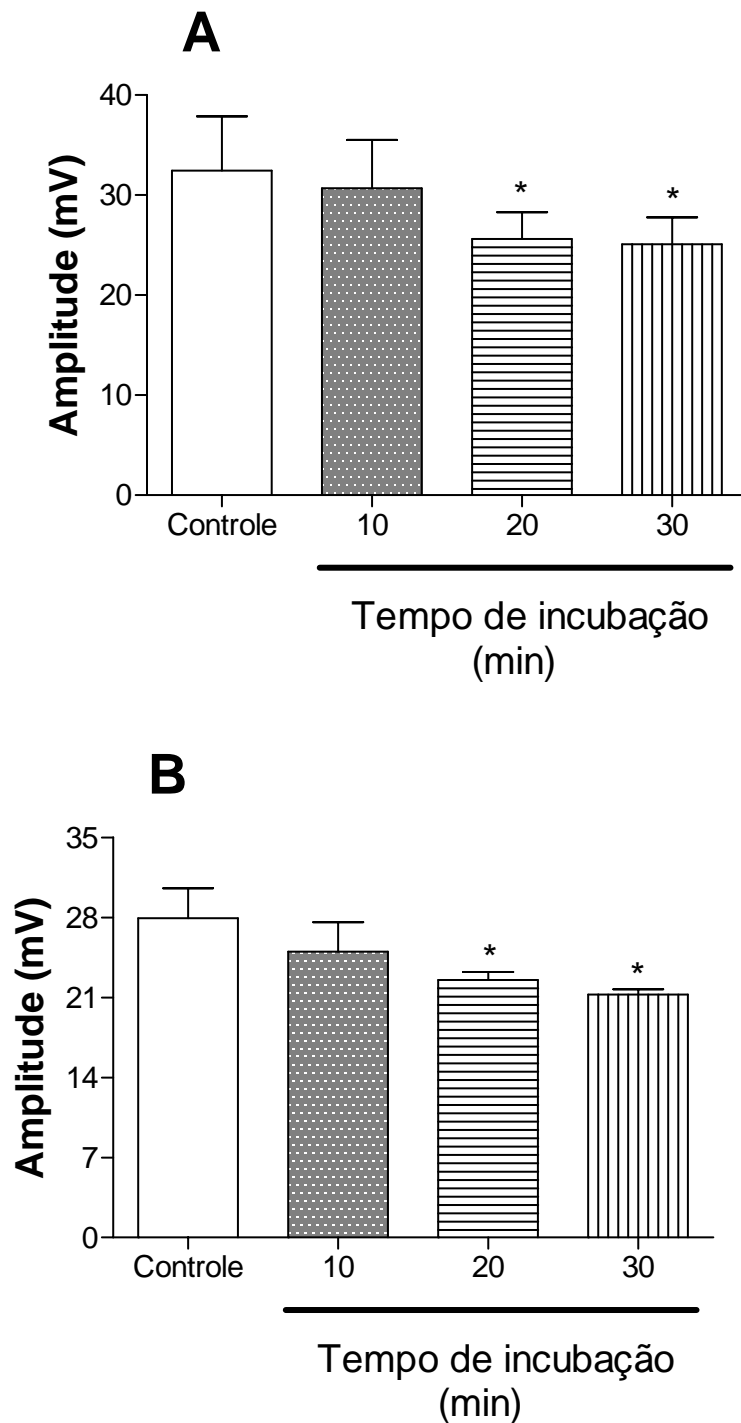


#### 4.5. Técnica de *Single sucrose gap*

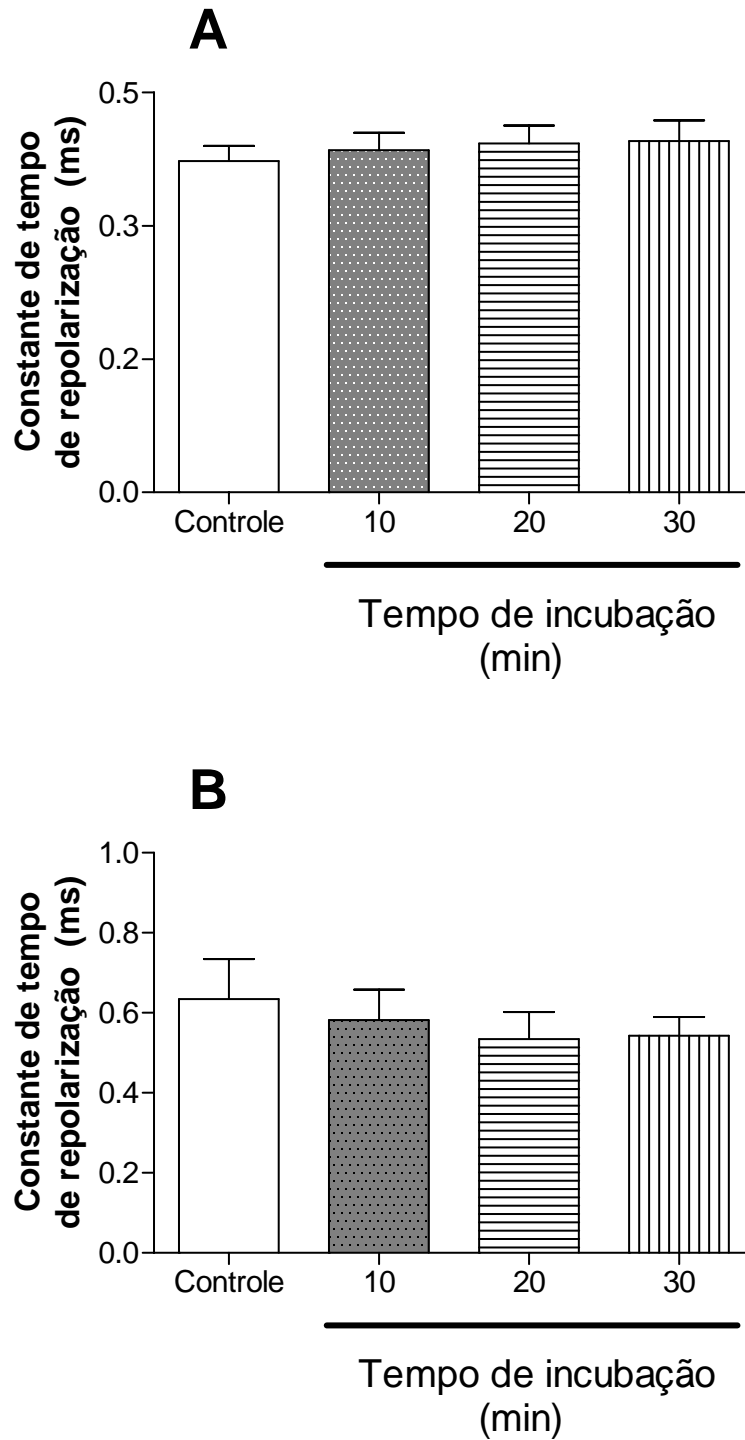
A amplitude do potencial de ação composto (PAC) foi reduzida de maneira significativa após 20 e 30 minutos da incubação de EC na concentração de 1 mM. O nível do PAC passou de  $32,4 \pm 5,4$  mV (controle) para  $29,9 \pm 4,8$  mV (20 min) e  $28,5 \pm 4,3$  mV (30 min) após a incubação com a EC (Figura 25A). Entretanto a concentração de 5 mM de EC não foi capaz de promover uma redução significativa da amplitude do PAC em nenhum dos tempos testados (10, 20 e 30 min) (Figura 25B).

Nas concentrações (1 ou 5 mM) e tempos (10, 20 e 30 min) testados a EC não promoveu alterações significantes na constante de tempo de repolarização do PAC (Figuras 26A e 26B).

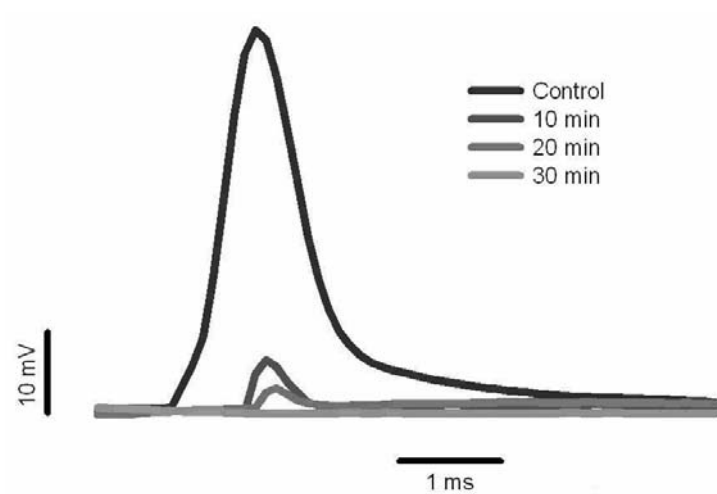
A lidocaína, um anestésico local, foi utilizado como a droga padrão da redução do potencial de ação e foi capaz de reduzir de maneira significativa a amplitude do PAC após 10, 20 e 30 minutos nas concentrações de 1 ou 5 mM (Figuras 27 e 28), mas também não promoveu alterações significantes na constante de tempo de repolarização do PAC (Figura 29).



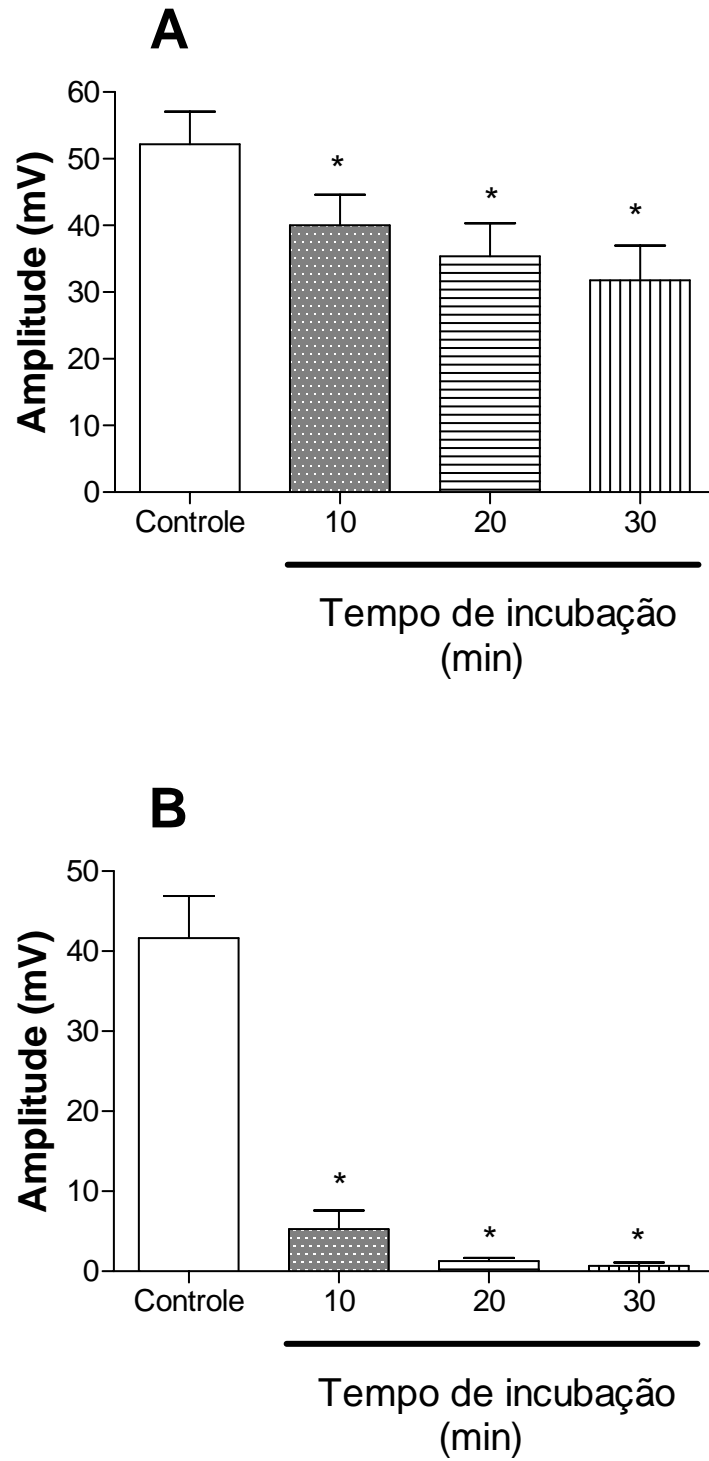
**Figura 25.** Efeito da epóxi-carvona (EC) na amplitude do PAC em função da incubação de 1 mM (A) ou 5 mM (B) de EC. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos. Teste “t” de Student pareado, \* $p < 0,05$  comparado com controle.



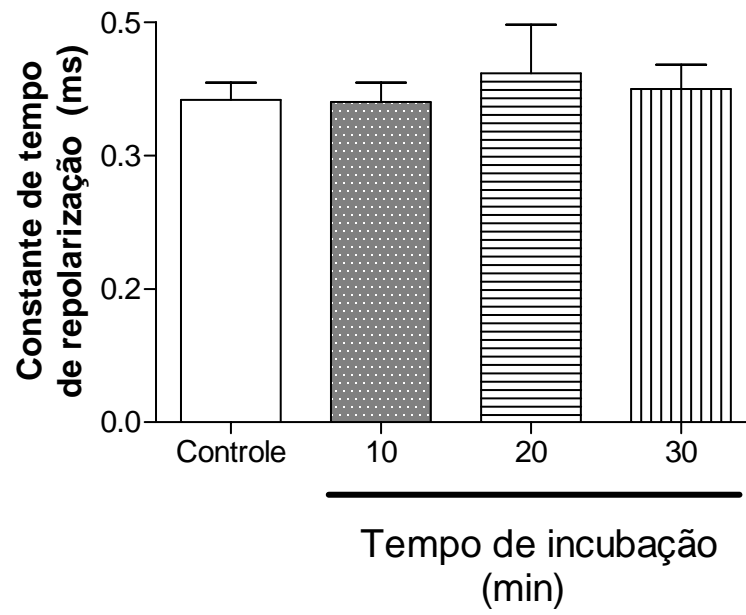
**Figura 26.** Efeito da epóxi-carvona (EC) na constante de tempo de repolarização do PAC em função da incubação de 1 mM (A) ou 5 mM (B) de EC. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos.



**Figura 27.** Efeito da lidocaína (5 mM) no registro do PAC. A figura mostra registro representativo de quatro experimentos realizados.



**Figura 28.** Efeito da lidocaína na amplitude do PAC em função da incubação de 1 mM (A) ou 5 mM (B) de lidocaína. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos. Teste "t" de Student pareado, \* $p < 0,05$  comparado com controle.



**Figura 29.** Efeito da lidocaína (1 mM) na constante de tempo de repolarização do PAC em função da incubação de lidocaína. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos.

## Capítulo VI

### *Discussão*

## VI. DISCUSSÃO

Os estudos com a EC compreenderam inicialmente a determinação da DL<sub>50</sub>, e então foram iniciados os estudos psicofarmacológicos pela triagem farmacológica preliminar, para traçar o perfil da ação da substância em nível do SNC, e depois partiu-se para testes gerais e específicos no tocante à avaliação da atividade ansiolítica, sedativa e anticonvulsivante.

A determinação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) da EC teve o objetivo de avaliar os seus possíveis efeitos tóxicos, e determinação das doses seguras que poderiam ser utilizadas nos ensaios com os animais, evitando assim que doses tóxicas pudessem ser administradas e os efeitos observados não fossem fidedignos com a real ação psicofarmacológica da substância em estudo.

A DL<sub>50</sub> da EC, obtida de acordo com o método descrito por Lorke (1983), foi de 922,6 mg/kg o que representa uma baixa toxicidade semelhante ao que foi observado em outros estudos onde foi demonstrada a baixa toxicidade de alguns monoterpenos, tais como o limoneno, borneol, beta-pineno, linalol, hidroxidihidrocarvona e safranal (UMEZU et al., 2001; FARHAT et al., 2001; DE SOUSA et al., 2006b; VIANA et al., 2007). Corroborando com esta afirmação é o fato da EC não ter induzido nos animais contorções abdominais, tremores, convulsões, comportamentos estereotipados e catalepsia, mas promoveu ataxia que foi revertida, sugerindo que o efeito da EC não é resultado de um efeito tóxico.

Baseado nos resultados da toxicidade aguda, foi estabelecido que a triagem farmacológica preliminar fosse realizada com as doses de 200 ou 300 mg/kg pela via i.p., doses seguras e que representariam o real efeito psicofarmacológico da EC e não como resultado de um efeito tóxico.

Nas doses testadas, observou-se que os camundongos tratados com a EC tiveram alterações comportamentais semelhantes às apresentadas por animais tratados com drogas que diminuem a atividade do SNC, tais como: diminuição da ambulação (FERNÁNDEZ-GUASTI et al., 2001; ARGAL; PATHAK, 2006), ptose palpebral (MORAIS et al., 2004), resposta ao toque diminuída (ALMEIDA et al., 1999), sedação (MARTÍNEZ et al., 2006) e analgesia (Quadro 3 p. 76).



Há alguns parâmetros verificados na triagem farmacológica preliminar que sugerem que a droga testada apresente perfil de droga psicoléptica (ALMEIDA, 2006), tais como a diminuição da ambulação dos animais, ptose palpebral (fechamento das pálpebras), demora da reação do animal frente a estímulos sonoros (resposta diminuída ao toque), sonolência, relaxamento, e diminuição da atividade motora, sem perda da consciência (sedação), e todos esses sinais foram observados nos animais tratados com a EC, o que nos indica que o monoterpene apresenta um perfil de droga que reduz a atividade do SNC.

Esses resultados obtidos na triagem farmacológica preliminar são semelhantes ao observado em outros estudos utilizando monoterpenos, tais como a hidroxidiidrocarvona e o citronelol (DE SOUSA 2006a; DE SOUSA 2006b; OLIVEIRA, 2006).

A triagem farmacológica preliminar é uma metodologia simples, mas que possibilita a detecção de efeito central apresentado pela substância analisada, então foram realizados outros testes gerais para melhor caracterização do perfil psicofarmacológico da EC. Escolhemos três testes gerais com este intuito: o teste da movimentação espontânea, o teste da potencialização do sono induzido pelo pentobarbital e o teste do rotarod.

O teste da movimentação espontânea é utilizado para verificar o efeito da droga na atividade locomotora dos animais e nos permite verificar se há interferência na atividade motora. Neste teste observou-se que a EC nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg causou uma redução de maneira significativa na ambulação dos animais nos quatro tempos de observação (30, 60, 90 ou 120 min) (Figura 13, p. 77), o que contribui para o indício de que a EC trata-se de uma droga redutora da atividade do SNC, já que é bem descrito que drogas estimulantes aumentam a atividade motora dos animais e as drogas depressoras diminuem essa atividade (CARLINI, 1973; MATTEI, CARLINI, 1995; FERNÁNDEZ-GUASTI et al., 2001; ARGAL; PATHAK, 2006; SÁNCHEZ-MATEO et al, 2007).

Neste mesmo teste observamos que a atividade locomotora dos animais do grupo controle foi reduzida de maneira dependente do tempo (tempo-dependente)(Figura 13, p. 77), o que pode ser explicado pelo fato dos animais apresentarem um aumento na atividade motora quando são colocados

num ambiente novo, sendo essa característica um comportamento importante dos roedores, e após o reconhecimento do ambiente, ele deixa de ser “novo” e há uma habituação, assim há uma menor exploração e conseqüente redução da atividade motora (CARLINI; BURGOS, 1979).

Em seguida, prosseguindo com os testes gerais, realizamos o teste da potencialização do tempo de sono induzido pelo pentobarbital com o objetivo de avaliar se a EC tem ação neuro-sedativa, ou ainda se possui perfil de droga hipnótica (SANTOS et al., 1996), já que é bem estabelecido que a potencialização do tempo de sono dos animais é devido a uma ação sedativa-hipnótica atribuída ao envolvimento de mecanismo centrais na regulação do sono e modulação do sistema GABAérgico (N'GOUEMO et al., 1994; STEINBACH; AKK, 2001; SIVAM et al., 2004; AGUIRRE-HERNÁNDEZ et al., 2007; SARKER et al., 2007).

É importante mencionar que teste da potencialização do sono induzido pelo pentobarbital não é um teste específico, uma vez que drogas desprovidas de ação central, como por exemplo, àquelas que diminuem a captação de oxigênio pelos tecidos ou mesmo às que produzem vasodilatação ou vasoconstricção, potencializam o tempo de sono por interferirem na biotransformação do pentobarbital no complexo do citocromo P450 e assim podem apresentar as mesmas ações de drogas depressoras do SNC. (GOLOUBKOVA et al., 1998; GYAMFI et al., 2000).

Neste teste observou-se que a EC (300 ou 400 mg/kg) foi capaz de promover a potencialização do tempo de sono dos animais, ou seja, aumentou o tempo de sono induzido pelo barbitúrico (Figura 14, p. 79). Já é bem descrito que drogas de ação central, como por exemplo, o diazepam, são capazes de promover o aumento na duração do tempo de sono nos animais (WILLIANSOON et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2007), e sendo assim, pode-se inferir que o efeito da EC é devido a uma ação depressora central, e não por interferir na biotransformação do barbitúrico, baseado também no fato do monoterpeno ter promovido efeitos centrais na triagem farmacológica preliminar e no teste da movimentação espontânea.

O último teste geral escolhido foi o teste do rotarod, que é uma metodologia utilizada na triagem de drogas com possível atividade mio-relaxante e consiste em avaliar a coordenação motora do animais, através do

tempo total de permanência destes em uma barra giratória (CAPASSO, 1996; REIS, 2000). A falta de coordenação motora no teste do rotarod é uma característica de droga que diminuem a atividade do SNC, tais como neurolépticos, ansiolíticos, sedativos e hipnóticos (SEM; CHAUDHURI, 1992).

Os animais tratados com a EC (200 ou 300 mg/kg) não apresentaram nenhuma alteração significativa no tempo de permanência na barra giratória (Figura 15, p. 80). Apenas na dose de 400 mg/kg os animais apresentaram uma redução significativa no tempo de permanência, o que pode ser atribuído a uma possível ação relaxante muscular da EC nesta dose.

Ressalta-se, no entanto, que o teste do rotarod é um método que não é específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade, o que pode indicar que o tratamento com a EC (200 ou 300 mg/kg) não interfere na coordenação motora, descartando assim um efeito relaxante muscular ou mesmo uma neurotoxicidade do monoterpeno, que é comum a algumas drogas com perfil depressor do SNC (ALMEIDA, 2006).

A partir de todos os resultados apresentados até esta etapa (triagem farmacológica preliminar e testes psicofarmacológicos gerais) há uma forte indicação que a EC apresente efeitos farmacológicos no SNC. Desta forma, houve um direcionamento para uma avaliação específica da atividade da EC que pudesse nos levar a elucidar a qual classe de droga psicotrópica ela pertence.

Drogas que reduzem a atividade do SNC são do grupo dos psicolépticos e dentre eles podemos citar algumas classes como os ansiolíticos, sedativos e anticonvulsivantes. Seguiu-se então para testes específicos para avaliar a qual dessas classes a EC pertenceria, e iniciou-se com a avaliação da atividade ansiolítica e sedativa por meio de dois modelos animais: o teste do labirinto em cruz elevado e o teste da placa perfurada.

A maioria dos modelos experimentais que utilizam animais de laboratório para avaliar a ansiedade baseia-se, principalmente, em situações conflitantes, como por exemplo, colocar o animal num ambiente estranho (“estressante”) ou frente a um predador, gerando assim, algumas alterações comportamentais, acompanhadas de desvios fisiológicos. Assim o que se

reproduz nos animais é um estado semelhante à ansiedade no homem, medida através de sinais exteriores, como a atividade exploratória, locomotora e social, que podem ser avaliados por meio de alguns testes (LEITE; SIQUEIRA, 2006).

O teste do labirinto em cruz elevado é considerado um modelo etiologicamente válido para a ansiedade, por que utiliza um estímulo natural (medo dos espaços abertos e da altura) que pode induzir ansiedade em humanos (DAWSON; TRICKLEBANK, 1995), e é um dos métodos mais extensivamente validados para a triagem de drogas com efeito ansiolítico (ZANOLI et al, 2007). É utilizado para investigar os efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos das substâncias, uma vez que ansiolíticos levam o animal a aumentar o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, e as substâncias ansiogênicas induzem um aumento dos referidos parâmetros nos braços fechados (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985; GRUNDMANN et al., 2007).

Neste teste observou-se que os animais tratados com a EC na dose de 300 mg/kg apresentaram modificações comportamentais indicativas de efeito ansiolítico, ou seja, aumento no número de entradas e tempo total de permanência dos animais nos braços abertos, além de uma redução no número de entradas e tempo total de permanência nos braços fechados (Figura 16, p. 82 e figura 17, p. 83) (MORA et al., 2005; THAKUR; MENGI, 2005; GRUNDMANN et al., 2007; BOTELHO et al., 2007).

O segundo teste utilizado nesta etapa de avaliação específica dos efeitos psicofarmacológicos da EC foi o teste da placa perfurada que foi primeiramente introduzido por Boissier e Simon (1962, 1964), e oferece um método simples para medição das respostas de animais expostos a um ambiente não familiar, tal como a exploração do animal que pode ser verificado pelos mergulho de cabeça dos animais nos orifícios do equipamento (TAKEDA et al., 1998; WEI et al., 2007).

Na realização deste teste utilizamos o diazepam na dose de 1 mg/kg como droga padrão de efeito sedativo, já que ele é um importante ansiolítico que apresenta efeitos sedativos (SUZUKI et al., 1990; SHADER; GREENBLATT, 1993). Adeyeme et al (2006) e Aguirre-Hernández et al (2007) demonstraram que nesta dose, o diazepam apresenta efeitos sedativos

evidenciados pelo aumento da latência para os mergulhos de cabeça e redução no número total de mergulhos.

Resultados semelhantes com o diazepam também foram observados em nossos experimentos, em que esta droga na dose de 1 mg/kg foi capaz de aumentar a latência para os mergulhos e reduzir o número total de mergulhos (Figura 18, p. 85). A EC apresentou o mesmo perfil do diazepam, ou seja, foi capaz de aumentar a latência e reduzir o número de mergulhos, o que nos indica um perfil de droga sedativa para a EC (Figura 18, p. 85).

Os últimos testes psicofarmacológicos específicos da EC foram para avaliação da atividade anticonvulsivante. Vários modelos são utilizados para a avaliação de drogas com potencial anticonvulsivante (SMITH, WILCOX, WHITE, 2007), mas o teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) e o teste do eletrochoque auricular máximo (MES) continuam sendo os dois modelos animais mais utilizados nessas pesquisas.

Foram escolhidos esses dois testes, pois, primeiro que ambos os testes fornecem alguma informação a respeito da habilidade da droga de penetrar na barreira hemato-encefálica e exercer seu efeito no SNC. Segundo, ambos os modelos não são seletivos em relação ao mecanismo de ação e conseqüentemente são bem aceitos para a triagem de drogas com atividade anticonvulsivante, e finalmente que são dois modelos que requerem mínima perícia técnica e são facilmente realizados (LOWSON et al., 1991; LÖSCHER; SCHMIDT, 1994; MELDRUM, 2002; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006; SMITH, WILCOX, WHITE, 2007).

A inibição das convulsões induzidas pelo PTZ é uma metodologia considerada como um modelo experimental para “crises convulsivas generalizadas do tipo clônica (OLIVEIRA et al., 2001; SMITH, WILCOX, WHITE, 2007). Portanto, sabe-se que o bloqueio das convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ, em roedores, é uma característica de algumas drogas depressoras do SNC com ações anticonvulsivantes (ANCA; LAMELA; CALLEJA, 1993; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006).

No teste do PTZ utilizamos o diazepam como droga padrão pelo fato dessa droga bloquear as convulsões abrindo canais para cloreto associados a GABA<sub>A</sub>, facilitando assim a transmissão GABAérgica (PRITCHETT et al., 1989; FILE; ANDREWS, 1993; SMITH; OLSEN, 1995;

REDDY; KULKAMI, 1997; LAMBERTY et al., 2002), e observamos o aumento do percentual de animais que apresentaram proteção contra as convulsões, semelhante ao que foi observado no tratamento com a EC, que também foi capaz de promover significativa proteção das convulsões (Figura 19, p. 86).

Geralmente compostos que possuem atividade anticonvulsivante na epilepsia do tipo pequeno mal são efetivas em inibir as convulsões no modelo do PTZ (VIDA, 1995; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Assim como a EC promoveu proteção contra as convulsões induzidas pelo PTZ, sugere-se um perfil de droga anticonvulsivante que poderia ser útil nesses tipos de crises.

O segundo modelo anticonvulsivante utilizado foi o da eletroconvulsão, que tem se mostrado adequado na reprodução do fenômeno ictal da epilepsia focal (MELLO et al., 1986) e é muito utilizado na identificação de drogas anticonvulsivantes indicadas no tratamento das crises epiléticas generalizadas tônico-clônicas ou “grande mal epilético” (BARROS; LEITE, 1986; OLIVEIRA et al, 2001; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006; SMITH, WILCOX, WHITE, 2007). Este é um método de triagem para drogas com potencial anticonvulsivante, semelhante ao teste das convulsões induzidas pelo PTZ (LÖSCHER; SCHMIDT, 1994; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Apesar de seu pouco entendimento (ZIS et al, 1991) sabe-se que esse modelo é baseado no fato de que repetidas estimulações de pulsos elétricos são capazes de produzir convulsões tônico-clônicas, denominada de convulsão máxima por eletrochoque, onde o fenobarbital foi utilizado como droga padrão por atuar principalmente no sistema GABAérgico (BARROS; LEITE, 1986; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006).

Os resultados desse teste evidenciam uma proteção das convulsões nos animais tratados com a droga padrão (fenobarbital) e com a EC, que nos indica que o monoterpene apresenta um perfil semelhante à drogas anticonvulsivantes utilizadas para o tratamento do grande mal epilético (Figura 20, p. 87).

Analizando todos os resultados obtidos até este ponto do nosso estudo, pode-se concluir parcialmente que a EC se apresenta como uma droga psicotrópica com efeitos ansiolíticos, sedativos e anticonvulsivantes.

Há alguns aspectos que merecem ser abordados antes do início da caracterização do mecanismo de ação da EC. Primeiro que é relatado que

drogas que promovem a potencialização do tempo de sono induzido pelo pentobarbital atuam por envolvimento no sistema GABAérgico (N'GOUEMO et al., 1994; STEINBACH; AKK, 2001; SIVAM et al., 2004; AGUIRRE-HERNÁNDEZ et al., 2007; SARKER et al., 2007), segundo que as ações de drogas ansiolíticas e sedativas, como por exemplo o diazepam, são mediadas pela ligação à receptores GABA<sub>A</sub> (MACDONALD; OLSEN, 1994), e terceiro que as ações anticonvulsivantes do diazepam (PRITCHETT et al., 1989; FILE; ANDREWS, 1993; SMITH; OLSEN, 1995; REDDY; KULKAMI, 1997; LAMBERTY et al., 2002) e do fenobarbital (BARROS; LEITE, 1986; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006) são devidas, a atuação desses fármacos no sistema GABAérgico.

Como a EC apresentou todos esses efeitos descritos (potencialização do sono, ansiolítico, sedativo e anticonvulsivante), isto nos levou a sugerir que o monoterpeno poderia estar atuando por interferência no sistema GABAérgico para promover sua ação psicofarmacológica.

Baseado nisso, merece destaque uma discussão breve acerca do sistema GABAérgico (GABA e seus receptores) para melhor entendimento do mecanismo de ação da EC.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório cerebral, é formado a partir do glutamato pela ação do ácido glutâmico descarboxilase (GAD), uma enzima encontrada somente em neurônios que sintetizam o GABA no cérebro. Atua como neurotransmissor inibitório em muitas vias diferentes do SNC sendo liberado principalmente em interneurônios curtos, apresenta uma ampla distribuição respondendo por cerca de 30 % de todas as sinapses no SNC (GILMAN, 2003).

O GABA apresenta receptores divididos em três classes: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub> (FUKUSHIMA et al., 2007). GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> são receptores acoplados à canais iônicos, enquanto que o GABA<sub>B</sub> é um receptor acoplado à proteína G (CHEBIB; JOHNSTON, 1999).

O receptor GABA<sub>A</sub> é associado a um canal para cloreto operado por ligante, composto por cinco subunidades. Modificações no canal, e em particular na subunidade alfa podem levar a receptores GABA<sub>A</sub> sensíveis ou insensíveis aos benzodiazepínicos (BARNARD et al., 1998). Há 6 tipos de subunidades alfa ( $\alpha 1$  a  $\alpha 6$ ), onde receptores que compreendem as

subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ou  $\alpha 5$  são sensíveis aos benzodiazepínicos, enquanto aqueles que compreendem  $\alpha 4$  e  $\alpha 6$  levam a receptores insensíveis aos benzodiazepínicos (BARNARD et al., 1998).

Recentes estudos com mutação dos canais demonstraram que os diferentes efeitos comportamentais são dependentes da composição da subunidade  $\alpha$  no receptor GABA<sub>A</sub> (RUDOLPH et al., 1999). Especificamente, estudos têm mostrado que a subunidade  $\alpha 1$  medeia os efeitos sedativos do diazepam (MCKERNAN et al., 2000), enquanto que a  $\alpha 2$  os efeitos ansiolíticos (LOW et al., 2000).

O receptor GABA<sub>B</sub> é um receptor metabotrópico acoplado à proteína Gi, ligados à hiperpolarização de membrana e com conseqüente inibição dos canais para cálcio dependentes de voltagem, onde agonistas desses receptores, como o baclofeno, são utilizados para o tratamento da espasticidade e distúrbios motores relacionados (BORMANN, 1988; BOWERY, 1993; JOHNSTON, 1996; WHITE, 1999)

O receptor GABA<sub>C</sub> foi primeiramente descrito por Johnston (1986, 1996) e também é um canal para cloreto operado por ligante, onde estudos indicam uma distribuição em muitas porções do SNC (SIVILOTTI; NISTRÌ, 1991; ALBRECHT et al., 1997; BOUE-GRABOT et al., 1998; WEGELIUS et al., 1998; ENZ; CUTTING, 1999), mas são mais proeminentemente expressos na retina de vertebrados (QIAN; DOWLING, 1993; QIAN; DOWLING, 1994; QIAN; DOWLING, 1995).

Dada a importância e relação com as drogas antiepilépticas voltamos a discutir um pouco mais à respeito dos receptores GABA<sub>A</sub>, onde esses receptores apresentam vários sítios onde algumas drogas podem atuar, como o sítio de ligação do GABA, um ou mais sítios moduladores e o canal iônico propriamente dito que são alvos de várias drogas importantes de ação central, em especial os benzodiazepínicos, barbitúricos e neuroesteróides. Por exemplo, as ações psicofarmacológicas do diazepam são mediadas pela ligação ao sítio benzodiazepínico no receptor GABA<sub>A</sub> (FELDMAN et al., 1997; GILMAN, 2003; RANG et al., 2004; ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004)

Vários são os relatos das ações anticonvulsivantes de outros monoterpenos com estrutura química semelhante a da EC, como o linalol,



eugenol (SILVA BRUM; ELISABETSKY, 2001; SZABADICS; ERDELYI, 2000; WIE et al., 1997; SILVA BRUM et al., 2000; ELISABETSKY et al., 1995), SL-1 (monoterpeno sintético homólogo ao GABA), (LIBROWSKI et al., 2000), pineno, eugenol, (CONSROE et al., 1981; DALLMEIER; CARLINI, 1981), limoleno (VIANA et al., 2000) e mais recentemente o citrionelol (DE SOUSA et al., 2006a), gamma-decanolactona (VIANA et al., 2007) e safranal (HOSSEINZADEH; SADEGHNIA, 2007). Pelo fato de vários monoterpenos apresentarem atividade anticonvulsivante, direcionamos a continuidade dos estudos psicofarmacológicos para caracterização do mecanismo de ação anticonvulsivante da EC.

Com o intuito desse estudo do mecanismo de ação e melhor caracterização da ação anticonvulsivante da EC iniciou-se uma avaliação temporal dessa atividade em grupos de animais após 15, 30, 60, 90, 120 ou 240 minutos pós-tratamento (Figura 21, p. 89). Evidenciamos um aumento significativo da latência para as convulsões induzidas pelo PTZ até 60 minutos pós-tratamento e proteção significativa contra o desenvolvimento das convulsões até 30 minutos de pós-tratamento, que pode indicar que o efeito anticonvulsivante da EC tem duração máxima de 60 minutos, podendo ser decorrente de metabolização hepática da substância, resultando num composto de menor ação farmacológica, ou ainda, seja formado um composto que seja eliminado com maior rapidez e facilidade.

Para investigar melhor a participação do sistema GABAérgico no efeito anticonvulsivante da EC utilizou-se o teste das convulsões induzidas pela picrotoxina (PIC), que é um estimulante do SNC sendo utilizada na indução química de convulsões através da inibição dos receptores GABAérgicos, sendo que a reversão da estimulação induzida pela picrotoxina é considerada como um parâmetro eficaz no estudo de drogas da classe dos anticonvulsivantes que atuam em mecanismos que envolvem o sistema GABAérgico (ZIA et al, 1995; N'GOUEMO et al., 1994; HUANG et al., 2001; QIAN et al., 2005).

A latência para o desenvolvimento das convulsões induzidas pela PIC foi aumentada de maneira significativa nas dose de 300 ou 400 mg/kg de EC, além de promover também proteção significativa para o desenvolvimento das convulsões (Figura 22, p.91).

---

Esses resultados dão um maior suporte a hipótese da participação do sistema GABAérgico no efeito anticonvulsivante da EC.

Como já foram discutidos, os receptores GABA<sub>A</sub> são alvo para a ação anticonvulsivante de várias drogas (FELDMAN et al., 1997; GILMAN, 2003; RANG et al., 2004; ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004), e para avaliar se a EC estaria atuando por ativação direta do sítio benzodiazepínico nos receptores GABA<sub>A</sub> para produzir seu efeito anticonvulsivante, investigou-se seu efeito na presença do flumazenil, um antagonista seletivo do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub> (FILE et al. 1982; FILE; PELLOW, 1986; BROGDEN; GOA, 1988; BROGDEN, GOA, 1991).

Neste estudo da participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub>, verificou-se que o efeito anticonvulsivante do diazepam foi antagonizado totalmente pelo pré-tratamento com o flumazenil, que reverteu tanto o aumento da latência quanto a proteção das convulsões no teste do PTZ (Figura 23, p. 93). Esses resultados com o diazepam foram diferentes aos observados com a EC, que na dose de 300 mg/kg não teve seu efeito alterado na presença do flumazenil, o que indica que o efeito anticonvulsivante do monoterpeno parece não envolver a ativação, pelo menos de forma direta, do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub>, não descartamos a participação de outros sítios moduladores existentes no receptor nesse receptor.

Além dos sistemas de neurotransmissão, acredita-se que o processo oxidativo pode contribuir para a instalação das convulsões, estado epiléptico e morte dos animais, por meio dos danos neuronais induzidos por radicais livres (RAUCA et al., 2004).

Uma das tendências atuais nas investigações de novas drogas antiepilépticas é a busca de drogas com propriedades neuroprotetoras. Experimentos têm demonstrado a eficácia de algumas substâncias com atividade antioxidante na terapia das convulsões e dão suporte à hipótese do papel crucial dos radicais livres na patogênese de danos neurotóxicos cerebrais como na epilepsia (KABUTO et al., 1998; HSIEH et al., 2000; HSIEH et al., 2001; HEINEMANN et al, 2002; KOZAN et al., 2006; AYYILDIZ et al., 2006; AYYILDIZ et al., 2007)

É relatado que o estresse oxidativo pode contribuir para a instalação das convulsões através dos danos neuronais induzido pelos radicais

livres (RAUCA et al., 2004), e pode ser definido como um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante resultando numa excessiva produção de radicais livres (SIES, 1991), podendo alterar dramaticamente a função celular, e modificar a liberação e/ou síntese de outros compostos relacionados com a morte neuronal induzida pela convulsão, e tem sido implicado em uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo a epilepsia (FRANTSEVA et al., 2000; WALZ et al., 2000).

Devido ao seu grande potencial de dano os radicais livres são produzidos no organismo sob rigoroso controle de sistemas de defesa que incluem enzimas e outros antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1992).

Uma conseqüência do desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante é a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, processo denominado de lipídio peroxidação (lipoperoxidação) que pode comprometer a estrutura da membrana, danificando-a ou eventualmente causar a completa destruição, culminando com a morte celular (HALLIWELL, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997), sendo o cérebro mais vulnerável que outros tecidos, por que contém uma grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, e têm em relação aos outros tecidos, menos mecanismos antioxidantes (WALZ et al., 2000).

Então, como o estresse oxidativo pode contribuir para a instalação das convulsões através dos danos neuronais induzido pelos radicais livres (RAUCA et al., 2004), decidimos continuar a caracterização do mecanismo de ação anticonvulsivante da EC avaliando sua atividade antioxidante por meio do teste da lipoperoxidação *in vitro*.

Esse método se baseia na dosagem dos derivados dos derivados aldeídicos gerados pelo processo de lipoperoxidação espontânea do homogeneizado de cérebro de ratos em função da concentração da droga teste, que pode modular essa lipoperoxidação apresentando assim uma atividade antioxidante (BARROS et al., 2006).

Foi observada uma diminuição dos níveis de lipoperoxidação dos homogenatos de cérebro de rato, a qual pode ser interpretada que a EC apresenta um perfil de droga antioxidante (Figura 24, p. 95) e pode ser utilizada como uma substância neuroprotetora para impedir o desenvolvimento de

---

convulsões induzidas por radicais livres (HEINEMANN et al., 2002; FREITAS, 2006; AYYILDIZ et al., 2006; AYYILDIZ et al., 2007).

Um dos alvos moleculares de várias drogas antiepiléticas são os canais iônicos dependentes de voltagem. Esses canais incluem canais para o sódio, para o cálcio e para o potássio. Os canais para sódio cerebrais, por exemplo, são modulados por vários agentes anticonvulsivantes, tais como: fenitoína, lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina e zonisamida (ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004; STEFAN; FEUERSTEIN, 2007).

Então com o objetivo de caracterizar melhor o mecanismo de ação anticonvulsivante da EC, em nível eletrofisiológico, verificando a participação de canais iônicos da EC nessa ação, realizamos estudos utilizando a técnica de *single sucrose gap*.

Essa é uma técnica simples, rápida e registra o potencial de ação composto (PAC), permitindo assim avaliar o comportamento dos canais para  $\text{Na}^+$  e para  $\text{K}^+$ , na presença ou não da droga, durante as fases do PAC (NONAKA et al., 2000; MERT et al., 2002). Embora essa técnica não permita identificar especificamente os tipos de canais envolvidos nas respostas, sabe-se que vários agentes anticonvulsivantes atuam inibindo canais dependentes de voltagem incluindo para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  (FUNAHASHI et al., 2001; PATTEN et al., 2001; ARAÚJO et al., 2003; ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004; STEFAN; FEUERSTEIN, 2007).

É bem descrito que há um número grande de tipos de canais iônicos presentes em axônios mielinizados e que alguns tipos de canais estão distribuídos de maneira não uniforme (KOCISIS et al., 1987; ENG et al., 1988; ROPER; SCHWARZ, 1989; WAXMAN, 1995). Canais para sódio estão incrustados na membrana em alta densidade em axônios periféricos no nodo de Ranvier e esses canais são requeridos para a geração do potencial de ação (HILLE, 1992; GUVEN et al., 2006).

O efeito anticonvulsivante de drogas GABAérgicas pode ser mediado também por interferência ou modulação por canais para sódio dependentes de voltagem, uma vez que animais pré-tratados com drogas GABAérgicas apresentaram redução no número de convulsões, estado epilético e mortes (FREITAS, 2006).

Utilizamos a lidocaína, um anestésico local, como droga padrão de redução do PAC, já que a mesma atua por bloqueio dos canais para Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem (MERT; GUNAY, 1999), e verificamos uma redução na amplitude do potencial de ação (Figura 27, p. 99 e figura 28, p. 100).

A incubação de 1 mM de EC foi capaz de reduzir a amplitude do potencial de ação composto (PAC) de nervo isquiático de rato (Figura 25, p. 97) e essa redução do PAC é um indicativo do bloqueio de canais para Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem, e alguns anticonvulsivantes como o felbamato, lamotrigina (DUPERE et al., 1999; KWAN et al., 2001; GUVEN et al., 2006) e monoterpeno citronelol também atuam por bloqueio do PAC (DE SOUSA et al, 2006a).

O fato da EC não ter alterado de maneira significativa a constante de tempo de repolarização (Figura 26, p. 98) pode indicar que não haja o envolvimento dos canais para potássio dependentes de voltagem em seu mecanismo de ação, fato esse que também foi observado com a lidocaína (Figura 29, p. 101), aliado ao fato de que a densidade de canais para potássio no nodo de Ranvier, por onde há o fluxo iônico em fibras mielinizadas, é menos intensa que a dos canais para sódio (HILLE, 1992).

## Capítulo VII

### *Conclusões*

## VII. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos na caracterização da atividade psicofarmacológica de epóxi-carvona (EC) em modelos animais pôde-se inferir as seguintes conclusões:

- A EC apresentou uma toxicidade baixa, baseado nos valores obtidos da dose letal 50 % (DL<sub>50</sub>);
- EC induziu alterações comportamentais sugestivas de droga psicoléptica, ou seja, que reduz a atividade do SNC;
- EC apresentou características de droga com perfis ansiolítico e sedativo baseados nos resultados dos testes do labirinto em cruz elevado e da placa perfurada;
- EC apresentou perfil de droga anticonvulsivante nos testes do PTZ e MES, por terem aumentado a latência e reduzido o percentual de convulsões;
- O mecanismo de ação anticonvulsivante parece ser mediado pela interferência com o sistema GABAérgico e não envolve a ativação direta do sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub>, não descartando outros sítios não avaliados no receptor;
- EC foi capaz de inibir a lipoperoxidação in vitro apresentando portanto perfil de droga antioxidante;
- EC foi capaz de reduzir a amplitude do potencial de ação composto de nervo isquiático isolado de rato, sugerindo um bloqueio dos canais para Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem.

## Capítulo VIII

### *Referências*



**VIII. REFERÊNCIAS**

ADEYEMI, O. O.; YEMITAN, O. K.; TAIWO, A. E. Neurosedative and muscle-relaxant activities of ethyl acetate extract of *Baphia nitida* AFZEL. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 312-316, 2006.

AGUIRRE-HERNÁNDEZ, E.; MARTÍNEZ, A. L.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; MORENO, J.; VIBRANS, H.; SOTO-HERNÁNDEZ, M. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p. 140–145, 2007.

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some indian medicinal plants of their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 183-193, 1998.

AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. **Fitoterapia**, v. 59, p. 355-63, 1988.

ALBRECHT, B. E.; BREITENBACH, U.; STUHMER, T.; HARVEY, R. J.; DARLISON, M. G. *In situ* hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction studies on the expression of the GABA(C) receptor rho1- and rho2-subunit genes in avian and rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 2414-2422, 1997.

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, p. 334-338, 1996.

ALMEIDA, R. N., FALCÃO, A. C. G. M., DINIZ, R. S. T., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., POLARI, R. M., BARBOSA-FILHO, J. M., AGRA, M. F., DUARTE, J. C., FERREIRA, C. D., ANTONIOLLI, A. R., ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N. Modulação da dor através do uso de plantas medicinais com atividade central. **Arquivos Brasileiros de Fitoterapia Científica**, v. 1, p. 6-18, 2003.

ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletim Latino-americano e do Caribe de Plantas Mediciniais e Aromáticas**, v. 2, p. 3-6, 2003.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANCA, J. M.; LAMELA, M.; CALLEJA, J. M. Activity on the Central Nervous System of *Himantalia elongata*. **Planta Médica**, v. 59, p. 218-220, 1993.

ARAÚJO, D. A. M.; MAFRA, R. A.; RODRIGUES, A. L. P.; MIGUEL-SILVA, V.; BEIRÃO, P. S. L.; ALMEIDA, R. N.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; SOUZA, M. F. V.; CRUZ, J. S. N-Salicyloyltryptamine, a new anticonvulsant drug, acts on voltage-dependent Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and K<sup>+</sup> ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 1331–1339, 2003.

ARGAL, A.; PATHAK, A. K. CNS activity of *Calotropis gigantea* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 142–145, 2006.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; DE SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 307-311, 2006.

ATTAL, N. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. **Clinical Journal of Pain**, v. 16, p. S118–130, 2000.

AVANZINI, G; FRANCESCHETTI, S. Cellular biology of epileptogenesis. **The Lancet: Neurology**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2003.

AYYILDIZ, M.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The effects of vitamin E on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Experimental Brain Research**, v. 174, n. 1, p. 109-113, 2006

AYYILDIZ, M.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The involvement of nitric oxide in the anticonvulsant effects of alpha-tocopherol on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Epilepsy Research**, v. 73, n. 2, p. 166-172, 2007.

BAJJALIEH, S. M.; FRANTZ, G. D.; WEIMANN, J. M.; MCCONNELL, S. K.; SCHELLER, R. H. Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 5223–5235, 1994.

BARBOSA, A. Um Fundo Nacional para custear os serviços farmacêuticos nas pequenas farmácias. **Pharmacia Brasileira**, n. 55, p. 38-40, 2006.

BARNARD, E. A.; SKOLNICK, P.; OLSEN, R. W.; MOHLER, H.; SIEGHART, W.; BIGGIO, W.; BRAESTRUP, C.; BATESON, A. N.; LANGER, S. Z., 1998. International union of pharmacology XV. Subtypes of gammaaminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 291–313, 1988.

BARROS, H. M. T.; LEITE, J. R. Mecanismos neuroquímicos da ação de drogas anticonvulsivantes. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 8, p. 80-83, 1986.

BARROS, M. P.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; MATTEI, R. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante de princípios ativos aplicados na profilaxia de doenças degenerativas. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cáp. 21, p. 237-261.

---

BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R.; KJELLSTROM, T. **Epidemiologia básica**, 1<sup>a</sup> Ed. Salvador: Lis Gráfica Editora Ltda, 1996.

BITTIGAU, P.; SIFRINGER, M.; GENZ, K.; REITH, E.; POSPISCHIL, D.; GOVINDARAJALU, S.; DZIETKO, M.; PESDITSCHKE, S.; MAI, I.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J. W.; IKONOMIDOU, C. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 15089-15094, 2002.

BLANCO, M. C. S. G.; SOUZA, M. M. S.; BOVI, O.; MAIA, N. B. **O óleo essencial**. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/saberes/plantasmedicinais/oleos.htm>. Acesso em: 14/03/2007.

BLIER, P.; ABBOT, F. V. Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 37–43, 2001.

BOECK, C. R.; GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 745–749, 2004.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. La reaction d'exploration chez la souris. **Thérapie**, v. 17, p. 1225–1232, 1962.

BOISSER, J. R.; SIMON, P. Dissociation de deux composantes dans le compartiment d'investigation de la souris. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 147, p. 372–387, 1964.

BORMANN, J. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors subtypes. **Trends in Neurosciences**, v. 11, p. 112–116, 1988.

BORWERY, N. G. GABA<sub>B</sub>-receptor pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, p. 109-147, 1993.

BOTELHO, S.; ESTANISLAU, C.; MORATO, S. Effects of under- and overcrowding on exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behavioural Processes**, v. 74, p. 357–362, 2007.

BOUE-GRABOT, E.; ROUDBARAKI, M.; BASCLES, L.; TRAMU, G.; BLOCH, B.; GARRET, M. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, p. 899-907, 1998.

BRODIE, M. J. Do we need any more new antiepileptic drugs? **Epilepsy Research**, v. 45, p. 3-6, 2001

BROGDEN, R. N.; GOA, K. L. Flumazenil: a preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and therapeutic use. **Drugs**, v. 35, p. 448–467, 1988.

BROGDEN, R. N.; GOA, K. L. Flumazenil: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as a benzodiazepine antagonist. **Drugs**, v. 42, p. 61–89, 1991.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p. 179, 2000.

CAPASSO, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SORRENTINO, L. 1996. Pharmacological effect of the aqueous extract from *Valeriana adscendeus*. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 309–312, 1996.

CARLINI, E. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier. p. 167-169, 1973.

CARLINI, E. A. **Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) e outras.** Brasília: CEME/AFIP, 1988.

CARLINI, E. A. **Medicamentos Drogas e Saúde.** São Paulo: Ed. Hucitec/Sobravime, 1995.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CELIKTAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN; F. V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553–559, 2007.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 26, p. (1999), p. 937–940, 1999.

CHEBIB, M.; DUKE, R. K.; DUKE, C. C.; CONNOR, M.; MEWETT, K. N.; JOHNSTON, G. A. R. Convulsant actions of calycanthine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 190, p. 58–64, 2003.

CHIOZA, B.; WILKIE H.; NASHEF, L.; BLOWER, J.; MCCORMICK, D.; SHAM, P.; ASHERSON, P.; MAKOFF, A. J. Association between the alpha calcium channel gene *CCCNA1A* and idiopathic generalized epilepsy. **Neurology**, v. 56, n. 9, p. 1245-1246, 2001.

CLUFF, R. S. Adjuvant treatments. In: Ballantyne J, Fishman SM, Abdi S, editors. **The Massachusetts General Hospital Handbook of Pain Management.** 2ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002.

CONSROE, P.; MARTIN, A.; SINGH, V. Antiepileptic potential of cannabinoid analogs. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 428S-436S, 1981

COOPER, J. R.; BLOMM, F. E.; ROTH, R. H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**. New York: Oxford University Press, 1996

COSTA, J. C., RUSSO, R. E., GUILHERMO, G.; VELLUTI, J. C. Bases celulares da epilepsia. **Jornal da Liga Brasileira de Epilepsias**, v. 5, n. 1, p. 9-17, 1992.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibenkian, p. 190-193, 1994.

COSTA-LOTUFO, L. V.; FONTENELES, M. M. F.; LIMA, I. S. P.; OLIVEIRA, A. A.; NASCIMENTO, V. S.; BRUIN, V. M. S.; VIANA, G. S. B. Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 521-529, 2002.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: Ed. da UFC, 1981.

CRESTANI, F.; ASSANDRI, R.; TÄUBER, M.; MARTIN, J. R.; RUDOLPH, U. Contribution of the  $\alpha$ 1-GABAA receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 679–684, 2002.

CROWDER, K. M.; GUNTHER, J. M.; JONES, T. A.; HALE, B. D.; ZHANG, H. Z.; PETERSON, M. R.; SCHELLER, R. H.; CHAVKIN, C.; BAJJALIEH, S. M. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 15268–15273, 1999.

CRUZ, J. S.; MATAVEL, A. C. S.; LEÃO-FILHO, H. M.; MORAES-SANTOS, T.; BEIRÃO P. S. L. Tityustoxin effect on nerve compound action potentials requires extracellular sodium **Neuroscience Letters**, v. 282, p. 25-28, 2000.

CUNHA, D. C. **Produção de tubérculos e de óleo essencial de priproica (*Cyperus articulatus* L.), em função da adubação orgânica e calagem.** 2006. 89f. Dissertação de Mestrado (Mestre em agronomia – solos e nutrição em plantas) – Universidade federal Rural da Amazônia, 2006.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113–127, 1981.

DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 33–36, 1995.

DECKERS, C. L. P.; GENTON, P.; SCHMIDT, D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. **Epilepsy Research**, v. 53, p. 1–17, 2003.

DE FEO, V.; CAPASSO, A.; DE SIMONE, F.; SORRENTINO, L. CNS pharmacological effects of aqueous extract from *Iresine herbstii*. **Internacional Journal Pharmacognosy**, v. 34, p. 184–188, 1996.

DELAMARE, A. P. L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I. T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603–608, 2007.

DE LORENZO, R. ZJ.; RAZA, M.; PAL, S.; RAFIQ, A. Long-term alterations of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Research**, v. 93, p. 1–12, 2001.

DEMIRYUREK, A. T.; CAKICI, I.; KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. **Pharmacology and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 113–117, 1988.



DE SOUSA, D. P.; RAPHAEL, E.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T. J. Antinociceptive profile of 2-phenylselenenyl-1,8-cineole in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 910-911, 2004.

DE SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006a.

DE SOUSA, D. P.; OLIVEIRA, F. S.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of the Central Activity of Hydroxydihydrocarvone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 4, p. 811-812, 2006b.

DE SOUSA, D. P.; SCHEFER, R. R.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T. J. Synthesis and antidepressant evaluation of three para-benzoquinone mono-oximes and their oxy derivatives. **Molecules**, v. 11, p. 148-155, 2006c.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. New York: John Wiley Ed., 1998.

DEYN, P. P.; D'HOOGHE, R.; MARESCAU, B.; PEI, Y. Q. Chemical model of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. **Epilepsy Research**, v. 12, p. 87-110, 1992.

DOCTOR, S. V.; COSTA, L. G.; MURPHY, S. D. Effect of trimethyltin on chemically-induced seizures. **Toxicology letters**, v. 13, p. 217-223, 1982.

DUNHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n.3, p. 208-209, 1957.

DUPERE, J. R. B.; DALE, T. J.; STARKEY, S. J.; XIE, X. The anticonvulsant BW534U87 depress epileptiform activity in rat hippocampal slices by an

adenosine-dependent mechanism and through inhibition of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1011-1020, 1999.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 19, n. 5, p. 221-357, 1988a.

EISERICH, J. P.; HRISTOYA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, n. 22, p. 393-397, 1988b.

ELISABETSKY, E.; COELHO DE SOUZA, G. P.; SANTOS, M. A. C.; SIQUEIRA, I. R.; AMADOR, T. A. Sedative properties of linalool. **Fitoterapia**, v. 66, p. 407-414, 1995.

EMINAGAOGLU, O.; TEPE, B.; YUMRUTAS, O.; AKPULAT, H. A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. The *in vitro* antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. **Food Chemistry**, v. 100, p. 339–343, 2007.

ENGEL, J. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796–780, 2001.

ENG, D. L.; GORDON, T. R.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. Development of 4-AP and TEA sensitivities in mammalian myelinated nerve fibers. **Journal of Neurophysiology**, v. 60, p. 2168–2179, 1988.

ENZ, R.; CUTTING, G. R. GABA<sub>C</sub> receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct

physical properties. **European Journal of Neurosciences**, v. 11, p. 41-50, 1999.

EYAL, S.; YAGEN, B.; SOBOL, E.; ALTSCHULER, Y.; SHMUEL, M.; BIALER, M. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 737–744, 2004.

FAJARDO, G. et al. Comparative study of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n 2, p.181-185, 1997.

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

FARHAT, G. N.; AFFARA N. I.; GALI-MUHTASIB H. U. Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. **Toxicon**, v. 39, p. 1601-1605, 2001.

FARNSWORTH, N.R.; MORRIS R. W. Higher plants - the sleeping giant of drug development. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 148, p. 46, 1976.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. **Principles of Neuropsychopharmacology**. Sunderland, MA' Sinauer, 1997.

FERNÁNDEZ-GUASTI A.; FERREIRA, A.; PICAZO, O. Diazepam, but not buspirone, induces similar anxiolytic-like actions in lactating and ovariectomized Wistar rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 70, p. 85–93, 2001.

FILE, S. E.; LISTER, R. G.; NUTT, D. J. The anxiogenic actions of benzodiazepine antagonists. **Neuropharmacology**, v. 21, p.1033–1037, 1982.

FILE, S. E.; PELLOW, S. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. **Psychopharmacology**, v. 88, p. 1–11, 1986.

FILE, S. E.; ANDREWS, N. Benzodiazepine withdrawal: behavioural pharmacology and neurochemical changes. **Biochemical Society Symposium**, v. 59, p. 97-106, 1993.

FISHER, R. S. Animal models of the epilepsies. **Brain Research Reviews**, v. 14, p. 245-278, 1989.

FRANTSEVA, M.V.; PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P. L. Free radical production correlates with cell death in an *in vitro* model of experimental epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 9, p. 6-71, 2000.

FREIRE, C. M. M.; MARQUES, M.O.M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161-166, 2006.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTENELES, M. M. F. Pilocarpine-induced seizures in adults rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacological, Biochemical and Behavior**, v. 78, n. 2, p. 327-332, 2004.

FREITAS, R. M. **Estudo farmacológico e neuroquímico da fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina em áreas cerebrais de ratos adultos** 2006. 347f. Tese de Doutorado (Doutor em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2006.

---

FUH, M. S.; PAN, W. H.; HSIEH, I. J.; CHUO CHIHMING. Preparative-scale supercritical-fluid extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum* (Clove bud). **International Laboratory**, v.26, n.3, p. 26, 1996.

FUKUSHIMA, T.; TSUDAA, M.; OTSUBOA, T.; HORIA, Y. Syntaxin 1A occludes GABA<sub>B</sub> receptor-induced inhibition of exocytosis downstream of Ca<sup>2+</sup> entry in mouse hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 415, n. 2, p. 130-134, 2007.

FUNAHASHI, M.; HIGUCHI, H.; MIYAWAKI, T.; SHIMADA, M.; MATSUO, R. Propofol suppresses a hyperpolarization-activated inward current in rat hippocampal CA1 neurons. **Neuroscience Letters**, v. 311, p.177–180, 2001.

GILLIAM, F. G.; SANTOS, J.; VAHLE, V.; CARTER, J. BROWN, K.; HECIMOVIC, H. Depression in epilepsy: ignoring clinical expression of neuronal network dysfunction. **Epilepsia**, v.45, n. S2, p.26–30, 2004.

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Ed. McGraw Hill, 10<sup>a</sup> Edição, 2003.

GOLOUBKOVA, T.D.; HECKLER, E.; RATES, S. M. K.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 141–148, 1998.

GRUNDMANNA, O.; NAKAJIMA, J.-I.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 406–411, 2007.

GUVEN, M.; BOZDEMIR, H.; GUNAY, I.; SARICA, Y.; KAHRAMAN, I.; KOC, F. The actions of lamotrigine and levetiracetam on the conduction properties of isolated rat sciatic nerve. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, p. 129–134, 2006.

GYAMFI, M. A.; HOKAMA, N.; OPPONG-BOACHIE, K.; ANIYA, Y. Inhibitory effects of the medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolizing enzymes of rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 19, p. 623–631, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, p.721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p.598-620, 1992.

HEINEMANN, J.; HARDOS, J.; KANN, O. GABRIEL, S.; SCHUCHMANN, S.; KOVACS, R. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slices cultures. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, p. 2909-2918, 2002.

HENMAN, A. R. **Vida Natural. O Guaraná: sua cultura, propriedades, formas de preparação e o uso.** São Paulo: Editora Global/Ground, p. 77, 1986.

HERMAN, S. T.; PEDLEY, T. A. Novas opções para o tratamento da Epilepsia. **Journal of American Medical Association**, v. 3, n. 1, p. 1634-1640, 1999.

HILLE, B. **Ionic Channels of Excitable Membranes.** Sunderland: Sinauer Associates, MA, p. 457–460, 1992.

HIPPOCRATES. On the sacred disease. In: U. Chicago (Eds). **Hippocrates and Galen.** Chicago: Encyclopedia Britannica, 1952. p.154-160.

HOSFORD D. A.; WANG, Y. Utility of the lethargic (*lh/lh*) mouse model of absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin, and topiramate against human absence seizures. **Epilepsia**, v. 38, p. 408-14, 1997.

---

HOSSEINZADEH, H.; SADEGHNIA, H. R. Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems. **Phytomedicine**, v. 14, p. 256–262, 2007.

HSIEH, C. L.; CHANG, C. H.; CHIANG, S. Y.; LI, T. C.; TANG, N. Y.; PON, C. Z.; HSIEH, C. T.; LIN, J. G. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. **Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1185-1195, 2000.

HSIEH, C. L.; CHIANG, S. Y.; CHENG, K. S.; LIN, Y. H.; TANG, N. Y.; LEE, C. J.; PON, C. Z.; HSIEH, C. T. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. in kainic acid-treated rats. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 29, n. 2, p. 331-341, 2001.

HUANG, F. C.; KUTCHAN, T. M. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 555-564, 2000.

HUANG, R. Q.; BELL-HORNER, C. L.; DIBAS, M. I.; COVEY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors: mechanism and site of action. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, p. 986–995, 2001.

HUGHLINGS-JACKSON, J. On right or left sided spasm at the onset of epileptic paroxysms, and on crude sensation warnings, and elaborate mental states. **Brain**, v.3, p. 192-206, 1880.

IACOBELLIS, N. S.; CANTORE, P. L.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 57-61, 2005.

JEUB, M.; BECK, H.; SIEP, E.; RÜSCHENSMIDT, C.; SPECKMANN, E. J.; EBERT, U.; POTSCHKA, H.; FREICHEL, C.; REISSMÜLLER, E.; LÖSCHER,

W. Effect of phenytoin on sodium and calcium currents in hippocampal CA1 neurons of phenytoin-resistant kindled rats. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 107-116, 2002.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SHAFI, P. M.; ABRAHAM, G. T. Analysis of the essential oil of the roots of the medicinal plant *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae) from South-India. **Acta Pharmaceutica Turcica**, v. 43, n. 2, p. 107-110, 2001.

JOHANNESSEN, S. I.; GRAM, L.; SILLANPÄÄ, M.; TOMSON, T. **Intractable Epilepsy**. Petersfield: Wrightson Biomedical Publishing Ltd, 1995.

JOHNSTON, G. A. R. GABA<sub>A</sub>-receptor pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, p. 173-178, 1996.

JUNIOR, D. A. **Contribuição das medidas volumétricas das estruturas temporais mesiais e neocorticais ao tratamento cirúrgico da epilepsia do lobo temporal**. 2003. 114f. Tese de Doutorado (Doutor em Medicina - Neurologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

KABUTO, H.; YOKOI, I.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**, v. 39, p. 237-243, 1998.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 8ª Edição, 2003.

KAISER, R. New or uncommon volatile components in the most diverse natural scents. **EPPOS Special Number 15th Journées Internationales Huiles Essentielles**, p. 17-47, 1997.

KHIARI, J.; HASSINI, B. B.; GRAVEL, D. Méthodologie de synthèse des analogues à chaînes ouvertes de l'huperzine A. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 4, p. 705, 2001.



KITANO, Y.; USUI, C.; TAKASUNA, K.; HIROHASHI, M. NOMURA, M. Increasing-current electroshock seizures test: a new method for assessment of anti and pro-convulsant activities of drugs in mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 35, p. 25-29, 1996.

KOCSIS, J. D.; ENG, D. L.; GORDON, T. R.; WAXMAN, S. G. Functional differences between 4-aminopyridine and tetraethylammonium-sensitive potassium channels in myelinated axons. **Neuroscience Letters**, v. 75, p. 193–198, 1987.

KOO, B.-S.; PARK, K.-S.; HA, J.-H.; PARK, J. H.; LIM, J.-C.; LEE, D.-U. Inhibitory Effects of the Fragrance Inhalation of Essential Oil from *Acorus gramineus* on Central Nervous System. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 26 (7): 978-982, 2003

KOO, B.-S.; LEE, S.-I; HA, J.-H.; LEE, D.-U. Inhibitory Effects of the Essential Oil from SuHeXiang Wan on the Central Nervous System after Inhalation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 4, p. 515-519, 2004.

KORPI, E. R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, p. 113–159, 2002.

KOZAN, R.; AYYILDIZ, M.; YILDIRIM, M.; AGAR, E. The effects of ethanol intake and withdrawal on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 71, n. 1-3, p. 111-115, 2006.

KWAN, P.; SILLS, G. J.; BRODIE, M. J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology and Therapy**, v. 90, p. 21-34, 2001.

LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J.; KLITGAARD, H. The new antiepileptic drug levetiracetam normalizes chlordiazepoxide withdrawal-induced anxiety in mice. **European Journal of Pharmacology**. V. 439 p. 101-106, 2002.

---

LAPA, A. J.; LIMA, T. C. M. **Curso de validação de plantas medicinais com atividade no Sistema Nervoso Central**. Florianópolis, Santa Catarina. Programa Iberoamericano de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento/Rede Iberoamericana de Validação de Plantas Medicinais, 1997.

LEITE, J. R.; SIQUEIRA, J. S. Métodos para avaliar drogas ansiolíticas. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 14, p. 154-160.

LEONARD, C. S.; LLINÁS, R. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. **Neuroscience**, v. 59, p. 309, 1994.

LIAO, J.-F., HUANG, S.-Y., JAN, Y.-M., YU, L.-L., CHEN, C.-F. Central inhibitory effects of water extract of *Acorei graminei* rhizome in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 3, p. 185-193, 1998.

LIBROWSKI, T.; CZARNECKI, R.; MENDYK, A.; JASTRZEBSKA, M. Influence of new monoterpen homologues of GABA on the central nervous system activity in mice. **Poland Journal of Pharmacology**, v. 52, p. 317–321, 2000.

LIM, R. F.; HILTY, D. M.; JERANT, A. F. An algorithm for treating psychotic disorders in primary care. **Primary Psychiatry**, v. 8, n. 8, p. 68–72, 2001.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 6, p. 540-542, 1999.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LITCHFIELD, L.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 19, p. 388-397, 1949.

LORKE, D. A new approach to acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 54, p. 275–287, 1983.

LÖSCHER, W.; FASSBENDER, C. P.; NOFTING, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal Electroshock seizures models. **Epilepsy Research**, v. 8, p. 79-94, 1991

LÖSCHER, W., SCHMIDT, D. Which animal model should be used in the search for new antiepileptic drug? A proposal based on experimental and clinical consideration. **Epilepsy Research**, v. 2, p. 145-181, 1988.

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

LÖSCHER, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 3, 113–118. 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 3-16, 2002.

LÖSCHER, W.; POTSCHKA, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. **Nature Reviews in the Neuroscience**, v. 6, p. 591–602, 2005.

LOW, K.; CRESTANI, F.; KEIST, R.; BENKE, D.; BURNIG, I.; BENSON, J. A.; GRITSCHY, J. M.; RULICKE, T.; BLUETHMANN, H.; MOHLER, H.; RUDOLPH, U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v. 290, p. 131–132, 2000.

LOWSON, S.; GENT, J. P.; GOODCHILD, C. S. Convulsive thresholds in mice during the recovery phase from anesthesia induced by propofol, thiopentone, methohexitone and etomidate. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, p. 879-882, 1991.

LUDERS, H.; ACHARYA, J.; BAUMGARTNER, C.; BENBADIS, S.; BLEASEL, A.; BURGESS, R.; DINNER, D. S.; EBNER, A.; FOLDVARY, N.; GELLER, E.; HAMER, H.; HOLTHAUSEN, H.; KOTAGAL, P.; MORRIS, H.; MEENCKE, H. J.; NOACHTAR, S.; ROSENOW, F.; SAKAMOTO, A.; STEINHOFF, B. J.; TUXHORN, I.; WYLLIE, E. Semiological seizure classification. **Epilepsia**, v. 39, p. 1006-1013, 1998.

LUDENS, H.; WISDEN, W. Function and pharmacology of multiple GABA<sub>A</sub> receptors subunits. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 49-51, 1991.

LYNCH, B. A.; LAMBENG, N.; NOCKA, K.; KENSEL-HAMMES, P.; BAJJALIEH, S. M.; MATAGNE, A.; FUKS, B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 9861–9866, 2004.

MACDONALD, R. L.; OLSEN, R. W. GABA<sub>A</sub> receptor channels. **Annual review of Neuroscience**, v. 17, p. 569–602, 1994.

MARGINEANU, D. G.; KLITGAARD, H. Levetiracetam: mechanisms of action. In: LEVY, R. H.; MATTSON, R. H.; MELDRUM, B. S.; PERUCCA, E. (Eds.), **Antiepileptic Drugs**, 5 ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 419–427, 2002.

MARTÍNEZ, A. L.; DOMÍNGUEZ, F.; OROZCO, S.; CHÁVEZ, M.; SALGADO, H.; GONZÁLEZ, M.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. Neuropharmacological

effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p. 250–255, 2006.

MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Mazindol: anorectic and behavioral effects in female rats. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 330, p. 279-287, 1995.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.

MCKERNAN, R. M.; ROSAHL, T. W.; REYNOLDS, D. S.; SUR, C.; WAFFORD, K. A.; ATACK, J. R.; FARRAR, S.; MYERS, J.; COOK, G.; FERRIS, P.; GARRETT, L.; BRISTOW; MARSHALL, G.; MACAULAY, A.; BROWN, N.; HOWELL, O.; MOORE, K. W.; CARLING, R. W.; STREET, L. J.; CASTRO, J. L.; RAGAN, C. I.; DAWSON, G. R.; WHITING, P. J. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 587–592, 2000.

MCNAMARA, J. O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature**, v. 399, p. A15-A22, 1999.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 11, p. 379-387, 1990.

MELDRUM, B. S. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 33–40, 2002.

MELO, R. C. A. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas. Parte I: Definições. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n. 2, p.193-200, 2005.

MELLO, L. E. A. M.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Modelos experimentais de epilepsias. Uma Revisão. **Neurobiologia (Recife)**, v. 49, p. 231-268, 1986.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. L. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 462-471, 2002.

MERRITT, H. H.; PUTNAM, T. J. Sodium diphenylhydantoinate in the treatment of convulsive disorders. **Journal of American Medical Association** **111**: 1068–1073, 1938.

MERT, T.; GUNAY, I. Comparison of frequency dependent blockade of procaine and lidocaine. **Cukurova University Journal of Health Science**, v. 14, n. 1,2,3, p. 7 – 12, 1999.

MERT, T.; GUNES, Y.; GUVEN, M.; GUNAY, I.; OZCENGIZ, D. Comparison of nerve conduction blocks by an opioid and a local anesthetic. **European Journal of Pharmacology**, v. 439, p. 77– 81, 2002.

MICHOTTE, Y.; EBINGER, G.; MANIL, J.; KHAN, G. M.; SMOLDERS, I. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 1171-1179, 1997.

MICHOTTE, Y.; KHAN, G.M.; SMOLDERS, L; EBINGER, G. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2418-2432, 2000.

MONNIER, C.; LALONDE, R. Elevated + maze and hole-board exploration in lurcher mutant mice. **Brain Research**, v. 702, p. 169-172, 1995.

---

MORA, S.; DIÁZ-VÉLIZ, G.; MILLÁN, R.; LUNGENSTRASS, H.; QUIRÓS, S.; COTO-MORALES, T.; HELLIÓN-IBARROLA, M. C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, p. 373-378, 2005.

MORAIS, L. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 57-61, 1998.

MORAIS, L. C. S. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; FRANCO, C. I. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ALMEIDA, R. N. Antiparkinsonian-like effects of *Plumbago scandens* on tremorine-induced tremors methodology. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 745-749, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NONAKA, T.; HONMOU, O.; SAKAI, J.; HASHI, K.; KOCSIS, J. D. Excitability changes of dorsal root axons following nerve injury: implications for injury-induced changes in axonal Na<sup>+</sup> channels. **Brain Research**, v. 859, p. 280-285, 2000.

N'GOUEMO, P.; NQUEMBY-BINA, C.; BALDY-MOULINIER, M. Some neuropharmacological effects of an ethanol extract of *Maprounea africana* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 161-166, 1994.

OLIVEIRA, F. A.; ALMEIDA, R. N.; SOUSA, M. F. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, S. A.; MEDEIROS, I. A. Anticonvulsant properties of N-salicyloyltryptamine in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 68, p. 199-202, 2001.

---

OLIVEIRA, F. S. **Estudo do efeito psicofarmacológico de hidroxidiidrocarvona em camundongos** 2006. 94f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Produtos Naturais - Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

PATTEN, D.; FOXON, G. R.; MARTIN, K. F.; HALLIWELL, R. F. An electrophysiological study of the effects of propofol on native neuronal ligand-gated ion channel. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28 p. 451–458, 2001.

PEDLEY, T. A. As epilepsias. In: **Tratado de Medicina Interna**. Goldman, L., Bennet, J. C. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.149-167, 1985.

PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V. L. G. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 497–502, 2003.

PEREZ, G. R. M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43–48, 1998.

PISANI, A.; BONSI, P.; MARTELLA, G.; DE PERSIS, C.; COSTA, C.; PISANI, F.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 719–725, 2004.

POLATIN, P. B.; DERSH, J. D. Psychotropic medication in chronic spinal disorders. **The Spine Journal**, v. 4, p. 436-450, 2004.



POURGHOLAMI, M. H.; MAJZOUB, S.; JAVADI, M.; KAMALINEJAD, M.; FANAEE, G. H. R.; SAYYAH, M. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 211-215, 1999.

PRITCHETT, D. B.; LUDDENS, H.; SEEBURG, P. H. Type I and Type II GABA<sub>A</sub> benzodiazepine receptors produced in transfected cells. **Science**, v. 245, p. 1389-1392; 1989.

PUTNAM, T. J.; MERRITT, H. H. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. **Science**, v. 85, p. 525-526, 1937.

QIAN, H.; DOWLING, J. E. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. **Nature**, v. 361, p. 162-164, 1993.

QIAN, H.; DOWLING, J. E. Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. **Journal of Neurosciences**, v. 14, p. 4299-4307, 1994

QIAN, H.; DOWLING, J. E. GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, p. 1920-1928, 1995.

QIAN, Y. P.; ZHU, Y.; KHALILI, P. Picrotoxin accelerates relaxation of GABA<sub>C</sub> receptors, *Molecular Pharmacology*, v. 67, p. 470–479, 2005.

QUINTANS-JUNIOR, L. J. **Estudo da atividade anticonvulsivante de *Rauvolfia ligustrina* Roem et Schult. e de derivados indólicos sintéticos.** 2004. 129f. Tese de Doutorado (Doutor em Produtos Naturais - Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 5ª Edição, 2004.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

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

REDDY, D. S.; KULKAMI, S. K. Neurosteroid coadministration prevents development of tolerance and augments recovery from benzodiazepine withdrawal anxiety and hyperactivity in mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.19, p. 395-405, 1997.

REGESTA, G.; TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. **Society for Neuroscience**, v. 34, p. 109-122, 1999.

ROGAWSKI, M. A.; PORTER, R. J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacological Reviews**, v. 42, p. 223-86, 1990.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, p. 553–564, 2004.

RODRIGUEZ, A. E. I.; BROITMEAN, S. T.; FOSCOLO, M. R. Effects of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole-board response to acute stress in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 26, p. 207-201, 1987.

ROPER, J.; SCHWARZ, J. R. Heterogeneous distribution of fast and slow potassium channels in myelinated rat nerve fibers. **Journal of Physiology**, v. 416, p. 93–110, 1989.

---

RUDOLPH, U.; CRESTANI, F.; BENKE, K.; BRUNIG, I.; BENSON, J. A.; FRITSCHY, J. M.; MARTIN, J. R.; BLUETHMANN, H.; MOHLER, H. Benzodiazepine actions mediated by specific gammaaminobutyric acid(A) receptor subtypes. **Nature**, v. 401, p. 796–800, 1999.

SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; BONKANKA, C. X.; PRADO, B.; RABANAL, R. M. Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. **Journal of Ethnopharmacology** (2007), doi:10.1016/j.jep.2007.02.019.

SANTOS, F. A. ; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Studies on the neuropharmacological effects of *Psidium guyanensis* and *Psidium pholianum* essential oils. **Phytotherapy Research**, v.10, p. 655-658, 1996.

SANTOS. M. G. **Refino da terebintina sulfatada desodorizada por destilação e sua utilização na síntese de  $\alpha$ -terpineol**. 2005. 103f. Dissertação de Mestrado (Mestre em engenharia química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SARKER, S. D.; UDDIN, S. J.; SHILPI, J. A.; ROUF, R. FERDOUS, M. E. M.; NAHAR, F. Neuropharmacological properties of *Xylocarpus moluccensis*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 107–111, 2007.

SAWYNOK, J.; ESSER, M. J.; REID, A. R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. **Journal of Psychiatry & Neuroscience:JPN** , v. 26, n. 1, p. 21–29, 2001.

SAYYAH, M.; NADJAFNIA, L.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracuncululus* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 283-287, 2004.

SCHATZBERG, A. F.; COLE, J. O.; DEBATTISTA C. **Manual of clinical Psychopharmacology**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2003.

SCHMIDT, D.; LÖSCHER, W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. **Epilepsia**, v. 46, p. 858–877, 2005.

SCHOFFERMAN J. The use of medications for low back pain. In: Cole, A. J.; Herring, S. A., editors. **The low back pain handbook**. 2ª ed. Philadelphia, PA: Hanley and Belfus, 2003.

SEN, T.; CHAUDHURI, K. N. Studies on the neuropharmacological aspects of *Pluchea indica* root extract. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 175-179, 1992.

SHADER, R. I.; GREENBLATT, D. J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1398–1405, 1993.

SIMÕES, C. M. O. et al., **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

SIMONIÉ, A.; LAGINJA, J.; VARLJEN, J.; ZUPAN, G.; ERAKOVIC, V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neuroscience Research**, v. 36, p. 157-166, 2000.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. In: **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. New York: Academic Press, p. 15-22, 1991.

SILVA-BRUM, L. F.; ELISABETSKY, E. Antiepileptogenic properties of phenobarbital: behavior and neurochemical analysis. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 411-416, 2000.

SILVA BRUM, L. F.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D. Effects of Linalool on. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 422–425, 2001.

SIVILOTTI, L.; NISTRI, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 36, p. 35-92, 1991.

SIVAM, S. P.; NABESHIMA, T.; HO, I. K. Acute and chronic effects of pentobarbital in relation to postsynaptic GABA receptors: A study with muscimol. **Journal of Neuroscience Research**, v. 7, p. 37–47, 2004.

SMITH, G. B.; OLSEN, W. R. Functional domains of GABA<sub>A</sub> receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 162-168, 1995.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of Antiepileptic Drugs. **Neuro Therapeutics**, v. 4, p. 12–17, 2007.

STEFAN, H.; FEUERSTEIN, T. J. Novel anticonvulsant drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 165–183, 2007.

STEINBACH, J. H.; AKK, G. Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor channel gating by pentobarbital. **Journal of Physiology**, v. 537, p. 715-733, 2001.

STOCKS, J.; GUTTERIDGE, J. M.; SHARP, R. J.; DORMANDY, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 47, n. 3, p. 215-222, 1974.

STRUZYNSKA, L.; SULKOWSKI, G. Relationships between glutamine, glutamate, and GABA in nerve endings under Pb-toxicity conditions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 951-958, 2004.

SUZDAK P. D.; JANSEN, J. A. A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor. **Epilepsia**, v. 36, p. 612-626, 1995.

SUZUKI, T.; INAYAMA, M.; MISAWA, M. The effect of diazepam on exploratory behavior and its strain differences in inbred rats. **Japanese Journal of Psychopharmacology**, v. 10, p. 307–314, 1990.

SZABADICS, J.; ERDELYI, L. Pre- and postsynaptic effects of eugenol and related compounds on *Helix pomatia* L. neurons. **Acta biologica Hungarica**, v. 51, p. 265–273, 2000.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, p. 21–29, 1998.

TAYLOR, D. One Hundred Years of Epilepsy Surgery: Sir Victor Horsley's Contribution. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 49(5), p. 485-488; 1986.

TAYLOR; D. M., SM. Hughlings Jackson's Dr Z: the paradigm of temporal lobe epilepsy revealed. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 43(9), p.758-767, 1980.

TEPE, B.; AKPULAT, H. A.; SOKMEN, M.; DAFERERA, D.; YUMRUTAS, O. ; AYDIN, E.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. **Food Chemistry**, v.97, p. 719–724, 2006.

THAKUR, V. D.; MENGI, S. A. Neuropharmacological profile of *Eclipta alba* (Linn.) Hassk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 23–31, 2005.

THAVENDIRANATHAN, P.; CHOW, C.; CUNNANE, S.; BURNHAM, W. M. The effect of the 'classic' ketogenic diet on animal seizure models. **Brain Research**, v. 959, p. 206–213, 2003.

TREVAN, J. W. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 101, p. 403-514, 1927.

UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, p. 383-390, 2001.

UPTON, N. Mechanisms of action of new antiepileptic drugs: rational design and serendipitous findings. **Trends Pharmacology Science**, v. 15, p. 456-463, 1994.

VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, N. M.; SALES, G. T. M.; CUNHA, G. M. A.; AGUIAR, L. M. V.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. C. P.; MACEDOA, D. S.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, C.; VIANA, G. S. B. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 271–274, 2007.

VIANA, G. S. D.; VALE, T. G.; SILVA, C. M. M.; MATOS, F. J. D. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1314-1317, 2000.

VIANA, C. C. S.; OLIVEIRA, P. A.; SILVA BRUM, L. F.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. **Life Sciences**, v. 80, p. 1014–1019, 2007.

VIDA, J. A. Anticonvulsants. In: **Principles Medicinal Chemistry. (eds Foye WO, Lemke TL, Williams DA)**. London: Williams and Wilkins, p. 182–198, 1995.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VAN VUUREN, S. F.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 271-277, 2005.

WALZ, R.; MOREIRA, J. C. F.; BENFATO, M. S.; QUEVEDO, J.; SCHORER, N.; VIANNA, M. M. R.; KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpina and kainic acid in wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 179-182, 2000.

WAXMAN, S. G. Voltage-gated ion channels in axons: localization, function and development. In: **The Axon: structure, function and pathophysiology**. Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Stys, P.K. (Eds.). New York: Oxford UP, p. 218–243, 1995.

WEGELIUS, K.; PASTERNAK, M.; HILTUNEN, J. O.; RIVERA, C.; KAILA, K.; SAARMA, M.; REEBEN, M. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. **European Journal of Neurosciences**, v. 10, p. 350–357, 1998.

WEI, X. Y.; YANG, J. Y.; WANG, J. H.; WU, C. F. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. **Journal of Ethnopharmacology** (2007), doi:10.1016/j.jep.2007.01.009

WHITE, H. S.; WOLF, H. H.; WOODHEAD, J. H.; KUPFERBERG, H. J. The National Institutes of Health Anticonvulsant Drug Development Program: screening for efficacy. **Advances in Neurology**, v. 76, p. 29–39, 1998.

WHITE, H. S. Comparative Anticonvulsant and Mechanistic Profile of the Established and Newer Antiepileptic Drugs. **Epilepsia**, v. 40, p. S2-S10, 1999.

WHITE, H. S. Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. **Epilepsia**, v. 44, p. 2–8, 2003.

WHO. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. World Health Organization, Manila, 1993.

WHO. **Atlas: Epilepsy Care in the World**. World Health Organization, Geneva, 2005.

WIE, M. B.; WON, M. H.; LEE, K. H.; SHIN, J. H.; LEE, J. C.; SUH, H. W.; SONG, D. K.; KIM, Y. H. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. **Neuroscience Letters**, v. 225, p. 93–96, 1997.



WILLIAMSON, E. M.; OKPAKO, D. T.; EVANS, F. J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. In: **Pharmacological Methods in Phytotherapy Research**. Chichester: John Wiley & Sons, Vol. I, Cap. 10, 1996.

WILLIAMSON, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F. J. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material**. Wiley, Chichester, 1996.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M.; RIVASI, M.; BRUSIANI, F.; LOSI, G.; PUIA, G.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Evidence that the beta-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 87–92, 2007.

ZIA, A.; SIDDIQUI, B. S.; BEGUM, S.; SURIA, A. Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, p. 33-39, 1995.

ZIS, A. P.; NOMIKOS, G. G.; DAMSMA, M.; FIBIGER, C. *In vivo* neurochemical effects of eletroconvulsive shock studies by microdialysis in the rat striatum. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 343-350, 1991.

# **ANEXOS**

**ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS DURANTE O  
PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DO DOUTORADO**

**ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODICO:  
“IL FARMACO”**

**ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODICO:  
“REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA”**

**MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NO  
PERÍODICO:  
“PHARMACOLOGY, BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR”**

# 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](#)