

REBECA SANTOS MARQUES DE CARVALHO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA CENTRAL DOS
EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO, DA FRAÇÃO BUTANÓLICA
E DO VERBASCOSÍDEO DE *Lippia alba* (MILLER) N. E. BROWN (FALSA
MELISSA) – VERBENACEAE.**

Florianópolis

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

REBECA SANTOS MARQUES DE CARVALHO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA CENTRAL DOS
EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO, DA FRAÇÃO BUTANÓLICA
E DO VERBASCOSÍDEO DE *Lippia alba* (MILLER) N. E. BROWN (FALSA
MELISSA) – VERBENACEAE.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thereza Christina
Monteiro de Lima**

Florianópolis

2006

MARQUES DE CARVALHO, Rebeca Santos. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (MILLER) N. E. Brown (falsa melissa) – Verbenaceae.** Florianópolis, 2006, 96 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Defesa: 16/02/2006

O presente trabalho investigou os possíveis efeitos centrais dos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico (EH), da fração butanólica (FB) e do verbascosídeo (VE) de *Lippia alba*. Camundongos adultos foram previamente tratados por via oral (v.o.) com EA, EH ou FB, ou via intracerebroventricular (i.c.v.) com VE; e 1 h (v.o.) ou 5 min. (i.c.v.) após, submetidos aos modelos: sono etéreo (SE), sono barbitúrico (SB), temperatura retal (TR), convulsões induzidas por pentilenotetrazol (CPTZ), labirinto em cruz elevado (LCE), rota-rod (RR), arame (AR) e suspensão pela cauda (TST); a fim de avaliar possíveis atividades sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e/ou antidepressiva. Todas as preparações testadas foram capazes de reduzir a TR dos animais (EA – 2 g/kg, EH – 0,3 e 1 g/kg, FB – 0,1 e 0,3 g/kg; VE – 0,12, 1,2 e 12 µg/sítio). Apenas FB (0,3 g/kg) e VE (0,12, 1,2 ou 12 µg/sítio) potencializaram o SB ou SE, respectivamente; e reduziram a letalidade (FB – 0,3 g/kg; VE - 12 µg/sítio) durante as CPTZ. No LCE, o VE reduziu o número de entradas nos braços fechados (0,12 e 12 µg/sítio), imersões de cabeça e comportamento de levantar (1,2 µg/sítio). Não observou-se efeito algum nos demais modelos e preparações testadas. O VE (12 µg/sítio) e o diazepam (1 mg/kg i.p.) foram capazes de produzir prejuízo no AR, indicando um sinergismo entre esses compostos.

Sugere-se um efeito depressor central para a FB e o VE extraído de *L. alba*, sendo que o VE parece contribuir para o efeito central da FB, embora mais estudos sejam necessários para elucidar este efeito e a possível correlação entre os outros constituintes da fração e esta substância.

“A droga que melhor altera a mente é a verdade”

Lily Tomlin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram possível meu ingresso, minha permanência e a conclusão deste curso de Pós-Graduação, seja por seu apoio, conhecimentos transmitidos, confiança, paciência e companheirismo. Meu sincero agradecimento!

Em especial:

Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima;

Dra. Mareni Rocha Farias;

Dr. Jorge Alexandro Palermo;

Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões;

Dra. Gina Struffaldi Morato;

Dr. Jamil Assreuy;

Dr. Antônio de Pádua Carobrez;

Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau;

Dra. Mariana Graciela Terenzi;

Dra. Maria Marta Campos;

A todos os professores da Coordenadoria de Farmacologia;

Às secretárias Diana Lenzi, Rita Maria e Maria Goretti;

À técnica Sandra;

À equipe dos Biotérios Central e Setorial, em particular M.Sc. Marco Antônio Lorenzo, Joanésia, Pedro, Redma e aos camundongos;

À equipe do Laboratório de Farmacognosia: M.Sc. Melissa Mancini e Roberto Pertile;

Às equipes dos Laboratórios de Psico e Neurofarmacologia: M.Sc. Filipe Silveira Duarte, Ismael Fernando Nunes, José Inácio Lemos, Aline A. Foppa, M.Sc. Ana Valquíria Calixto, M.Sc. Lígia Moreiras Sena, M.Sc. Marcelo Duzzioni, Fernanda Kokowicz Pilatti, Gilliard Lach.

Às instituições de fomento à pesquisa, particularmente à CAPES;

Aos amigos Josiane e Davi Pinheiro;

À minha “grande” família: Wanja, Theodoro, Raquel e Frederico Santos Marques de Carvalho e Analice Vieira Morais; e à minha “pequena” família: Mila e Sérgio Ramos. A vocês dedico esta dissertação.

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA CENTRAL DOS EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO, DA FRAÇÃO BUTANÓLICA E DO VERBASCOSÍDEO DE *Lippia alba* (MILLER) N. E. BROWN (FALSA MELISSA) – VERBENACEAE.

O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos centrais dos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico (EH), da fração butanólica (FB) e do verbascosídeo (VE) de *Lippia alba*. Camundongos adultos foram tratados por via oral (v.o., 1 h) com o EA, EH ou FB, ou por via intracerebroventricular (i.c.v., 5 min) com VE e avaliados no sono etéreo (SE), sono barbitúrico (SB), temperatura retal (TR), convulsões induzidas por pentilenotetrazol (CPTZ), labirinto em cruz elevado (LCE), teste do rota-rod (RR), teste do arame (AR) e teste de suspensão pela cauda (TST) para avaliar possíveis atividades sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante ou antidepressiva. Os resultados mostraram que no modelo da TR todas as preparações testadas produziram hipotermia significativa em pelo menos uma das doses testadas (EA - 2 g/kg, EH - 0,3 e 1g/kg, FB - 0,1 e 0,3 g/kg; VE - 0,12, 1,2 e 12µg/sítio). Nos demais modelos comportamentais apenas o tratamento com a FB (0,3 g/kg) ou VE (0,12, 1,2 e 12µg/sítio) foram capazes de potencializar o SB ou SE, respectivamente; reduzir a letalidade (FB - 0,3 g/kg; VE - 12 µg/sítio) durante as convulsões induzidas por PTZ. No LCE, apenas o VE reduziu o número de entradas nos braços fechados (0,12 e 12µg/sítio), as imersões de cabeça e comportamentos de levantar (1,2 µg/sítio). No entanto, não foi observado efeito algum nos testes do RR, AR ou TST para todas as preparações testadas. O tratamento com VE (12µg/sítio) e DZP (1 mg/kg i.p.) foi capaz de produzir prejuízo no AR, indicando um provável efeito sinérgico entre os compostos. Os resultados obtidos sugerem um efeito depressor central para a FB e o VE de *L. alba*, sendo que o VE parece contribuir para o efeito da FB. Outros estudos devem ser conduzidos no intuito, tanto de isolar e testar mais substâncias desta espécie, como de elucidar os mecanismos envolvidos nos seus efeitos centrais.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE CENTRAL ACTIVITY OF THE AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS, BUTANOLIC FRACTION AND THE ACTIVE PRINCIPLE VERBASCOSIDE OBTAINED FROM *Lippia alba* (MILLER) N.E. BROWN (FALSA MELISSA) – VERBENACEAE.

In the present work we have studied the central activity of the aqueous (EA) and ethanolic extract (EH), the butanolic fraction (FB) or the active principle verbascoside (VE) obtained from *Lippia alba*. Adult mice were treated by p.o. (EA, EH, FB) or i.c.v. route (VE) and after 1 h or 5 min., respectively, they were submitted to several validated experimental models such as the barbiturate-induced sleeping (SB), ether-induced sleeping (SE), rectal temperature (TR), pentylenetetrazol-induced convulsions (PTZ), elevated plus-maze (LCE), rota-rod (RR), wiring (AR) and tail suspension tests (TST) to evaluate the putative sedative, anxiolytic, anticonvulsant and antidepressant-like effects. All preparations used (EA – 2 g/kg, EH – 0.3 or 1 g/kg, FB – 0.1 or 0.3 g/kg; VE – 0.12, 1.2 or 12 µg/site) have shown a significant effect at least in one of the doses used in the TR. In other models, only FB (0.3 g/kg) and VE (0.12, 1.2 e 12 µg/site) increased the duration of the barbiturate- or the ether-induced sleeping time, respectively; and reduced the lethality of convulsions induced by PTZ (FB – 0.3 g/kg; VE - 12 µg/site). In the LCE, only VE reduced the entries into the enclosed arms (0.12 or 12 µg/site), head-dipping and rearing (1.2 µg/site). However, no effects were observed in the RR, AR or TST, for all preparations. On the other hand, treatment with VE (12 µg/site) and DZP (1 mg/kg i.p.) have impaired the animals' performance in the horizontal-wire test, showing a synergistic effect on this model. Our results suggest a sedative effect for the butanolic fraction of *L. alba* as well as for its isolated substance verbascoside. Thus, the VE might be important to the central depressant effect of FB. However, further experiments are needed to isolate and testing its other active principles and to understanding the underlying mechanism of action for the central effects of *L. alba*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto das folhas e inflorescências da <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Br.....	2
Figura 2	Distribuição geográfica da <i>L. alba</i>	3
Figura 3	Estrutura molecular do verbascosídeo isolado de <i>Lippia alba</i>	13
Figura 4	Representação esquemática da partição da solução extrativa com solventes em ordem crescente de polaridade.....	22
Figura 5	Representação do processo de isolamento de substâncias a partir da FB.....	23
Figura 6	Latência e duração do sono induzido por barbitúrico, 1 h após o tratamento com o EA de <i>Lippia alba</i>	39
Figura 7	Latência e duração do sono induzido por barbitúrico, 1 h após o tratamento com o EH de <i>Lippia alba</i>	40
Figura 8	Latência e duração do sono induzido por barbitúrico, 1 h após o tratamento com a FB de <i>Lippia alba</i>	41
Figura 9	Duração do sono induzido por barbitúrico, 5 min após o tratamento com o VE de <i>Lippia alba</i>	42
Figura 10	Latência e duração do sono induzido por éter 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	44
Figura 11	Latência e duração do sono induzido por éter, 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	45
Figura 12	Variação de Temperatura retal (°C) 1 h após o tratamento com o EA de <i>L. alba</i>	47
Figura 13	Variação de Temperatura retal (°C) 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	47
Figura 14	Variação de Temperatura retal (°C) 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	48
Figura 15	Variação de Temperatura retal (°C) 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	48

Figura 16	Latência e duração da primeira convulsão durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	50
Figura 17	Severidade das convulsões e letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	51
Figura 18	Latência e duração da primeira convulsão durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	52
Figura 19	Severidade das convulsões e letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	53
Figura 20	Latência e duração da primeira convulsão durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	54
Figura 21	Severidade das convulsões e letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	55
Figura 22	Latência e duração da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	57
Figura 23	Latência e duração da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	58
Figura 24	Latência e duração da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	59
Figura 25	Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do LCE, 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	61
Figura 26	Comportamentos observados no LCE, 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	62
Figura 27	Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do LCE, 1 h após o tratamento com a	

	FB de <i>L. alba</i>	63
Figura 28	Comportamentos observados no LCE, 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	64
Figura 29	Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do LCE, 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	65
Figura 30	Comportamentos observados no LCE, 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	66
Figura 31	Tempo de permanência na barra giratória do rota-rod, 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	68
Figura 32	Porcentagem de êxito no teste do arame, 1 h após o tratamento com o EH de <i>L. alba</i>	68
Figura 33	Tempo de permanência na barra giratória do rota-rod, 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	69
Figura 34	Porcentagem de êxito no teste do arame, 1 h após o tratamento com a FB de <i>L. alba</i>	69
Figura 35	Tempo de permanência na barra giratória do rota-rod, 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	70
Figura 36	Porcentagem de êxito no teste do arame, 5 min após o tratamento com o VE de <i>L. alba</i>	70
Figura 37	Representação do protocolo de sinergismo VE e DZP.....	71
Figura 38	Desempenho no teste do arame, após o tratamento com o diazepam 1 mg/kg i.p. (DZP 1), verbascosídeo 12 µg/sítio i.c.v. (VE), VE e DZP 1, ou diazepam 1,5 mg/kg (DZP 1,5).....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resumo dos estudos farmacológicos da atividade central de <i>Lippia alba</i>	6
Quadro 2	Resumo dos estudos farmacológicos do verbascosídeo.....	16
Quadro 3	Resultados obtidos nas colunas de fracionamento das sub-frações isoladas da fração butanólica.....	25
Quadro 4	Grau de severidade atribuído ao comportamento, no modelo das convulsões induzidas por PTZ.....	33
Quadro 5	Quadro resumo dos resultados obtidos nos experimentos.....	73

LISTA DE ABREVIÇÕES

AR	Modelo do arame
CCD	Cromatografia em camada delgada
CPTZ	Modelo das convulsões induzidas por cloridrato de pentilenotetrazol
DZP	Diazepam
EAB	Entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado
ECM	Eletrochoque transcorneal máximo
EF	Entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado
FB	Fração butanólica de <i>Lippia alba</i>
EA	Extrato aquoso de <i>Lippia alba</i>
EH	Extrato hidroalcoólico de <i>Lippia alba</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
i.c.v.	Via intracerebroventricular
IMI	Imipramina
i.p.	Via intraperitoneal
kg	Quilograma
LCE	Labirinto em cruz elevado
mg	Miligramma
NO	Óxido nítrico
PTZ	Cloridrato de pentilenotetrazol
RR	Modelo do rota-rod
SB	Modelo do sono barbitúrico
SE	Modelo do sono etéreo
SNC	Sistema nervoso central
TA	Tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado
TF	Tempo de permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado
TR	Modelo da temperatura retal
TST	Modelo da suspensão pela cauda
µg	Microgramma
VE	Verbascosídeo
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	<i>Lippia alba</i>.....	3
1.1.1	Composição química da <i>Lippia alba</i>	4
1.1.2	Atividades Farmacológicas da <i>Lippia alba</i>	5
1.1.2.1	Atividades no SNC.....	7
1.2	Verbascosídeo.....	12
2	OBJETIVOS.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Obtenção dos Extratos Vegetais/ Substância isolada.....	19
3.1.1	<i>Reagentes, solventes e soluções</i>	19
3.1.2	<i>Material botânico</i>	20
3.1.2.1	Coleta do material.....	20
3.1.2.2	Preparação dos extratos.....	20
3.2	Avaliação da Atividade Farmacológica.....	26
3.2.1	<i>Animais</i>	26
3.2.2	<i>Fármacos e soluções</i>	27
3.2.2.1	Preparação dos fármacos.....	28
3.2.2.2	Administração dos fármacos.....	28
3.2.3	<i>Procedimentos experimentais e equipamentos</i>	29
3.2.3.1	Sono barbitúrico.....	29
3.2.3.2	Sono etéreo.....	30
3.2.3.3	Temperatura retal.....	31
3.2.3.4	Convulsões induzidas por pentilenotetrazol.....	31
3.2.3.5	Teste da suspensão pela cauda.....	33
3.2.3.6	Labirinto em cruz elevado.....	33
3.2.3.7	Rota-rod.....	35
3.2.3.8	Teste do arame.....	36

3.2.4	<i>Análise estatística</i>	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Atividade hipno-sedativa	38
4.1.2	Hipnose induzida por pentobarbital	38
4.1.3	Hipnose induzida por éter etílico	43
4.2	Temperatura retal	46
4.3	Atividade anticonvulsivante	49
4.4	Atividade antidepressiva	56
4.5	Atividade ansiolítica	60
4.6	Atividade sedativa/ relaxante muscular	67
4.7	Efeito sinérgico do VE e DZP	71
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

As plantas são usadas desde tempos remotos para curar e promover o alívio de doenças, tendo sido consideradas a fonte mais importante de medicamentos para o ser humano. No século vinte, a partir da década de quarenta, esta antiga forma de terapia começou a perder importância e a ser substituída gradativamente por medicamentos sintéticos, sendo esquecida e apontada por alguns como “não-científica”. Por outro lado, o uso tradicional, folclórico ou popular de inúmeras espécies vegetais conduziu pesquisadores a buscar substâncias com propriedades terapêuticas. Estima-se que cerca de 25 % das drogas comercializadas atualmente foram direta ou indiretamente originadas de plantas (DE SMET, 1997), sendo algumas com atividade no Sistema Nervoso Central (SNC), tais como cafeína, epinefrina, canabinóides, opióides e reserpina. No entanto, na maioria das plantas com atividade no SNC, as substâncias ativas ainda não são conhecidas ou se encontram em fase de testes, com definição do perfil farmacológico de extratos brutos, estando distantes de provar a eficácia e segurança dessas preparações e compostos para o uso humano (CARLINI, 2003).

Dentre as plantas como tendo atividade central, encontra-se a *Lippia alba* (Miller) (figura 1), planta popularmente conhecida como falsa melissa, erva-cidreira, melissa, alecrim-do-campo, sálvia e sálvia-da-gripe (PIO CORREA, 1984). As suas folhas são usadas na medicina popular, na forma de chá, xarope e para inalação, como sedativas, estomáquicas, antiespasmódicas e, no sul do Brasil, principalmente em estados gripais (PASCUAL, 2001b). O chá das folhas é também amplamente utilizado na medicina popular como tranqüilizante e para disfunções gastrintestinais (MENTZ et al., 1992; PIO CORREA, 1984).

Há poucos trabalhos que demonstrem a atividade farmacológica desta espécie. A maioria dos estudos enfoca as atividades antimicrobiana, repelente e o efeito larvicida do óleo volátil e de diferentes extratos preparados a partir de diversas espécies de *Lippia*, e os trabalhos de isolamento de substâncias e de estudos detalhando seus efeitos farmacológicos são escassos, fazendo-se necessária uma maior investigação científica para se validar o uso popular da planta (PASCUAL, 2001b). Os principais trabalhos desenvolvidos até o momento avaliando seus efeitos centrais encontram-se publicados, em sua maioria, como resumos em congressos e não elucidam

completamente os efeitos da *Lippia alba* no SNC, embora existam evidências de suas atividades sedativa e anticonvulsivante (DE LIMA et al., 2001; SOARES, 2001; ZÉTOLA et al., 2002). Faltam trabalhos, portanto, que identifiquem as frações biologicamente ativas e os constituintes responsáveis pelos efeitos centrais.



Figura 1 – Aspecto das folhas e inflorescências da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Foto: Marení Farias).

1.1 *Lippia alba*

Pertencente à família Verbenaceae, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. é uma espécie originária da América do Sul, ocorrendo em todo o Brasil (CORRÊA, 1992; MENTZ et al., 1992), habitando as regiões tropicais e sub-tropicais, estando também amplamente distribuída no México, América Central, América do Sul tropical e subtropical até a Argentina (figura 2) (GUPTA, 1995). Esta espécie está sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas, em função do meio ambiente onde se encontra (CORRÊA, 1992; GOMES et al., 1993).

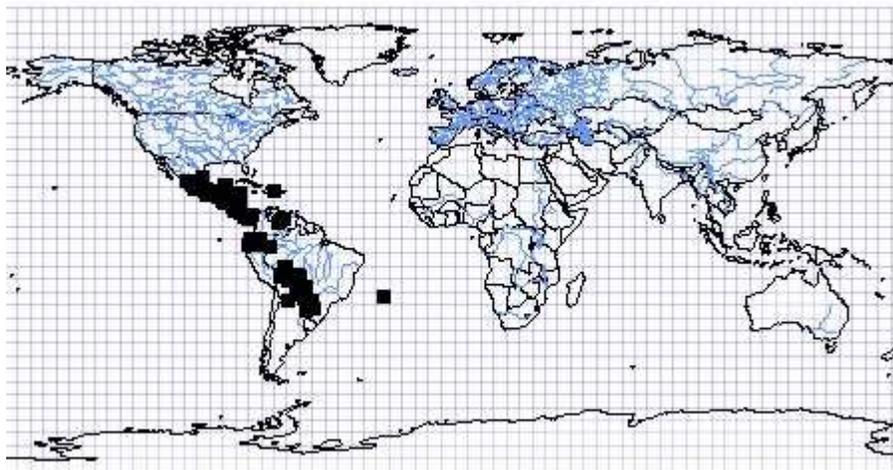


Figura 2 – Distribuição geográfica da *L. alba* (MISSOURI, 2006)

A literatura cita diversas sinonímias para a *Lippia alba*: *Lantana alba* Mill., *L. geminata* (H.B.K.) Spreng., *L. lavandulacea* Willd., *L. lippoides* Hook & Arn., *L. mollissima* Desf., *Lippia asperifolia* A. Rich., *L. citrata* Cham., *L. crenata* Sessé & Moc., *L. geminata* H.B.K., *L. havannensis* Turcz., *L. panamensis* Turcz., *Verbena globiflora* L'Her., *V. odorata* (Pers.) Steud., *Zapania globiflora* (L'Her) Willd., *Z. lantanoides* Lam., *Z. odorata* Pers. e *Z. odoratissima* Scop. (GUPTA, 1995).

Botanicamente, a *Lippia alba* é descrita como uma planta perene, erecta, arbustiva, alcançando até 2 m de altura e com odor característico de limão ou menta. Suas folhas são opostas e alternadas, ovaladas e oblongas, 2-7 cm de comprimento, com margens serrilhadas. As inflorescências são axilares, solitárias e raras vezes ocorrem aos pares,

corolas de coloração variando do azul ao rosado, lilás ou violeta, podendo também ser branca ou amarelada na superfície interna (GUPTA, 1995).

No Brasil, várias espécies do gênero *Lippia* são utilizadas na medicina popular (CRAVEIRO, 1981). A *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* constaram da primeira lista de plantas medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde, como espécies a serem investigadas quanto aos seus efeitos farmacológicos e toxicológicos e à sua composição química. Com relação aos usos para a planta, até o momento, não foram encontradas referências científicas suficientes para comprovar sua eficácia e utilização segura para todas as indicações populares.

1.1.1 Composição química da *Lippia alba*

Encontram-se na literatura alguns trabalhos buscando identificar e isolar substâncias de espécies de *Lippia*, como o linalol, presente no óleo volátil e um dos mais importantes compostos na indústria de flavorizantes (MACAMBIRA et al., 1986; SIANI et al., 2002). Estudos sobre o gênero destacam a presença de constituintes do óleo volátil e de compostos flavonoídicos (SOARES, 2001; SIANI et al., 2002; TAVARES et al., 2005; THOMAS-BARBERÁN et al., 1987). A constituição dos óleos voláteis de espécies de *Lippia* tem sido estudada por alguns grupos brasileiros (CRAVEIRO, 1981b; MATOS, 1994; TAVARES et al., 2005) e a utilização de técnicas cromatográficas permitiu isolar seus componentes. Em uma espécie de *Lippia* colombiana foram identificados predominantemente: carvoneno, limoneno e β -bourboneno, além de outros compostos em menor proporção (STASHENKO, 2004). No Brasil, já foi identificada uma série de constituintes (CRAVEIRO et al., 1981a; TAVARES et al., 2005) do óleo volátil nas espécies do gênero *Lippia* e, especificamente na *Lippia alba*, linalol, limoneno, geranial, geraniol, carvona, β -cariofileno, piperitona, p-cimeno, citral, mirceno e γ -terpineno, dentre outros. Também se verificou a presença de saponinas (GOMES et al., 1990 e 1993). Estudos fitoquímicos preliminares detectaram a presença de ácidos fixos, compostos aminados, esteróides e/ou triterpenos, fenóis e heterosídeos antociânicos (GOMES et al., 1993), sem, entretanto, fornecer informações sobre o isolamento destes compostos.

1.1.2 Atividades Farmacológicas da Lippia alba

Têm-se buscado elucidar as atividades farmacológicas da *Lippia alba* e, até o momento, já foram demonstradas ações analgésica (COSTA, 1989; SOARES, 2001), protetora de mucosa gástrica (PASCUAL et al., 2001a), antioxidante (STASHENKO, 2004) e antimicrobiana (SOARES, 2001; HOLTEZ et al., 2002; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005), conforme descrito mais detalhadamente abaixo. Além de vários efeitos no Sistema Nervoso Central (quadro 1).

Atividades da <i>Lippia alba</i> sobre o SNC				
Preparação Testada	Doses e vias	Modelos	Efeito	Referências
Extrato Aquoso	30, 100 e 300 mg/Kg, v.o. e i.p.	C. A., Rota-rod, Sono barbitúrico, LCE, T.R.	Sedativo (i.p.)	KLUEGER et al., 1997
Infuso	30 mg/Kg, i.p.	C. A., Rota-rod, Sono barbitúrico, LCE	Depressor do SNC	KLUEGER et al., 1996
	30, 100 e 300 mg/Kg, v.o. e i.p.	C. A., Rota-rod, Sono barbitúrico, LCE, T.R.	Depressor do SNC (i.p. e v.o.)	KLUEGER et al., 1997
Destilado	30 mg/Kg, i.p.	C.A., LCE	Sem efeito	KLUEGER et al., 1996
	30, 100 e 300 mg/Kg, v.o. e i.p.	C. A., Rota-rod, Sono barbitúrico, LCE, T.R.	Sem efeito	KLUEGER et al., 1997
Óleos Voláteis (quimiotipos I, II e III)	10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg, i.p.	Rota-rod, LCE, T.R.	Ansiolítico e sedativo	VALE et al., 1999
	50, 100, 200, 400, 800 mg/Kg, i.p. e v.o.	Convulsões induzidas por PTZ	Anticonvulsivante	VIANA et al., 2000
Constituintes dos óleos voláteis (citral, mirceno e limoneno)	5, 25, 50, 100, 200 mg/ kg, i.p.	C.A., LCE, Sono Barbitúrico	Relaxante muscular, sedativo, tipo ansiogênico	GURGEL DO VALE et al., 2002
Extrato Etanólico (40 %, 60 %, 80 % e/ou 90%)	100 e 200 mg/Kg, v.o.	C.A., LCE, Rota-rod, Sono barbitúrico, T.R.	Depressor do SNC,	SANTOS et al., 1998
	100, 200, 400 mg/Kg, v.o.	Convulsões induzidas por PTZ e ECM	Anticonvulsivante (PTZ e ECM)	SOARES, 2001
	200 mg/Kg, v.o.	Rota-rod, Sono barbitúrico, Convulsões induzidas por PTZ, T.R.	Sedativo, miorelaxante, anticonvulsivante	ZÉTOLA et al., 2002
Fração Butanólica	30, 100 e 300 mg/Kg, v.o. e i.p.	C.A., Rota-rod, Sono barbitúrico, LCE, T.R.	Sedativo (i.p.)	KLUEGER et al., 1997
	50, 100 mg/Kg	Convulsões induzidas por PTZ e ECM	Anticonvulsivante (PTZ)	SOARES, 2001
Subfrações (SBN4-C e SBN4-D)	0,025; 0,05 e 0,1 mg/Kg, v.o.	Convulsões induzidas por PTZ e ECM	Anticonvulsivante	DE LIMA et al., 2001
	0,025; 0,05 e 0,1 mg/Kg, v.o.	Convulsões induzidas por PTZ e ECM	Anticonvulsivante (PTZ)	SOARES, 2001

Quadro 1 - Resumo dos estudos farmacológicos da atividade central de *Lippia alba*

Ensaio sobre o potencial analgésico de plantas medicinais no Estado de São Paulo, mostraram que o tratamento com os extratos de folhas de *Lippia alba* (1 g/Kg), quando administrados v.o. a camundongos, eram eficazes na redução de contorções abdominais (*writhing test*) e da retirada da cauda (*tail flick test*) (COSTA et al., 1989). Em outro estudo utilizando o mesmo modelo, a solução hidroetanólica a 40 %, nas doses de 30 e 300 mg/Kg (v.o.), foi eficaz na redução de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, não apresentando, entretanto, resultados satisfatórios na dose intermediária de 100 mg/Kg. No modelo de dor induzida pela formalina, as soluções hidroetanólicas (40 e 80 %) não foram capazes de inibir as dores neurogênica, inflamatória e o edema de forma significativa (SOARES, 2001). O citral presente no óleo volátil tem sido referido como substância de ação levemente tranqüilizante e antiespasmódica (CRAVEIRO et al., 1988b). Além disso tem sido atribuído ao óleo volátil atividade antioxidante, com efeito similar ao do alfa-tocoferol (vitamina E) (STASHENKO, 2004).

Pascual e colaboradores (2001a) observaram, ainda, uma atividade protetora da mucosa gástrica (antiulcerogênica) para o infuso da planta, em ratos. Foi demonstrada também uma atividade antifúngica para cepas de *Cândida krusei*, embora não tenha sido relatado efeito sobre bactérias e demais cepas fúngicas testadas (HOLTEZ et al. 2002). Entretanto, Soares (2001) observou ação antimicrobiana utilizando a fração n-butanólica de soluções extrativas alcoólicas a 80 % (obtidas por maceração), o que foi confirmado por Andrighetti-Fröhner e colaboradores (2005) para ação anti-viral tanto com a fração n-butanol, como com a fração acetato de etila.

1.1.2.1 Atividades no SNC

No tocante aos efeitos produzidos no SNC, foram testadas desde preparações mais simples, como o infuso (KLUEGER et al., 1996, KLUEGER et al. 1997) até frações isoladas (SOARES, 2001; DE LIMA et al., 2001). Os testes descritos na literatura e que têm sido utilizados com frequência nesses trabalhos são: caixa de movimentação ou campo-aberto (CA, *open field*); labirinto em cruz elevado (LCE, *plus-maze*); rota-rod (RR); convulsão induzida por pentilenotetrazol (CPTZ) ou por eletrochoque trascorneal máximo (CECM); temperatura retal (TR) e o teste do sono induzido por barbitúrico (SB).

- Efeito no sono experimental e na coordenação motora:

A principal atividade descrita para a *L. alba* é a hipnosedativa. O infuso de *L. alba*, quando administrado a camundongos Suíços adultos fêmeas, na dose de 30 mg/Kg (i.p.), foi capaz de reduzir a ambulação dos animais e todos os parâmetros avaliados no LCE, além de aumentar o número de quedas e reduzir o tempo de permanência na barra giratória no teste do rota-rod. Mostrou-se, ainda, uma diminuição da latência para a indução e um aumento na duração do sono induzido por pentobarbital sódico (KLUEGER et al., 1996). Klueger e colaboradores, em 1997, confirmaram o efeito hipnosedativo administrando o infuso de *L. alba* a camundongos, nas doses de 30, 100 ou 300 mg/Kg, tanto por via oral como por via intraperitoneal. A dose de 300 mg/Kg i.p., reduziu drasticamente a locomoção no modelo do campo aberto e a latência para o sono barbitúrico, além de potencializar o sono e diminuir todos os parâmetros no LCE sem, porém, promover alterações nos parâmetros do rota-rod. Pela oral não foram observadas alterações na locomoção, ou seja, na atividade motora, mas verificou-se um aumento da duração do sono induzido por pentobarbital.

Nos experimentos com extrato aquoso, em camundongos Suíços adultos tratados por v.o. ou i.p. (doses de 30, 100 e 300 mg/Kg), não se verificou quaisquer alterações comportamentais para os parâmetros avaliados, enquanto que o tratamento, por via i.p. (300 mg/Kg), reduziu apenas a atividade locomotora no teste do campo-aberto (KLUEGER et al., 1997).

O destilado de *L. alba* administrado a camundongos (30, 100 e 300 mg/Kg, v.o.) não foi capaz de alterar qualquer parâmetro avaliado nos modelos do campo aberto, rota-rod e sono induzido por pentobarbital (KLUEGER et al., 1997). No entanto, na dose de 30 mg/Kg, via i.p., esta preparação reduziu a ambulação dos animais, 15 min após o tratamento, sem produzir qualquer outra alteração comportamental no modelo do LCE (KLUEGER et al., 1996).

Outros estudos foram realizados com o objetivo de verificar os efeitos do óleo volátil da *L. alba*. Vale e colaboradores (1999) relataram efeito sedativo nos modelos do campo aberto e rota-rod, quando testaram os óleos voláteis de três quimiotipos de *L. alba*, em doses que variaram de 50 a 200 mg/Kg, via i.p. Gurgel do Vale e colaboradores (2002) confirmaram esse efeito hipnosedativo e relaxante muscular

para os três constituintes do óleo volátil (citrinal, mirceno e limoneno), em doses que variaram de 5 a 200 mg/kg via i.p.

Para os extratos etanólicos a 40 %, 60 % e 80 %, Santos e colaboradores (1998) relataram atividade sedativa dos extratos a 40 % e 80 %, sendo que a preparação a 80 %, com maior concentração de flavonoídes, na dose de 200 mg/Kg v.o., foi capaz de aumentar o número de quedas no teste do rota-rod, ou seja, reduzir o tempo de permanência na barra giratória e aumentar a duração do sono barbitúrico, bem como reduzir a latência para a indução do sono. Zétola e colaboradores (2002) confirmaram estes resultados no modelo de sono barbitúrico para a fração a 80 %, indicando uma atividade sedativa desta preparação.

Na avaliação da atividade motora pelo modelo do rota-rod, a fração etanólica a 80 % produziu prejuízo motor nos animais, acentuando o número de quedas e reduzindo o tempo de permanência na barra giratória, confirmando a atividade sedativa e/ou miorrelaxante da espécie vegetal estudada. Segundo Zétola e colaboradores (2002), a ausência de compostos voláteis nesta fração parece indicar que compostos não voláteis seriam os responsáveis pelo efeito sedativo desse extrato líquido. Além disso, há correlação positiva entre o conteúdo de flavonóides e o efeito sedativo, indicando que, muito provavelmente, esse efeito seja devido à presença destes compostos. No entanto, não foi encontrada uma correlação linear entre o teor alcoólico da fração etanólica (40 %, 60 % ou 80 %) e o conteúdo total de flavonóides, embora este conteúdo tenha aumentado com o aumento da concentração de etanol na solução (ZÉTOLA et al., 2002).

Klueger e colaboradores (1997), testando a fração butanólica administrada por via oral em camundongos, não encontraram alterações na atividade locomotora no modelo do CA, mas houve prejuízo nesta atividade quando a fração foi administrada por via intraperitoneal; porém sem alterações comportamentais no rota-rod e sono barbitúrico, nas duas vias testadas.

- Efeito sobre a temperatura retal:

Segundo Zétola e colaboradores (2002), o tratamento agudo com as frações etanólicas de *L. alba* (v.o.) a 40, 60 e 80% não produziu alterações significativas na temperatura retal de camundongos. No entanto, Santos e colaboradores (1998) relataram uma

redução da T.R. (diferença de 2 graus centígrados entre grupos controle e tratados) em camundongos que receberam extratos etanólicos de *Lippia alba* a 40 % e 80 %.

- Efeito nas convulsões experimentais:

Em modelos experimentais de convulsão, foi descrito o efeito anticonvulsivante para os óleos voláteis de três quimiotipos de *Lippia alba*, nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, i.p., observando-se um aumento no tempo de latência para a primeira convulsão, quando comparados com o grupo controle. Além disso, animais tratados com citral (100 mg/Kg, i.p.), beta-mirceno ou limoneno (200 mg/Kg, i.p.), constituintes químicos presentes no óleo volátil da planta, também apresentaram um aumento da latência para a primeira convulsão e da porcentagem de sobrevivência, sendo que sua associação com o diazepam potencializou esse efeito, sugerindo que citral, beta-mirceno e limoneno seriam, provavelmente, os compostos ativos do óleo volátil (VIANA et al., 2000).

Para as frações etanólicas, foi observado um aumento da latência para a primeira convulsão, mas apenas a fração a 40 % o fez de forma significativa, quando comparada ao grupo controle, enquanto nenhuma das frações alterou a duração da primeira convulsão ou o número de convulsões. A fração etanólica a 80 % não demonstrou uma clara atividade anticonvulsivante, no modelo das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (ZÉTOLA et al., 2002). A atividade anticonvulsivante havia sido descrita por Soares (2001), no entanto, para a solução extrativa hidroalcoólica a 80 % (400 mg/Kg, v.o.) e a 90 % (200 mg/Kg e 400 mg/Kg), as quais reduziram a latência para a primeira convulsão.

Para a fração n-butanólica (50 e 100 mg/Kg) das soluções extrativas alcoólicas a 80 % (obtidas por maceração), já foi descrito uma atividade anti-convulsivante no modelo das convulsões induzida por PTZ, com redução significativa do número de convulsões (SOARES, 2001).

As subfrações SNB4-C e SNB4-D da fração n-butanólica foram testadas nos modelos de convulsão induzidos por PTZ (80 mg/Kg, sub-cutâneo) e eletrochoque trascorneal máximo (ECM - 60 Hz, 50 mA, 0.2 s), e produziram aumento da latência para a primeira convulsão, quando administradas por via oral. Os resultados foram mais claramente observados no modelo de convulsões induzidas por PTZ, onde o aumento

da latência para a primeira convulsão foi de até 115 % (SNB4-C na dose de 0,1 mg/Kg); estas subfrações atenuaram ainda a intensidade das convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal em até 20 % (DE LIMA et al., 2001). Esta atividade foi confirmada por Soares (2001), obtendo aumento da latência para a primeira convulsão e diminuição do número de convulsões, sendo estes efeitos significativos em doses mais baixas (0,025 e 0,05 mg/Kg); e os resultados das convulsões no modelo de ECM não foram tão evidentes quanto os do PTZ.

- Efeito na ansiedade experimental:

Experimentos com o infuso (30, 100 ou 300 mg/kg v.o.) não mostraram qualquer atividade ansiolítica desta preparação (KLUEGER et al., 1997), sendo o mesmo observado para o destilado no modelo do LCE (KLUEGER et al., 1996; KLUGER et al., 1997).

Segundo Vale e colaboradores (1999), os óleos voláteis de três quimiotipos de *L. alba* (doses que variaram de 50 a 200 mg/Kg, via i.p.) apresentaram efeitos do tipo ansiolítico no modelo do LCE. No entanto, o mesmo grupo (GURGEL DO VALE et al. 2002) não observou qualquer efeito ansiolítico; pelo contrário, foi observada uma tendência a um efeito do tipo ansiogênico, nas doses mais elevadas, para os três constituintes do óleo volátil (citral, mirceno e limoneno), em doses que variaram de 5 a 200 mg/kg por via i.p.

Para o extrato hidroalcoólico a 80 % foi descrita atividade ansiolítica: onde o tratamento, na dose de 200 mg/Kg v.o. foi capaz de aumentar a frequência de entradas nos braços abertos no LCE (SANTOS et al. 1998). Em contraste, para a fração butanólica (v.o. e i.p., em camundongos), não foi encontrada qualquer atividade ansiolítica no modelo do LCE (KLUEGER et al., 1997).

- Efeitos gerais no SNC:

Klueger e colaboradores (1996) propuseram que *L. alba* possui uma atividade depressora inespecífica do SNC, que poderia ser decorrente, possivelmente, de uma ação fisiológica periférica, como hipotensão e/ou hipotermia, o que já foi descrito para outras espécies vegetais. Entretanto, Guerrero e colaboradores (2002) realizaram

ensaios *in vivo* e *in vitro* para verificar uma possível ação vasodilatadora e anti-hipertensiva de plantas usadas na medicina popular colombiana e relataram que o extrato etanólico de *Lippia alba*, administrado em *bolus* intravenoso, não foi capaz de reduzir a pressão arterial média de ratos Wistar normotensos anestesiados ou ratos hipertensos anestesiados, embora tenha promovido uma redução da resposta contrátil ao cloreto de potássio e à fenilefrina, em anéis intactos de aorta de ratos. Como citado anteriormente, para Zétola e colaboradores (2002) há uma correlação entre o conteúdo de flavonóides dos extratos hidroalcoólicos e seu efeito sedativo, indicando que, muito provavelmente, esse efeito seja devido à presença destes compostos. Os constituintes químicos presentes no óleo volátil da planta, tais como citral, beta-mirceno e limoneno, os quais demonstraram atividade anticonvulsivante, são provavelmente os compostos ativos (VIANA et al., 2000) e poderiam contribuir para outras ações centrais das preparações de *L. alba*.

Em conclusão, embora existam evidências de uma atividade sedativa e anticonvulsivante para preparações de *Lippia alba*, faltam trabalhos que identifiquem inequivocamente as frações biologicamente ativas e que elucidem constituintes da planta responsáveis pelos efeitos centrais, razão da proposição do presente trabalho.

1.2 Verbascosídeo

O gênero *Lippia* apresenta uma variedade de derivados do ácido caféico, e um desses derivados, o verbascosídeo (ou acteosídeo), já foi identificado em *L. dulcis* (Trevir.), *L. multiflora* (Moldenke) e em *L. triphylla* (L'Hér.) (para revisão ver PASCUAL *et al.*, 2001b). Numa análise quantitativa da fração butanólica (FB) de *L. alba*, foram descritas quatro substâncias majoritárias: duas das quais já foram identificadas: uma saponina e o fenilpropanóide verbascosídeo (figura 3). Pelo fato da espécie *L. alba* ainda ter a identidade de suas substâncias ativas desconhecidas, foi proposto, inclusive, que este último constituinte majoritário seja usado como marcador fitoquímico para a espécie, uma vez que se encontra presente na planta de forma constante, não apresentando variações sazonais (MANCINI, 2005).

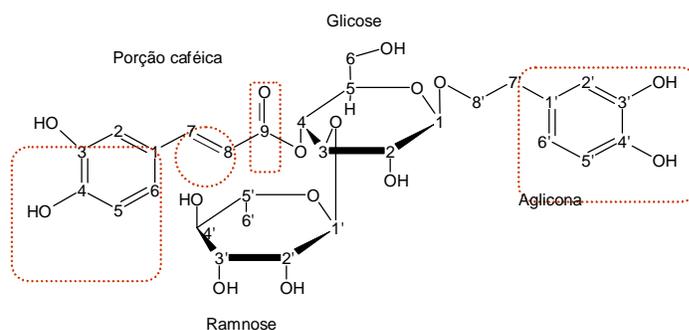


Figura 3 - Estrutura molecular do verbascosídeo isolado de *Lippia alba*. (MANCINI, 2005).

Os feniletanóides pertencem à classe dos polifenóis hidrossolúveis amplamente distribuídos nas plantas medicinais. O verbascosídeo, também denominado acteosídeo, é um glicosídeo feniletanóide já isolado e descrito em diversas espécies vegetais comumente utilizadas, sendo algumas com fins terapêuticos, dentre as quais estão: *Castilleja linariaefolia* (PETTIT *et al.*, 1990), *Lantana camara* (HERBERT *et al.*, 1991), *Pedicularis lasiophrys* (JIA *et al.*, 1992), *Euphrasia pectinata* (ERSÖZ *et*

al., 2000), *Stachytarpheta cayennensis* (SCHAPOVAL et al., 1998), *Stachys officinalis* (MIYASE, et al., 1996), *Plantago lanceolata* L. (TAMURA & NISHIBE, 2002), *Ballota nigra* (DAELS-NAKOTOARISON et al., 2000), *Asystasia intrusa* (KANCHANAPOOM et al., 2004), *Ligustrum purpurascens* (TAM et al., 2002), *Buddleja officinalis* (SHENG et al., 2002), *Olea europaea* (OWEN et al., 2003). No gênero *Lippia*, além da *Lippia alba* (MANCINI, 2005), já foi descrito nas espécies *Lippia canescens* (ABE et al., 2002) e *Lippia dulcis* (KANEDA et al., 1992; ABE et al., 2002).

A literatura tem atribuído à esta substância, múltiplas atividades biológicas: antioxidante (WONG et al., 2001); citoprotetora (SHENG et al., 2002; LIU et al., 2003; LI et al., 1999; PU et al., 2003); antimetastásica (OHNO et al., 2002) e antiproliferativa (ABE et al., 2002; PETTIT et al., 1990), além de antiinflamatória (SCHAPOVAL et al., 1998).

Mais especificamente, quanto aos efeitos cardiovasculares, o verbascosídeo, na dose de 1 mM, foi capaz de aumentar a frequência cardíaca, força de contração, assim como os níveis de monofosfato de adenosina cíclico *in vitro* (PENNACCHIO et al., 1996). Lau e colaboradores (2004) descreveram que, na concentração de 30 µM, o verbascosídeo reduziu o relaxamento endotelial dependente de óxido nítrico (NO), induzido pela acetilcolina, bem como os níveis de GMPc induzido pela acetilcolina, em anéis de aorta de ratos *in vitro*. No entanto, a exposição aguda ao verbascosídeo parece não afetar a expressão de RNAm para eNOS em anéis com endotélio vascular intacto. O VE prejudica parcialmente o relaxamento endotelial aórtico promovido pelo NO através da inibição da produção de NO dependente de cálcio e da redução da mobilização de cálcio endotelial dependente de agonista, e subsequente supressão da formação de GMP, podendo este efeito contribuir para a atividade antiinflamatória descrita para este composto. Tam e colaboradores (2002) demonstraram que o verbascosídeo, nas concentrações de 3-50 µmol/L, acentua a resposta contrátil à fenilefrina, de forma concentração dependente, em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos, principalmente através da inibição da produção/liberação endotelial de NO e inibição da ativação de canais de K⁺ mediadas por NO, sendo este efeito abolido em anéis desprovidos de endotélio, o que sugere que esteja no endotélio o alvo de ação do verbascosídeo. Concentrações mais altas (100-300 µmol/L) não alteraram as contrações induzidas pela fenilefrina, uma vez que o verbascosídeo *per*

se, nesta concentração, promove um efeito vasodilatador, o que anula seu efeito sobre o endotélio; este mesmo trabalho não aponta a guanilato ciclase como alvo da ação do verbascosídeo.

No tocante aos efeitos antioxidante e citoprotetor, o verbascosídeo (10-20 μM) foi efetivo em prevenir a oxidação induzida por radicais livres (WONG et al., 2001). Possivelmente, sua atividade seqüestradora de radicais livres poderia ser a responsável pelo efeito citoprotetor, o qual é mais eficiente que alguns antioxidantes de referência, como o alfa-tocoferol, vitamina C, probucol e resveratrol (CHIOU et al., 2004). Lee e colaboradores (2004) investigaram seu efeito protetor na hepatotoxicidade experimental em camundongos. O pré-tratamento com o VE, via i.p., na dose de 10–50 mg/kg, a cada 24 h por 3 dias, evitou o aumento da atividade das enzimas alanina e aspartato aminotransferase, de forma dependente da dose. Além disso, o pré-tratamento com esta substância resultou em diminuição significativa do nível de proteínas P450 2E1, efeito antioxidante na peroxidação lipídica induzida pelo ascorbato- FeCl_2 em homogenatos de fígado, e na atividade oxidativa dos radicais superóxido. O possível mecanismo protetor da hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono poderia envolver mecanismos relacionados à sua capacidade de prevenir a bioativação do tetracloreto de carbono mediada por P450 2E1, reduzindo a formação de radicais triclorometil; e de sua atividade antioxidante em combinação com sua capacidade seqüestradora de radicais livres, e inibidora da peroxidação lipídica, todas elas capazes de impedir a lesão hepática (LEE et al., 2004). Zhou e Zheng (1991) também relataram a forte atividade seqüestradora de radicais superóxido, e inibição da peroxidação lipídica em microsomas de fígado de camundongos na concentração de 10 μM ; os autores sugeriram, ainda, que os compostos fenólicos poderiam suprimir a ação de radicais livres em dois estágios: a formação de anions superóxido e da peroxidação lipídica.

Experimentos *in vivo* demonstraram que, na concentração de ED_{50} de 2.6 microgramas/ml, o verbascosídeo apresentou uma atividade citotóxica contra células da leucemia linfocítica murina P-388 (PS) (PETTIT et al., 1990).

Alguns trabalhos investigaram a atividade molecular deste composto. Há relato de que seja um inibidor da proteína kinase C de cérebro de ratos, de forma dependente da concentração, com concentração inibitória mínima 50 % de 25 μM , sugerindo, inclusive, que a atividade antitumoral do verbascosídeo esteja associada, pelo menos

em parte, à sua capacidade de inibir a PKC, uma vez que a mesma desempenha papel crucial como sinal de transdução, de diferenciação e proliferação celulares (HERBERT et al., 1991). Por outro lado, o verbascosídeo parece não modificar, de forma significativa, a síntese de tromboxano A₂ (TXA₂) (PHAM et al., 1988).

O quadro 2 ilustra alguns dos trabalhos publicados sobre as atividades farmacológicas do verbascosídeo.

Atividades Farmacológicas do Verbascosídeo			
Efeito	Doses e vias	Modelos	Referências
Antioxidante	10 – 20 µM	Oxidação induzida por radicais livres	WONG et al., 2001
	10 – 50 mg/kg i.p. por 3 dias.	Hepatotoxicidade experimental em camundongos	LEE et al., 2004
	10 µM	Microsomas de fígado de camundongos	ZHOU e ZHENG, 1991
	0,8 mg/kg v.o. cada 12 h/ 21 dias.	Stress oxidativo induzido por imobilização em coelhos	LIU et al., 2003
Anti-inflamatório	150 mg/kg v.o.	Edema de pata por carragenina em ratos e contrações em fêmo induzida por histamina e bradicinina em cobaias	SCHAPOVAL et al., 1998
Antiproliferativo	50 mg/kg i.p. por 13 dias	Metástase pulmonar murina	OHNO et al., 2002
	11, 35 e 50 µM “ <i>in vitro</i> ”	Cultura de Melanoma Murino, adenocarcinoma gástrico humano e carcinoma uterino humano	ABE et al., 2002
Cardiotônico	1 mM “ <i>in vitro</i> ”	Preparação com coração isolado	PENNACCHIO et al., 1996
Citoprotetor	0,1; 1; 10 µg/ml “ <i>in vitro</i> ”	Viabilidade celular neuronal (PC12)	SHENG et al., 2002
Citotóxico	2,6 µg/ml “ <i>in vitro</i> ” (CI ₅₀)	Leucemia Linfocítica Murina	PETTIT et al., 1990
Inibidor da PKC	25 µM “ <i>in vitro</i> ”	Inibição da PKC do cérebro de ratos	HERBERT et al., 1991
Vasoconstritor	30 µM “ <i>in vitro</i> ”	Relaxamento endotelial por NO em anéis de aorta de ratos	LAU et al., 2004
Vasoconstritor	3-50 µmol/L “ <i>in vitro</i> ”	Resposta contrátil à fenilefrina em anéis de mesentérica de ratos	TAM et al., 2002
Vasodilatador	100-300 µmol/L “ <i>in vitro</i> ”	Anéis de mesentérica de ratos	TAM et al., 2002

Quadro 2 - Resumo dos estudos farmacológicos do verbascosídeo

Embora o verbascosídeo tenha sido muito citado pela literatura recente, não há relatos sobre se sua presença poderia estar realmente contribuindo para os efeitos centrais da espécie em estudo. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido para testar a hipótese de que as preparações (EA, EH, FB) de *L. alba* promovam efeitos no SNC e que o VE possa contribuir pra esses efeitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a atividade farmacológica do extrato aquoso (EA) e hidroalcoólico (EH), fração butanólica (FB) e de uma substância isolada, o verbascosídeo (VE), obtidos de *L. alba* (Miller) no Sistema Nervoso Central.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o perfil de atividade farmacológica central das diferentes preparações (EA, EH, FB e VE) de *L. alba* empregando-se os seguintes testes:
 1. potencialização do sono induzido por barbirúrico (efeito hipno-sedativo)
 2. potencialização do sono induzido por éter etílico (efeito hipno-sedativo)
 3. temperatura retal (efeito hipotérmico)
 4. convulsões induzidas por pentilenotetrazol (efeito anticonvulsivante)
 5. suspensão pela cauda (efeito tipo-antidepressivo)
 6. labirinto em cruz elevado (efeito tipo-ansiolítico)
 7. rota-rod (efeito sedativo/atividade motora)
 8. arame (efeito sedativo/miorrelaxante)
- Verificar se o composto verbascosídeo, isolado da fração butanólica de *Lippia alba*, possui atividade farmacológica central e, portanto, se contribui para os possíveis efeitos centrais desta fração e da espécie vegetal aqui estudada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos Extratos Vegetais/ Substância isolada

3.1.1 Reagentes, solventes e soluções:

Acetato de etila P. A. (Nuclear)

Acetato de sódio (Reagen)

Acetonitrila H. P. L. C. (Nuclear)

Ácido acético glacial P. A. (Sinth)

Ácido clorídrico concentrado P. A. (Prolab)

Ácido fórmico P. A. (Reagen)

Ácido fosfórico concentrado P. A. (Biotec)

Ácido sulfúrico concentrado P. A. (Cinética Química[®])

Ácido 3,5-dinitrobenzóico (Sigma)

Água destilada

Álcool etílico 92,8° (Coperalcool[®])

Álcool etílico P. A. (Nuclear)

Álcool isopropílico P. A. (Nuclear)

Álcool metílico P. A. (Nuclear)

Álcool n-butílico P. A. (Nuclear)

Anidrido acético (Cinética Química[®])

Anisaldeído (Merck[®])

Diclorometano P. A. (Nuclear)

Éter de petróleo P. A. (Nuclear)

Hidróxido de amônio P. A. (Merck[®])

Solução de cloreto férrico 2,5 %

Solução de gelatina a 2,5 %

Tolueno P. A. (Reagen)

Vanilina (Nuclear)

3.1.2 Material Botânico

O trabalho de obtenção e processamento do material botânico foi realizado por Melissa Mancini no Laboratório de Farmacognosia do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Marení Rocha Farias (para maiores detalhes ver MANCINI, 2005).

3.1.2.1 Coleta do material

A matéria-prima vegetal, folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., foi proveniente de cultivo e coletada em Cacupé, Florianópolis, Santa Catarina, em 5 de abril de 2003. A amostra para exsiccata, contendo ramos com folhas e flores, foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina e encontra-se sob o código alfanumérico FLOR 31267.

3.1.2.2 Preparação dos extratos

O material foi seco em estufa com temperatura inferior a 50 °C por sete dias. Após este período, foram selecionadas as folhas e destinadas à moagem e pesagem. O material foi destinado à preparação das diferentes preparações (extratos, fração e substância isolada). O rendimento para o extrato hidroalcoólico (extrato bruto) concentrado foi calculado em torno de 10 % de extrato em relação à quantidade de droga moída. Em seguida, o extrato hidroalcoólico foi ressuspenso em água e submetido à partição, concentrando-se a fração butanólica até a secura, obtendo-se um rendimento em torno de 1 % em relação a droga moída.

- Obtenção do Extrato Aquoso:

Após a moagem, a planta foi então submersa em água quente e mantida num recipiente fechado por 15 minutos. Após este processo, o líquido foi filtrado a fim de remover a planta moída e, posteriormente, conservado em *freezer*, até ser liofilizado.

- Preparação da solução extrativa - Obtenção do Extrato Hidroalcoólico:

A solução extrativa foi preparada pelo método de maceração em álcool etílico, na proporção 1:20 (farmacógeno: líquido extrator). A mistura foi deixada em maceração por quatro dias, ao abrigo da luz, sob agitação periódica. Então, foi filtrada, prensada e novamente filtrada, obtendo-se parte de solução extrativa. Submetendo-se o marco à remaceração, nas mesmas condições, as soluções extrativas obtidas foram então reunidas. O líquido extrator utilizado no processo de maceração/ remaceração foi álcool etílico comercial (92,8° INPM).

Para o fracionamento, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotatório até a completa eliminação do líquido extrator (etanol), obtendo-se assim o extrato bruto ou extrato hidroalcoólico.

- Obtenção da Fração Butanólica:

De forma resumida, a fração butanólica foi obtida pela partição do resíduo aquoso, com solventes de polaridade crescente, sendo por fim concentrada em evaporador rotatório até completa eliminação do n-butanol.

A fração hidroalcoólica foi ressuspensa com auxílio de ultrassom e então destinada à partição com solventes de polaridade crescente: éter de petróleo (EP), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH). Foram realizadas seis extrações sucessivas.

O processo de partição, da solução extrativa, rendeu cinco frações diferentes: EP, CH_2Cl_2 , AcOEt, n-BuOH e aquosa, como mostrado na figura 4.

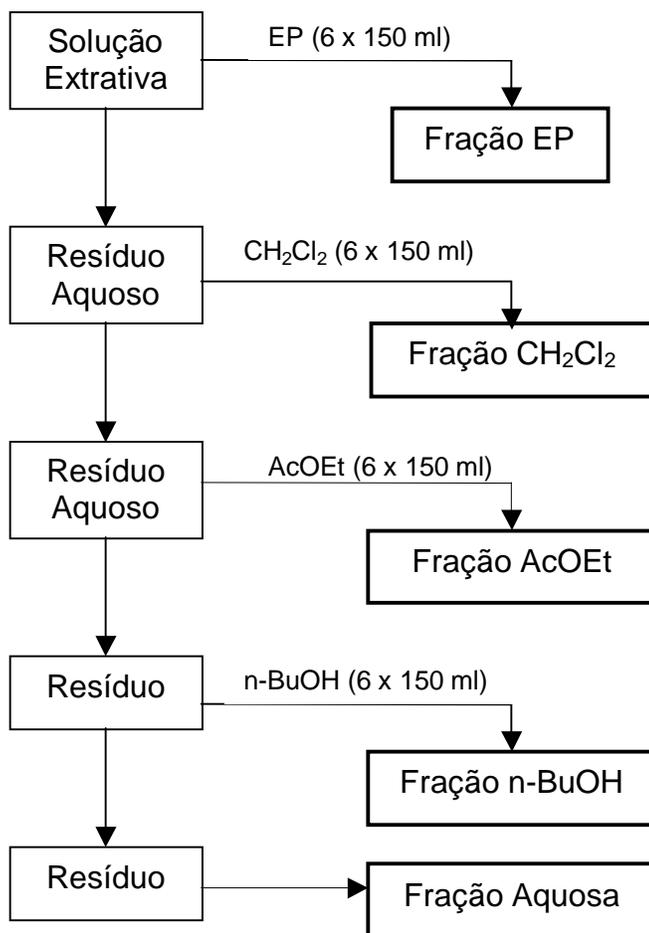


Figura 4 - Representação esquemática da partição da solução extrativa com solventes em ordem crescente de polaridade. Adaptado de Mancini (2005).

- Obtenção do Verbascosídeo:

A fração butanólica foi concentrada, parte em evaporador rotatório e parte em cápsulas em banho-maria (ambos a 43 °C), até completa eliminação do solvente. Procedeu-se, então, à sua análise e purificação através de procedimentos cromatográficos.

Foram realizados sucessivos testes com diversos sistemas cromatográficos, por cromatografia em camada delgada (CCD), para detectar e separar os constituintes da

fração butanólica. Essa metodologia, possibilitou isolar quatro substâncias, as quais foram denominadas LA-1 a LA- 4, de acordo com a ordem crescente de polaridade na cromatografia em camada delgada (CCD), no sistema utilizado. A mesma foi também utilizada no monitoramento de subfrações resultantes da purificação da fração butanólica.

A figura 5 apresenta, de forma resumida, o processo de isolamento e purificação das quatro substâncias isoladas a partir da fração butanólica.

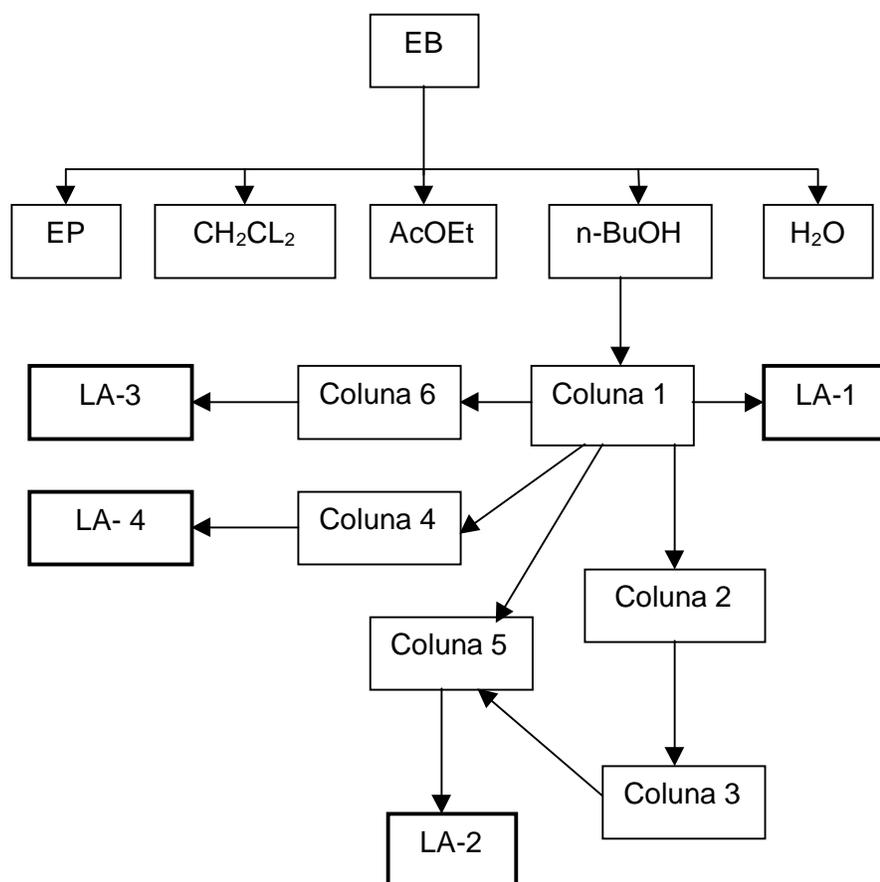


Figura 5 - Representação do processo de isolamento de substâncias a partir da fração n-BuOH. EB = extrato bruto; EP = fração éter de petróleo; CH₂Cl₂ = fração diclorometano; AcOEt = fração acetato de etila; n-BuOH = fração n-butanol. Adaptado de Mancini (2005).

As colunas foram montadas a partir da coluna 1. Utilizando-se a fração butanólica pulverizada, procedeu-se a separação de substâncias. Cada coluna teve como fase fixa, sílica em coluna de vidro, e como fase móvel solventes orgânicos, variando-se a composição da fase móvel em cada coluna. As subfrações foram então monitoradas através da CCD, utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico da coluna. O verbascosídeo foi obtido da primeira coluna (figura 4 e quadro 3), com rendimento de 11 % da fração butanólica (ver MANCINI, 2005). A identificação do verbascosídeo foi realizada por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H) pelo Prof. Dr. Jorge Alexandro Palermo, da Universidade de Buenos Aires. O quadro 3 demonstra as colunas de fracionamento das subfrações isoladas de fração butanólica.

Fracionamento da Fração Butanólica				
Colunas Cromatográficas	Sub-Fração fracionada	Constituintes da Fase móvel	Sub-Frações obtidas	Viabilidade futura/ Identificação
Coluna 1		AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H ₂ O/ ác. Acético (7: 1: 2: 5: 0,2).	C1-01 – 11	Impura
			C1-12 – 22 = LA-1	Bom rendimento e pouco impura = Verbascosídeo
			C1-23 – 43	Bom rendimento e pureza
			C1-44 – 107	Impura
			C1-108 – 162	Bom rendimento e pureza
			C1-Lavagem MeOH	Promissora
Coluna 2	C1-23-43	AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H ₂ O/ ác. Acético (7: 1: 2: 5: 0,2)	C2-01-07	Similar à LA-1
			C2-08-34	Viável para purificação
			C2-52-90	Baixo rendimento
			C2-35-51	Impura
			C2-91-156	Impura
Coluna 3	C2-08-34	AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H ₂ O/ ác. Acético (7: 1: 2: 5: 0,2)	C3-01 – 50	Baixo rendimento e pureza
			C3-51 – 115	Pureza razoável
			C3-116 - 145	Baixo rendimento
Coluna 4	C1-lavagem MeOH	EtOH/ AcOEt/ H ₂ O (120: 60: 5)	C4-01-55 = LA-4	A ser elucidada
			C4-56-96	Baixo rendimento e pureza
			C4-97-259	Baixo rendimento e pureza
Coluna 5	C1-44-107 e C3-51-115	AcOEt/ MeOH/ isoprOH/ H ₂ O/ ác. Acético (7: 1: 2: 5: 0,2)	C5-01 – 21 C5-22 – 55 C5-56 – 62 C5-56 - 62	Pureza razoável e baixo rendimento
			C5-83-154 = LA-2	Aguardando elucidação
Coluna 6	C1-108-162	EtOH/ AcOEt/ H ₂ O (120: 60: 5)	C6-01-113 = LA-3	Saponina
			C6-114-143	Baixo grau de pureza

Quadro 3 - Resultados obtidos nas colunas de fracionamento das subfrações isoladas de Fração Butanólica de *Lippia alba*.

3.2 Avaliação da atividade farmacológica

3.2.1 Animais

Foram usados camundongos Swiss, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da UFSC, pesando entre 35 – 45 ou 30 – 40 g, respectivamente. Os animais foram alojados em grupos de 10 – 20 animais por caixa, com água e ração *ad libitum*, exceto durante a vigência dos experimentos, e mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (luzes acesas às 7:00 h), num ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os animais foram habituados nas condições do laboratório por, pelo menos, uma semana antes do início dos testes comportamentais. Todos os animais não haviam sido previamente usados, sendo testados apenas uma vez, exceto quando explicitamente indicado em testes não invasivos. Os experimentos comportamentais e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (# 23080.027554/2004-49/UFSC). O número mínimo de animais e a duração mínima de observação que permitiram obter dados consistentes foram usados em todos os experimentos. Utilizou-se num mesmo protocolo e para todas as preparações neste modelo, apenas animais machos ou fêmeas, para não gerar mais uma variável nos experimentos. Todos experimentos foram realizados entre 12:00 e 18:00 h.

Nas fêmeas, avaliou-se a fase do ciclo estral em que se encontravam e não foram considerados para análise estatística animais em fase de estro (menos de 10% do total), uma vez que a influência da alopregnanolona, um metabólito da progesterona, é um neuroesteróide que sabidamente exibe ações hipnótica, ansiolítica e anticonvulsivante (BITRAN et al., 1995; BROT et al., 1997; PESCE et al., 2000) e, assim, animais nesta fase do ciclo poderiam gerar variações nos resultados experimentais. As fêmeas foram usadas nos seguintes modelos: convulsões experimentais, teste da suspensão pela cauda e testes do arame, modelos onde anteriormente não foram encontradas diferenças comportamentais entre machos e fêmeas em diestro no laboratório (dados não publicados). Nos demais modelos onde o ciclo estral poderia influenciar o resultado obtido, como no LCE (DÍAZ-VÉLIZ et al., 2000) utilizou-se animais machos.

Após o término dos testes farmacológicos, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ ou por deslocamento cervical. Animais que receberam injeções via i.c.v., foram conservados em *freezer* para posterior verificação do local da injeção, só sendo considerados para análise estatística os animais que receberam a injeção em um dos ventrículos cerebrais (cerca de 80 % do total).

3.2.2 Fármacos e soluções:

Cloreto de sódio -	Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, Brasil);
Diazepam (DZP) -	Diazepam (Dienpax ® , Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP), usado como droga sedativa/ansiolítica padrão, agonista GABAérgico (CARLINI e BURGOS, 1979);
Éter etílico P.A. -	Obtido dos Laboratórios F. Maia (São Paulo), utilizado como anestésico volátil (KATZUNG, 1997);
Imipramina -	Obtido do laboratório Sigma Chemical Co (St.Louis, MO, EUA), inibidor da recaptção de serotonina;
Pentilenotetrazol (PTZ) -	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, antagonista GABAérgico (MELO et al., 1986);
Pentobarbital sódico -	Obtido dos Laboratórios Abbott (São Paulo, SP), agonista GABAérgico não seletivo, usado como hipno-sedativo (ALPERN & MCINTYRE, 1985);
Extrato Aquoso de <i>L. alba</i> -	Preparado pelo Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC;
Extrato Hidroalcoólico de <i>L. alba</i> -	Preparado pelo Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC;
Fração Butanólica de <i>L. alba</i> -	Preparado pelo Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC;
Verbascosídeo de <i>L. alba</i> -	Isolado pelo Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.2.1 Preparação dos Fármacos

O diazepam foi dissolvido numa solução de propilenoglicol à 10 % em salina (cloreto de sódio 0,9 %). As demais preparações foram solubilizadas em solução salina. Todas foram preparadas no dia da realização dos experimentos e mantidas à temperatura ambiente até o momento do uso.

3.2.2.2 Administração dos Fármacos

Nos fármacos, extratos ou fração administrados v.o. e i.p. manteve-se sempre o volume de 10 ml para cada quilo de peso do animal; enquanto para a via i.c.v., o volume foi fixado em 2 μ l/sítio/animal.

Os compostos, de origem vegetal, destinados ao tratamento pela v.o. foram administrados com auxílio de uma cânula intra-esofágica, confeccionada a partir de uma agulha calibre 1,2 x 40 mm.

Os animais foram tratados por via oral 1 h antes dos testes farmacológicos. Este tempo foi determinado no modelo de sono induzido por barbitúrico apenas para a FB, em virtude de resultados prévios de nosso laboratório (dados não apresentados).

O composto isolado verbascosídeo foi administrado via i.c.v. 5 min antes da realização dos testes comportamentais. Este tempo foi selecionado em estudos preliminares usando curvas tempo-resposta (dados não mostrados).

Todos os tratamentos foram realizados em diferentes doses para construção de curvas dose-resposta nos modelos de sono barbitúrico e/ou sono etéreo, temperatura retal e convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Nos modelos de depressão, ansiedade e prejuízo motor – teste de suspensão pela cauda, labirinto em cruz elevado acompanhado pelo rota-rod e teste do arame, foram selecionadas as doses que tiveram melhor aproveitamento nos modelos anteriores, para minimizar o número de animais usados e otimizar as avaliações.

- Administração central de fármacos em camundongos

Todas as injeções centrais em camundongos foram feitas baseado na técnica de *free-hand* (LAURSEN; BELKNAP, 1986). Neste protocolo os animais foram anestesiados em câmara saturada com éter etílico (5 ml). Uma cânula confeccionada a partir de uma agulha 0,45 x 13 mm, acoplada a uma seringa Hamilton de 10 µl, com auxílio de um tubo de polietileno (PE-20 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA). O local de injeção foi determinado pelo traçado de uma linha imaginária que une as comissuras palpebrais laterais e sua intersecção com a linha longitudinal que divide a calota craniana ao meio, deslocando-se lateral e caudalmente cerca de 2 mm. Neste ponto a agulha foi inserida perpendicularmente a uma profundidade de 3 mm.

Os mesmos procedimentos foram adotados para os animais do grupo controle, porém estes receberam somente veículo (salina).

- Administração periférica de fármacos

O pentobarbital sódico (50 mg/kg) e o pentilenotetrazol (80 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). O éter etílico (5 ml/ bola de algodão de 2g, 10 min de saturação) foi administrado por via inalatória, numa câmara de saturação. Utilizou-se diazepam (1-1,5 mg/kg) ou imipramina (15 mg/kg) como controle positivo em alguns protocolos experimentais, sendo administrados por via i.p., 30 min antes dos testes farmacológicos.

3.2.3 Procedimentos experimentais e equipamentos

3.2.3.1 Sono barbitúrico

Vários trabalhos mostram que o pentobarbital aumenta o influxo de Cl^- decorrente da ligação do GABA em seu receptor $GABA_A$, potencializando a inibição mediada pelo GABA, tanto pré- quanto pós-sináptica no SNC de mamíferos. Assim, foi demonstrado experimentalmente que a ação hipnótica do pentobarbital, determinada pela perda do reflexo postural e tempo de sono em camundongos, está relacionada à função do receptor $GABA_A$ (CHWEH et al., 1987).

O protocolo experimental foi realizado conforme descrito a seguir.

Transcorrido o tempo para o início do efeito, 1h (v.o.), 30 (i.p.) ou 5 min (i.c.v.), os camundongos foram tratados com pentobarbital sódico (50 mg/ kg, i.p.), e a latência para a perda do reflexo postural e a duração do sono induzido (tempo de sono / *sleeping time*) foram registrados com um cronômetro por até 3 h após o início do sono. O tempo de sono foi medido pelo período entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento postural (CARLINI et al., 1986; CARLINI; BURGOS, 1979; CHWEH et al., 1987). O diazepam, na dose de 1,5 mg/kg, i.p., 30 min antes da indução do sono, constituiu o grupo controle positivo.

3.2.3.2 Sono etéreo

Além do modelo do sono induzido por pentobarbital, para comprovar a atividade hipno-sedativa, foi utilizado outro indutor para o sono: o éter etílico.

A predição do sono etéreo segue, em linhas gerais, os mesmos princípios do sono barbitúrico, porém o agente indutor obviamente difere. Além disso o menor tempo de duração do sono, parece mais indicado para o estudo de preparações que tenham um curto tempo de efeito por estarem sendo administrados pela via i.c.v. Os mecanismos farmacodinâmicos de ambos os agentes são semelhantes, sendo que ambos têm seus efeitos obtidos via modulação da atividade do complexo receptor GABA_A (CHAMBERS et al., 1978).

O protocolo experimental foi realizado conforme descrito a seguir.

Camundongos pré-tratados oralmente (1 h) com as preparações/ veículo ou via i.c.v. (5 min) (composto isolado ou veículo) foram colocados em uma câmara de vidro transparente fechada (30 cm x 20 cm de diâmetro) saturada com éter etílico. A saturação foi obtida pelo umedecimento de uma bola de algodão de tamanho padrão (2 g) com 5 mL de éter etílico, colocada no recipiente a 20 cm do nível do chão, 10 min antes da realização dos testes farmacológicos. A bola de algodão foi substituída a cada 3 animais.

Transcorrido o tempo para saturação da câmara, os animais foram introduzidos individualmente na mesma, registrando-se os mesmos parâmetros descritos para o sono barbitúrico (latência e duração do sono). O sono é caracterizado pela perda do

reflexo postural. Uma vez o reflexo perdido, esperou-se 60 s e se retirou o animal da câmara de saturação, colocando-o em decúbito dorsal para registro da duração da hipnose, cujo término foi caracterizado pela recuperação da postura de endireitamento normal (VIEIRA, 2001).

O diazepam, na dose de 1,5 mg/kg, i.p., 30 min antes da indução do sono, constituiu o grupo controle positivo.

3.2.3.3 Temperatura retal

A temperatura corpórea pode ser empregada como índice de alterações de vários neurotransmissores centrais, como, por exemplo, agonistas dopaminérgicos (SANCHEZ, 1989), embora sirva também para distinguir entre agonistas totais ou parciais de receptores benzodiazepínicos (JACKSON; NUTT, 1990).

A temperatura corporal (° C) foi medida colocando-se um sensor 2 cm no reto do camundongo, antes das administrações das diversas preparações/ compostos, ou veículo, e decorrido o tempo para o início de atividade das mesmas. As mudanças de temperatura foram calculadas em relação a variação de temperatura de cada grupo ($\Delta T = T_2 - T_1$), onde T_2 é a temperatura registrada após o tratamento (5 min, 30 min ou 1 h) e T_1 a temperatura registrada imediatamente antes do tratamento (temperatura basal). O registro digital da temperatura foi feito com uma aproximação de 0,1°C por um termômetro digital Cole-Parmer Instrument Company, modelo 8402-00. O sensor de mesma marca, nº 08432-00, embebido de silicone foi mantido no reto até que a temperatura permanecesse estável (cerca de 30 s). Os registros da temperatura retal foram feitos imediatamente antes da indução do sono barbitúrico (CARLINI et al., 1983). O diazepam (1,5 mg/kg, i.p.) constituiu o grupo controle positivo.

3.2.3.4 Convulsões induzidas por pentilenotetrazol

Numa tentativa de melhorar os conhecimentos acerca da epilepsia no homem, as pesquisas se dirigiram para o reino animal. A relevância de um modelo experimental é determinada pelo grau em que ele serve como testemunha do fenômeno natural. Ainda

que anualmente a literatura científica esteja repleta de novos modelos para explicar esta ou aquela forma de epilepsia, poucos são aqueles que resistem a um exame rigoroso e à prova do tempo (MELLO et al., 1986).

A pesquisa experimental em epilepsia e sobre fármacos anticonvulsivantes tem sido feita principalmente em camundongos e ratos cujas crises são induzidas química ou eletricamente. Embora os modelos de eletrochoque transcorneal máximo (ECM) e de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), em roedores, sejam úteis na identificação de fármacos com ação anticonvulsivante, eles obviamente, não são muito parecidos com a epilepsia humana, representando mais modelos de indução de uma simples crise epiléptica do que de epilepsia, que é um fenômeno crônico (LOSCHER; SCHIMIDT, 1988).

O modelo de convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ) tem sido utilizado no estudo das vias neuroanatômicas envolvidas no fenômeno epiléptico, na pesquisa de anticonvulsivantes, e na avaliação dos diversos sistemas de neurotransmissão e de suas funções na epilepsia (MELLO et al., 1986).

O PTZ inicialmente produz espasmos mioclônicos que se tornam subseqüentemente mantidos e podem levar a uma crise tônico-clônica generalizada. Ao nível sináptico, o PTZ interage com o complexo receptor GABA_A, possivelmente no sítio de ligação da picrotoxina.

O PTZ foi introduzido como um teste de triagem para ação anticonvulsivante em parte porque a etossuximida, um fármaco anticonvulsivante para convulsões do tipo antiausência que é efetiva contra as crises induzidas pelo PTZ, não altera as crises induzidas pelo ECM. Em contraste, alguns fármacos efetivas contra o ECM, como a fenitoína e carbamazepina, não são eficazes contra as crises do PTZ. Assim, tornou-se prática comum presumir que fármacos efetivas contra as crises induzidas por PTZ seriam terapias anti-ausência em potencial, enquanto fármacos eficazes contra ECM, seriam terapias potenciais para crises tônico-clônicas parciais (DEYN et al., 1992).

O protocolo experimental foi realizado conforme descrito a seguir.

Após os pré-tratamentos com as preparações ou o composto isolado, os camundongos foram tratados com pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.) e mantidos individualmente em caixas plásticas (40 cm x 30 cm x 15 cm) para observação das convulsões. O tempo para manifestação da primeira convulsão (latência), assim como a duração, a incidência, a severidade das convulsões e o número de mortes foram registrados até

30 min após a administração de PTZ (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988; SWINYARD et al., 1989; SWINYARD et al., 1952). O diazepam (1 mg/kg, i.p.) constituiu o grupo controle positivo. Para o escore severidade, consideramos os escores propostos por Czuczwar e Frey (1986), como ilustra o seguinte quadro:

Comportamento Apresentado	Grau de Severidade
Nenhum comportamento convulsivo	0
Abalos mioclônicos	1
Crises clônicas sem perda de reflexo de endireitamento	2
Crises clônicas com perda de reflexo de endireitamento	3
Extensão tônica das patas posteriores	4
Extensão tônica seguida de morte	5

Quadro 4 - Grau de severidade atribuído ao comportamento apresentado no modelo das convulsões induzidas por PTZ

3.2.3.5 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda (TST), utilizado como modelo para fármacos com possível efeito tipo antidepressivo, foi realizado conforme descrito por Stéru e colaboradores (1985). Os animais foram mantidos presos com uma fita adesiva pelo terço final da cauda, a 50 cm do chão e distante por, pelo menos, 30 cm de qualquer objeto. O animal permaneceu nesta condição durante 5 min, nos quais registramos o tempo até a primeira imobilidade (latência) e o tempo total em que o animal permaneceu imóvel (imobilidade). O tempo de imobilidade neste modelo avalia o ‘desespero comportamental’ que reflete um estado de “depressão”, sensível ao tratamento com antidepressivos, como a imipramina e desipramina (STÉRU et al., 1985). A imipramina, na dose de 15 mg/kg i.p., 30 min antes dos testes experimentais foi usada como controle positivo.

3.2.3.6 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Muito do conhecimento existente sobre a ansiedade humana foi obtido pela experimentação animal. Até a década de 70, os paradigmas experimentais mais empregados envolviam situações em que era necessário o condicionamento dos

animais, empregando-se estímulos aversivos (RODGERS et al., 1997). A partir da década de 80, passou a ser dada uma maior atenção aos modelos animais de ansiedade etologicamente fundamentados. Esses modelos se baseiam nas respostas inatas de medo de diferentes espécies animais diante de situações naturalmente aversivas como lugares novos, confronto com um intruso e iluminação intensa (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987).

Entre os modelos de ansiedade etologicamente fundamentados, e de grande aceitação atualmente, encontra-se o labirinto em cruz elevado (LCE). O modelo experimental do LCE foi validado para roedores (LISTER, 1987) e tem sido extensivamente usado na descoberta de agentes ansiolíticos e na investigação das bases neuroquímicas da ansiedade (HOGG, 1996). Além disso, em alguns laboratórios esse teste tem se mostrado capaz de detectar possíveis compostos ansiolíticos que não mostram resultados consistentes em modelos animais clássicos de ansiedade, ou seja, naqueles baseados no condicionamento aversivo (DAWSON; TRICKLEBANK, 1995).

Esse modelo deriva de um trabalho de Montgomery (1955), que relacionou medo e atividade exploratória. Handley e Mitani (1984) então desenvolveram um labirinto elevado em X no qual a intensidade do medo natural induzido poderia ser medida pela variação da proporção de exploração (comportamento exploratório) entre os braços abertos e fechados do equipamento. Como consequência, os ratos tendem a evitar os braços abertos e permanecem por mais tempo nos braços fechados do LCE. De uma forma geral, fármacos ansiolíticos aumentam, enquanto agentes ansiogênicos diminuem a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. O modelo foi, posteriormente, aperfeiçoado por Pellow e col. (1985) e, por fim, adaptado para camundongos por Lister (1987). Alguns trabalhos indicam que espaços abertos ou, mais especificamente, a impossibilidade de roedores executarem a tigmotaxia nos braços abertos, ao invés da altura ou do ambiente novo, é a principal causa do medo nesta situação experimental (TREIT et al., 1993).

O LCE consiste de dois braços abertos opostos (30 cm x 5 cm) cruzados em ângulo reto com outros dois braços cercados lateralmente (30 cm x 5 cm) por uma parede de 15 cm de altura (braços fechados). Os quatro braços delimitam uma área central de 5 x 5 cm, designada como plataforma central. Todo o aparelho foi confeccionado em acrílico, sendo as paredes dos braços fechados feitos em acrílico transparente e o

assoalho em acrílico preto. O aparelho está elevado a 45 cm do nível do chão. Para evitar a queda dos animais, uma borda de 0,25 cm de altura cerca os braços abertos. Como procedimento geral, os camundongos foram pré-tratados com as diversas preparações, compostos, ou veículos e, transcorrido o tempo de ação para início da atividade das preparações, colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min. A avaliação dos parâmetros comportamentais ocorreu em uma sala com luz vermelha (15 W) e, após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução etanol 10 % e seco com papel toalha (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997). Os animais tratados com diazepam (1 mg/kg, i.p.) serviram como grupo controle positivo. As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entradas e de tempo despendido nos braços abertos, obtidos, respectivamente, pela relação entre: a frequência de entradas e tempo despendido nos braços abertos, dividido pelo número total de entradas e tempo total despendido nos braços do LCE x 100, e a frequência de entrada nos braços fechados. Foram também registradas medidas de avaliação etológica como o número de imersões de cabeça, postura de avaliação de risco ou estiramentos corporais, comportamento de levantar e auto-limpeza (RODGERS et al., 1997). Foi considerado como entrada em um dos braços do labirinto, quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço e como saída quando saiu com as quatro patas. O comportamento de imersão de cabeça foi registrado quando o animal explorava a área abaixo da plataforma do LCE, e a avaliação de risco ou estiramentos corporais quando o animal, mantendo as patas traseiras fixas no chão do aparelho, estirava os membros dianteiros e retornava a posição inicial. Entendeu-se por comportamento de levantar a manutenção do corpo apenas com as patas traseira no chão do LCE, e as patas dianteiras apoiadas ou não na parede do aparelho. Quando o camundongo lambeu seus membros ou pêlos, este comportamento foi registrado como atividade de auto-limpeza.

3.2.3.7 Rota-rod

O aparelho de rota-rod, proposto por Dunham e Miya (1957), além de não requerer um observador experiente, é um modelo útil para detectar coordenação motora, pode

ser aplicado em ratos e camundongos, e tem valor potencial para testar vários tipos de fármacos como: relaxantes musculares esqueléticos, depressores do Sistema Nervoso Central e anticonvulsivantes.

O protocolo experimental foi realizado conforme descrito a seguir. Transcorrido cada tratamento, os camundongos foram colocados no aparelho de rota-rod por 60 s. O rota-rod é constituído por uma barra giratória com diâmetro de 2,5 cm e 60 cm de comprimento divididos em 6 compartimentos, girando a 12 rpm. A barra está localizada na posição horizontal a uma altura de 25 cm do nível do chão. Como parâmetros foram registrados o número de quedas e o tempo de permanência dos animais na barra giratória. A cada queda foram subtraídos 3 segundos do tempo total de permanência na barra (60 s). A fim de evitar resultados falso-positivos, selecionamos os animais através de um pré-teste 24 h antes da realização do protocolo. Os animais foram colocados por 120 s sobre a barra giratória em movimento. Realizamos reconduções em caso de queda, e foram destinados ao experimento apenas os animais que total permaneceram por, pelo menos, 60 s sobre a barra. O diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., 30 min antes do teste constituiu o grupo controle positivo.

3.2.3.8 Teste do Arame

O modelo (Boissier et al., 1961) avalia a capacidade de preensão do animal. Este teste consiste em colocar as patas dianteiras do animal em um arame (1 mm de diâmetro por 15 cm de comprimento) numa altura de 20 cm, sendo que ao agarrar o arame com as patas dianteiras o animal é tracionado horizontalmente e solto, sendo que animais normais imediatamente agarram o arame com pelo menos, uma das patas traseiras. Se o animal não completar a tarefa, num total de 3 tentativas, ou cair em 3 s é considerado que o mesmo apresenta relaxamento muscular, sendo que este estado pode ser relacionado à sedação. Imediatamente antes da administração da fármacos o animal foi submetido a dois treinos, e só foi destinado ao experimento o animal que obteve êxito (90% do total). O diazepam na dose de 1,5 mg/kg, i.p., 30 min antes do teste, foi administrado ao grupo controle positivo.

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software* Statistica® versão 6.0. e os gráficos confeccionados no GraphPad® versão 3.0. Como alguns grupos não apresentaram distribuição normal e em virtude de termos diversos valores de medidas em escala ordinal, foi utilizado como teste estatístico Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica), seguido do teste U de Mann-Whitney. Para os dados em nível de medida nominal, foi utilizado o teste de Fisher. Os dados obtidos em cada experimento foram expressos como mediana e intervalo interquartil, e nos de medida nominal como porcentagem. Todos os dados foram comparados com seu grupo controle. Um número de 6 a 13 animais foi utilizado para cada grupo testado, sendo que num mesmo experimento o “n” de um grupo não superou o dobro de cada um dos demais grupos. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas estatisticamente significantes quando p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade hipno-sedativa

4.1.1 Hipnose induzida por pentobarbital

O tratamento com o EA (0,1; 0,3; 1 ou 2 g/kg v.o.); EH (0,1; 0,3; 1 ou 2 g/kg v.o.) ou com o VE (0,12 e 1,2 µg/sítio i.c.v.) não foi capaz de interferir com a latência ou potencializar o sono induzido por pentobarbital ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney) (figuras 6, 7 e 9). Por outro lado o tratamento com a FB na dose de 0,3 g/kg v.o. potencializou o sono barbitúrico ($p = 0,0206$; teste U de Mann-Whitney) (Figura 8) de 31,43 (17 – 45,4) min no grupo controle para 63,27 (49,6 – 99,4) min no grupo tratado, embora não tenha alterado a latência para o mesmo ($p = 0,224$; teste U de Mann-Whitney). O tratamento com diazepam na dose de 1,5 mg/kg i.p. constituiu o grupo controle positivo e foi capaz de potencializar o sono induzido por pentobarbital em todos os experimentos ($p < 0,05$): 135 (121 - 180) min nos experimentos com EA, 148 (117,9 - 180) min no EH, 134 (40 - 180) min no controle da FB e 168 (122 - 180) min no controle do VE.

O EA (1 e 2 g) tendeu a aumentar a duração do sono de 44,1 (18 - 69) min no grupo controle para 67,9 (41 - 115) min e 75 (61,6 – 119) ($p = 0,39$ e $p = 0,10$, respectivamente). O EH (2 g), ao contrário, tendeu a reduzir a duração do sono de 60,15 (19,8 – 76,6) min no grupo controle para 23,4 (18,5 – 69) min no grupo tratado com o extrato ($p = 0,4$).

EXTRATO AQUOSO

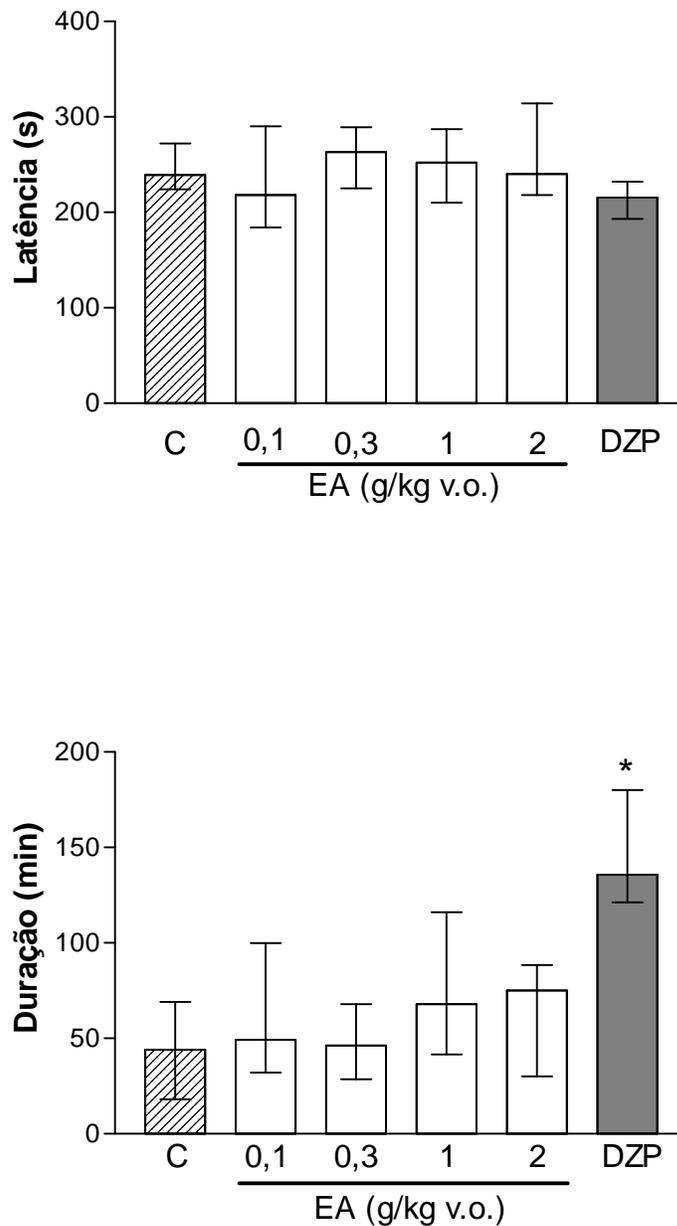


Figura 6 - Latência e duração do sono induzido por barbitúrico, 1 h após o tratamento com o extrato aquoso (EA) de *Lippia alba*. Os valores estão expressos em minutos, como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

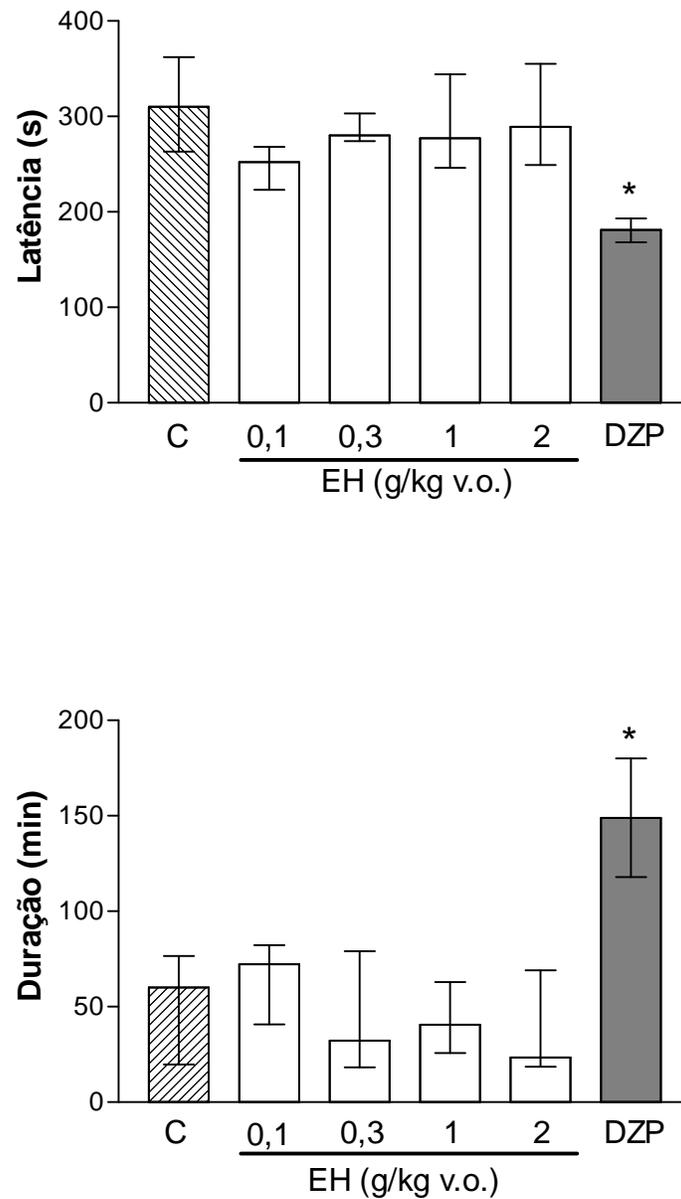


Figura 7 - Latência e duração do sono induzido por barbitúrico, 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *Lippia alba*. Os valores estão expressos em minutos, como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

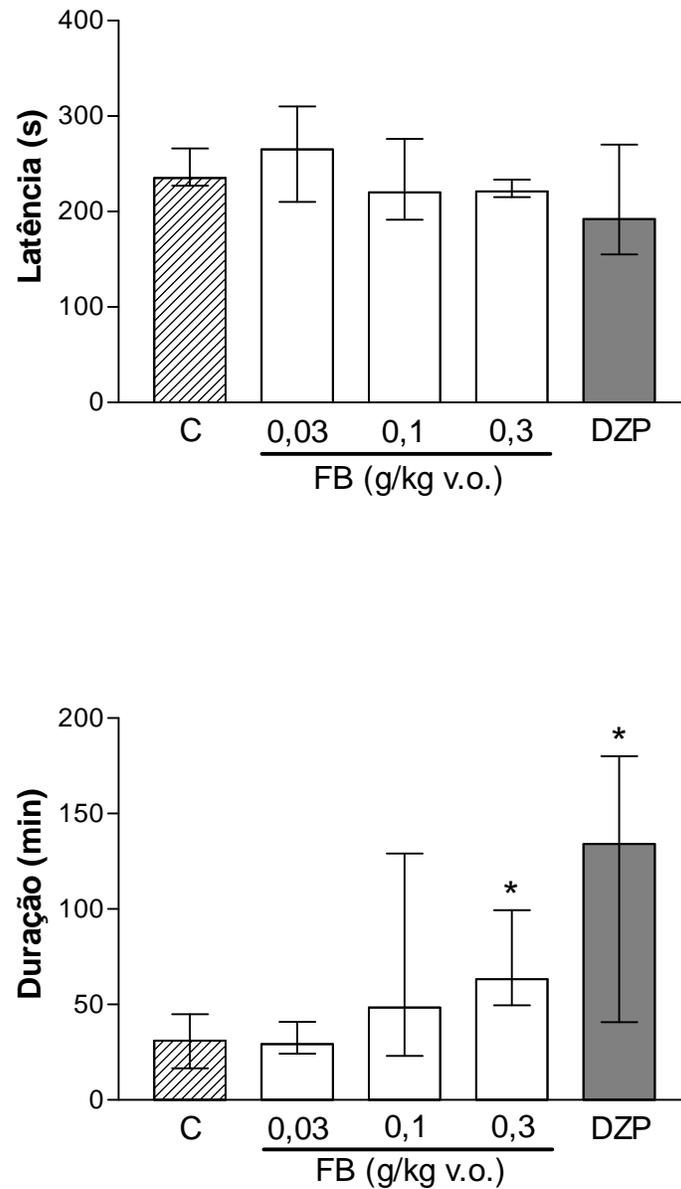


Figura 8 - Latência e duração do sono induzido por barbitúrico, 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *Lippia alba*. Os valores estão expressos em minutos, como mediana e intervalo interquartil de 7 - 8 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

VERBASCOSÍDEO

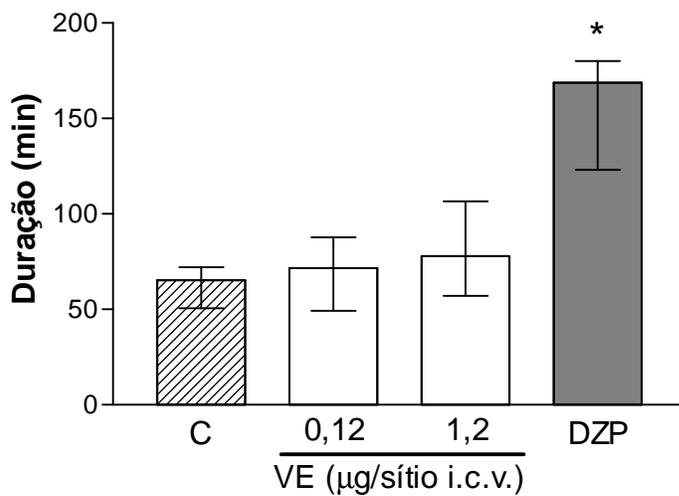


Figura 9 - Duração do sono induzido por barbitúrico, 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) extraído de *Lippia alba*. Os valores estão expressos em minutos, como mediana e intervalo interquartil de 6 - 8 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

4.1.2. Hipnose induzida por éter etílico

Para confirmar o efeito hipnosedativo da FB e verificar se o verbascosídeo isolado desta fração é responsável por ele, procedeu-se o estudo do modelo do sono etéreo com a dose de 0,3 g/kg v.o. para a FB (dose que potencializou o sono barbitúrico) e com curva doses resposta para o VE.

A FB não interferiu nem com a latência nem com a duração do sono induzido por éter na dose estudada, não confirmando o efeito hipno-sedativo de seus constituintes observado anteriormente com a potenciação do sono barbitúrico ($p > 0,05$; teste U de Mann-Whitney) (figura 10).

O tratamento com VE, por outro lado, reduziu a latência para o sono etéreo na dose de 0,036 μg ($p = 0,045$; teste U de Mann-Whitney) de 33,5 (25 - 39) s no controle para 29,5 (24 - 30) s; e potencializou a duração do sono nas doses de 0,12, 1,2 e 12 μg (grupo controle = 136 (94 - 155) s; grupos tratados = 180 (161 - 256), 183 (141 - 223) e 206 (165 - 231) s respectivamente) ($p = 0,016$; $p = 0,0294$ e $p = 0,0025$, respectivamente, teste U de Mann-Whitney; figura 11). O tratamento com diazepam (1,5 mg/kg) potencializou o sono aumentando sua duração em todos os experimentos: 220 (160 - 237) s ($p = 0,007$) e 225 (187 - 412) s ($p = 0,0008$) para os experimentos com FB e VE, respectivamente.

FRAÇÃO BUTANÓLICA

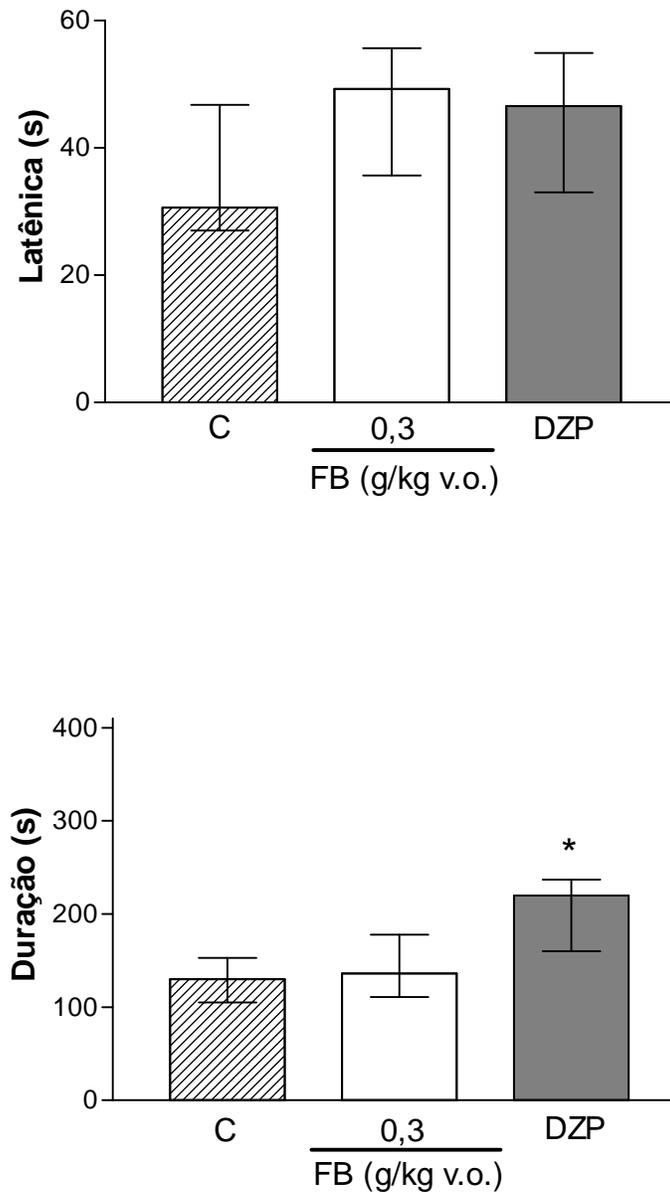


Figura 10 - Latência e duração do sono induzido por éter 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos em segundos, como mediana e intervalo interquartil de 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

VERBASCOSÍDEO

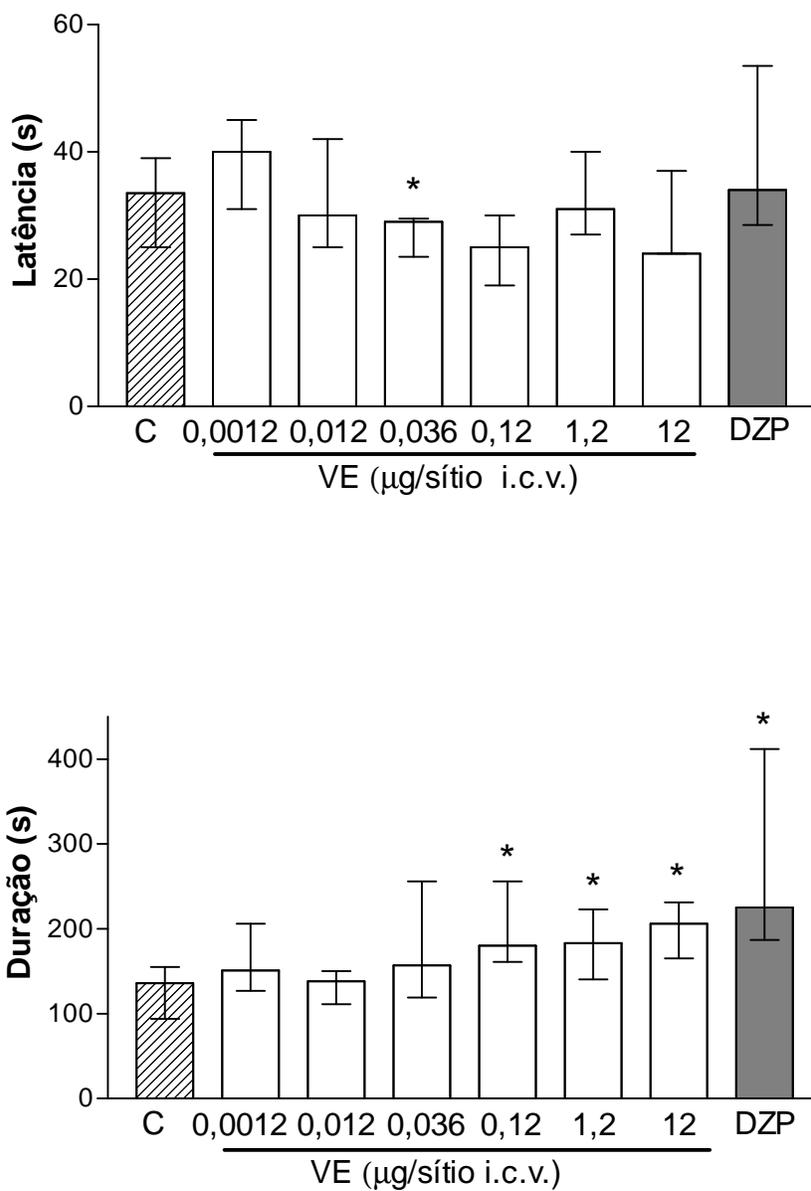


Figura 11 - Latência e duração do sono induzido por éter, 5 min após o tratamento com verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos em segundos, como mediana e intervalo interquartil de 7 - 13 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

4.2 Temperatura retal

Foram feitas curvas dose-resposta para cada uma das preparações testadas. Somente a maior dose do EA (2 g/kg) promoveu redução significativa da temperatura retal ($p=0,0082$; teste U de Mann-Whitney), com um ΔT ($T_2 - T_1$) de $-1,15$ ($-1,4 - -0,7$) °C; enquanto o ΔT para o grupo controle foi de $0,5$ ($-0,3 - 0,7$) °C (figura 12). Para o EH o efeito hipotérmico foi observado nas doses de $0,3$ ($p=0,015$) e 1 g/kg v.o. ($p=0,0476$), com ΔT de $-0,9$ ($-1,3 - 0,3$) °C e $-0,2$ ($-1 - 0,5$) °C respectivamente (figura 13). Para a FB foi registrada hipotermia nas doses de $0,1$ ($\Delta T= -1,2$ ($-1,6 - -0,65$) °C; $p=0,027$) e $0,3$ g/kg v.o. ($\Delta T= -1,5$ ($-2,15 - -1,2$) °C; $p=0,0109$) (figura 14), e para o tratamento com VE o mesmo efeito foi observado nas doses de $0,12$, $1,2$ e 12 $\mu\text{g/sítio i.c.v.}$ ($\Delta T= -1,6$ ($-2,7 - -1,4$); $-2,6$ ($-3,3 - -1,5$) e $-1,7$ ($-2,2 - -1$) °C, respectivamente; $p=0,01341$; $p=0,00328$ e $p=0,0305$, respectivamente) como apresentado na figura 15. Para as demais doses das preparações não foi observado qualquer efeito significativo ($p>0,05$; teste U de Mann-Whitney). O controle positivo diazepam promoveu um ΔT significativo em todos os experimentos na dose de $1,5$ mg/kg i.p.: $-0,85$ ($-1,2 - -0,7$) ($p=0,013$), $-0,9$ ($-1,5 - -0,5$) ($p=0,006$), $-0,9$ ($-1,3 - -0,4$) ($p=0,047$), $-1,5$ ($-2 - -0,9$) ($p=0,014$) °C, respectivamente nos experimentos com EA, EH, FB e VE.

EXTRATO AQUOSO

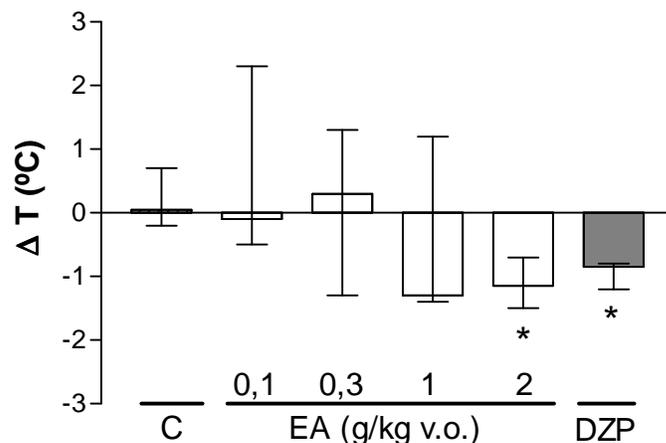


Figura 12 - Variação de temperatura retal (Δ em $^{\circ}\text{C}$) 1 h após o tratamento com o extrato aquoso (EA) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

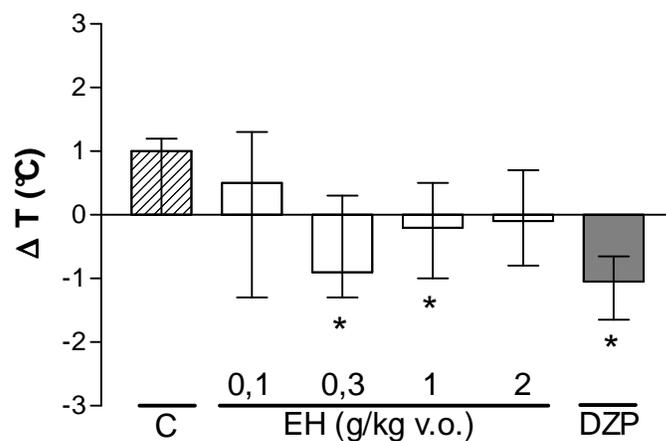


Figura 13 - Variação de temperatura retal (Δ em $^{\circ}\text{C}$) 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

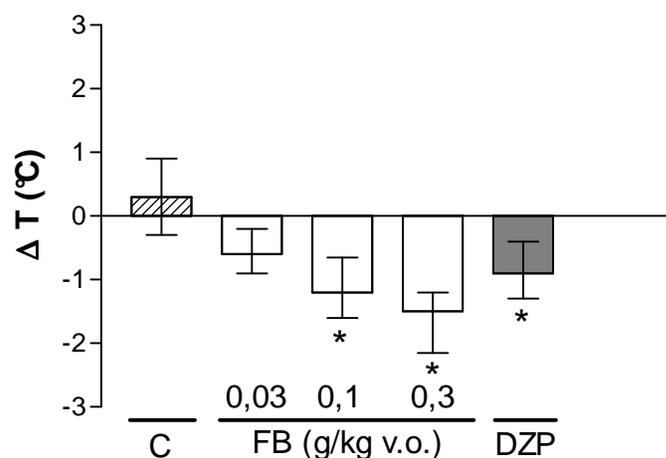


Figura 14 - Variação de temperatura retal (Δ em $^{\circ}\text{C}$) 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 8 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

VERBASCOSÍDEO

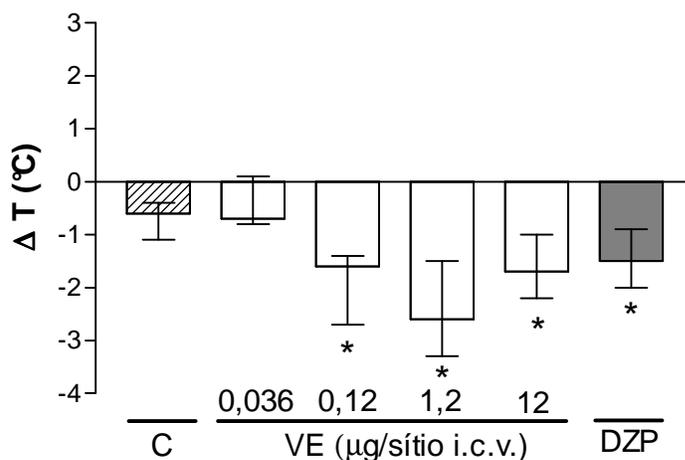


Figura 15 - Variação de temperatura retal (Δ em $^{\circ}\text{C}$) 5 min após o tratamento i.c.v. com o verbascosídeo de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 10 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

4.3 Atividade Anticonvulsivante

Para o modelo das convulsões induzidas por PTZ, foram construídas curvas dose-resposta para todas as preparações. A partir deste modelo, no entanto não se testou mais o EA, em virtude dos resultados negativos com os experimentos de sono barbitúrico e da necessidade de uma dose muito alta (2 g/kg v.o.) ter sido necessária para produzir um efeito significativo no teste da temperatura retal.

Analisou-se neste modelo as seguintes variáveis: latência para primeira convulsão, duração da primeira convulsão, severidade das convulsões e número de mortes durante as convulsões expresso graficamente como porcentagem de letalidade.

O EH não foi capaz de interferir em todos os parâmetros analisados de forma significativa ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney) (figuras 16 e 17). A FB na dose de 0,3 g/kg reduziu significativamente a letalidade (100 % para 22,2 %) dos animais tratados com PTZ ($p = 0,0011$; teste de Fisher) durante os 30 min de observação (figura 19), embora não tenha alterado os demais parâmetros analisados (figuras 18 e 19).

O VE também conferiu proteção contra a letalidade durante as convulsões na dose de 12 µg/sítio, reduzindo-as de 70 % para 12,5 % ($p = 0,023$; teste de Fisher), enquanto a dose de 0,12 µg/sítio reduziu a severidade das convulsões de 46,5 escores no grupo controle para 29 escores no grupo tratado ($p = 0,0275$; Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney; figuras 20 e 21). O controle positivo diazepam (1 mg/kg i.p.) promoveu um aumento na latência e reduziu a duração da primeira convulsão, além de reduzir a severidade das convulsões e proteger os animais da morte em todos os experimentos, com os seguintes valores: latência: 30 (30 – 30) ($p = 0,0017$), 30 (30 – 30) ($p = 0,00035$), 9,9 (4,45 – 30) ($p = 0,0025$) s; duração da primeira convulsão: 0 (0 – 0) ($p = 0,0017$), 0 (0 – 0) ($p = 0,00034$), 7 (0 – 8) ($p = 0,05$) s; severidade das convulsões: 1 (0 – 1) ($p = 0,0017$), 1 (0 – 3) ($p = 0,00034$), 3 (1 – 10) ($p = 0,00023$) escores, e proteção das mortes: 0 ($p = 0,035$), 0 ($p = 0,0000$), 0 ($p = 0,0024$) %, respectivamente para os experimentos com, EH, FB e VE, em cada um dos parâmetros analisados.

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

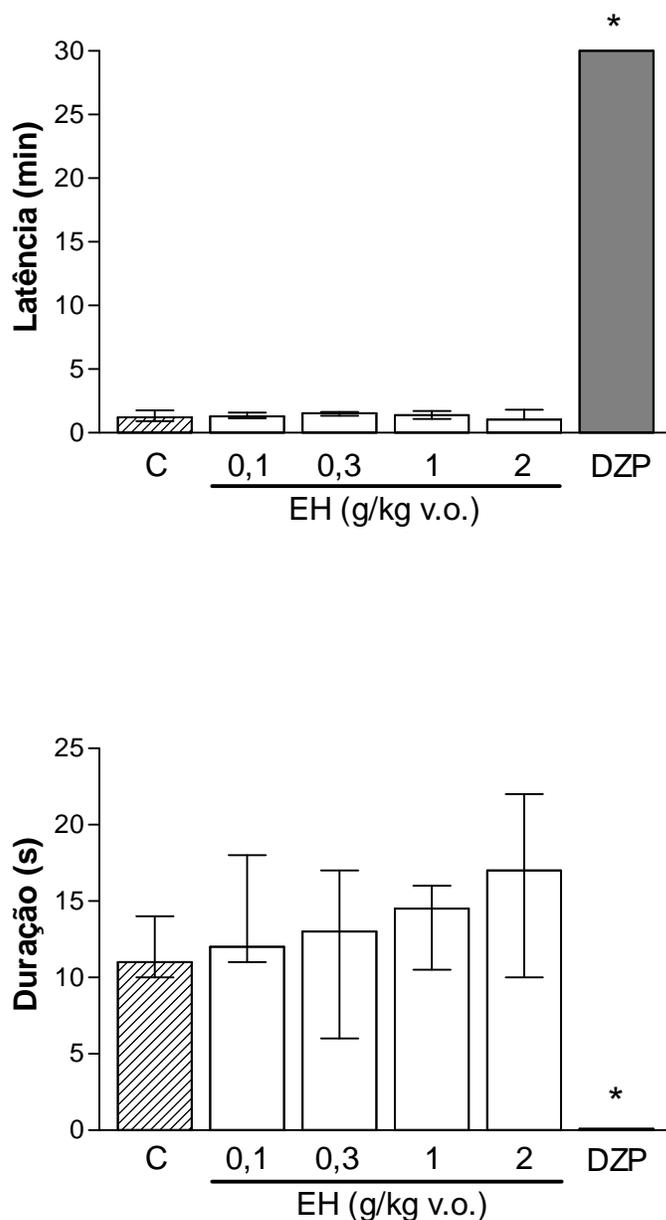


Figura 16 - Latência e duração da primeira convulsão durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 8 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

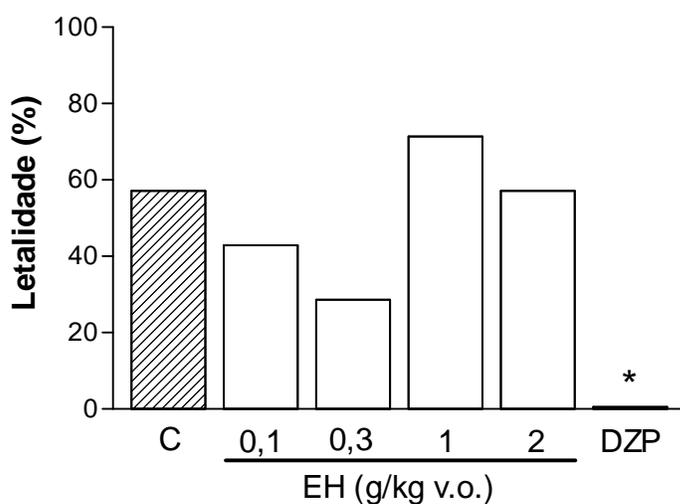
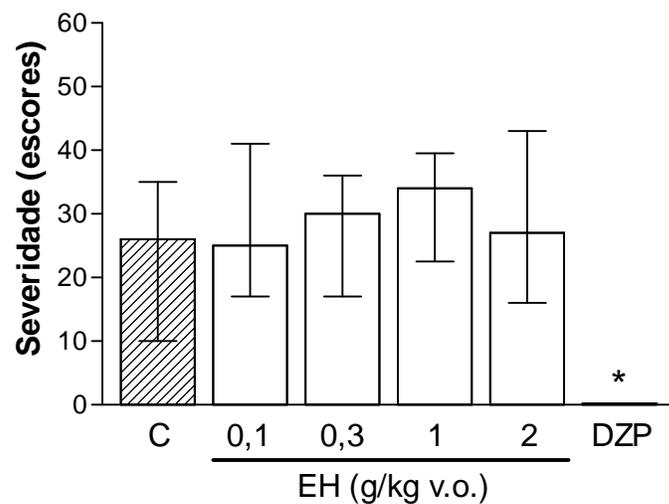


Figura 17 - Severidade das convulsões e letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 8 animais, e como percentagem de letalidade. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney para severidade, e teste de Fisher para número de mortes).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

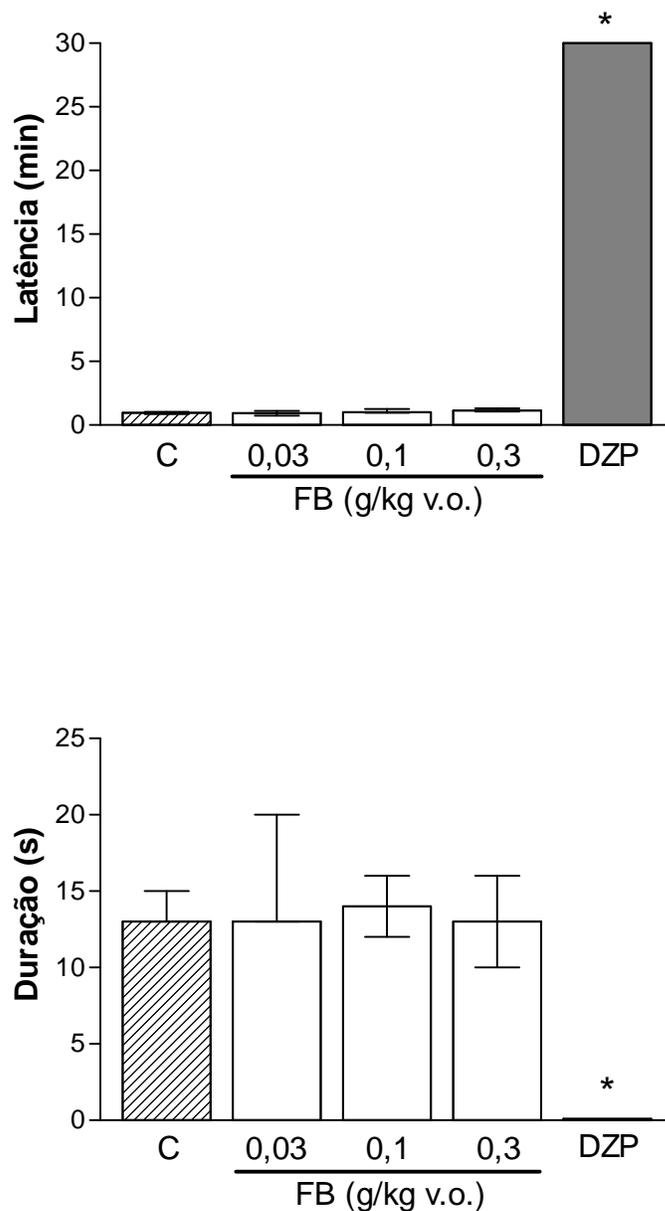


Figura 18 - Latência e duração da primeira convulsão durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 9 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

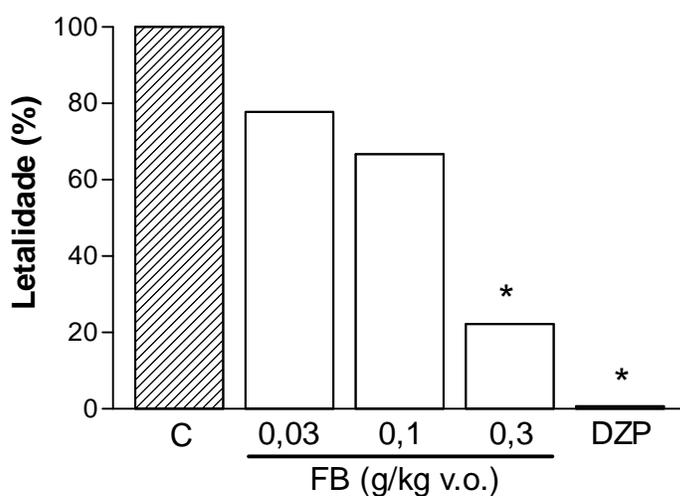
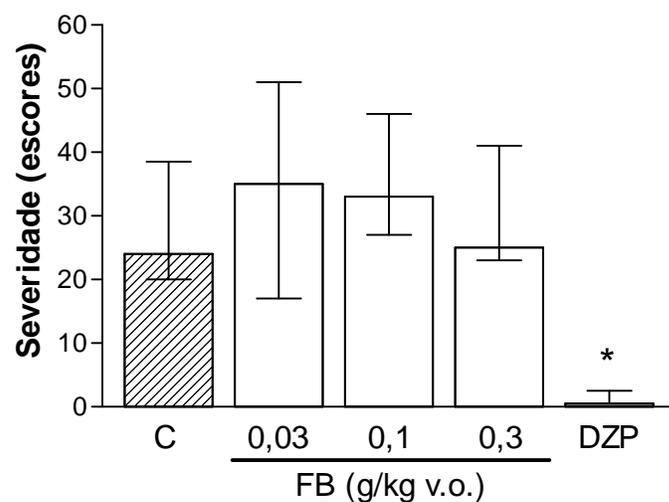


Figura 19 - Severidade das convulsões e letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 9 animais, e como percentagem de letalidade. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney para severidade, e teste de Fisher para número de mortes).

VERBASCOSÍDEO

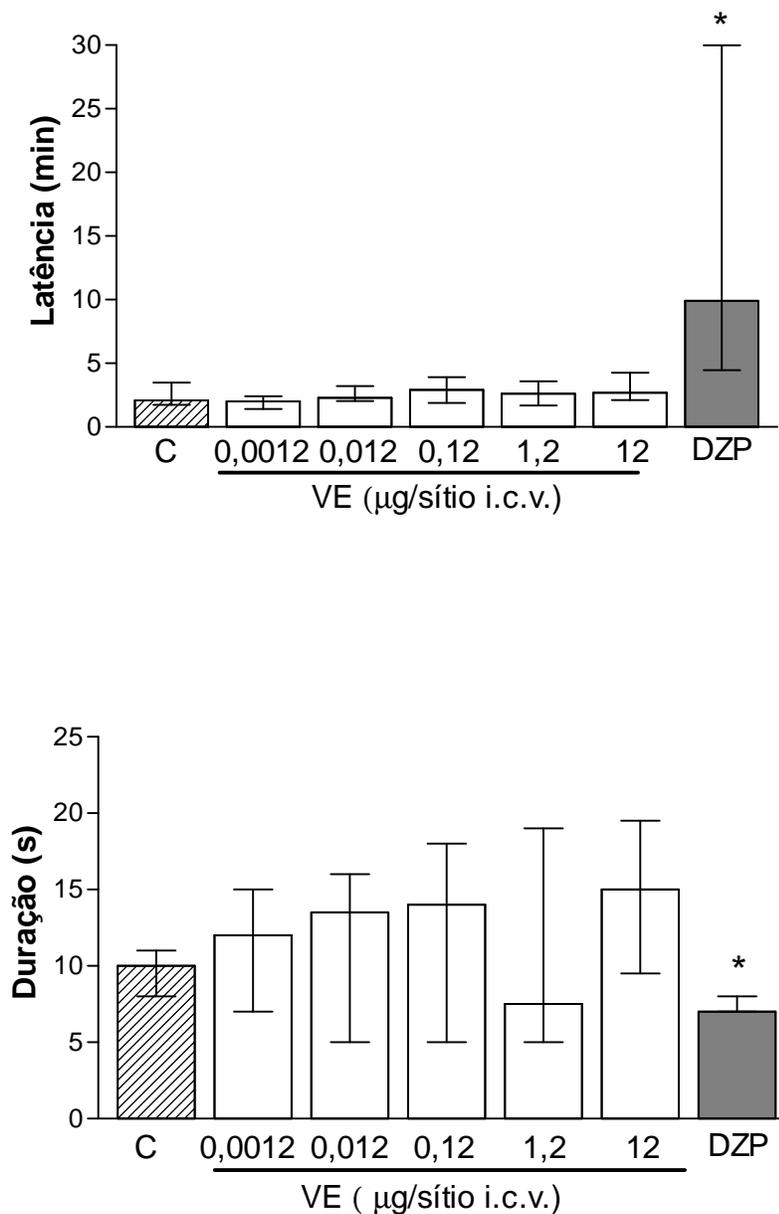


Figura 20 - Latência e duração da primeira convulsão durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 8 - 10 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney para latência, duração e severidade, e teste de Fisher para número de mortes).

VERBASCOSÍDEO

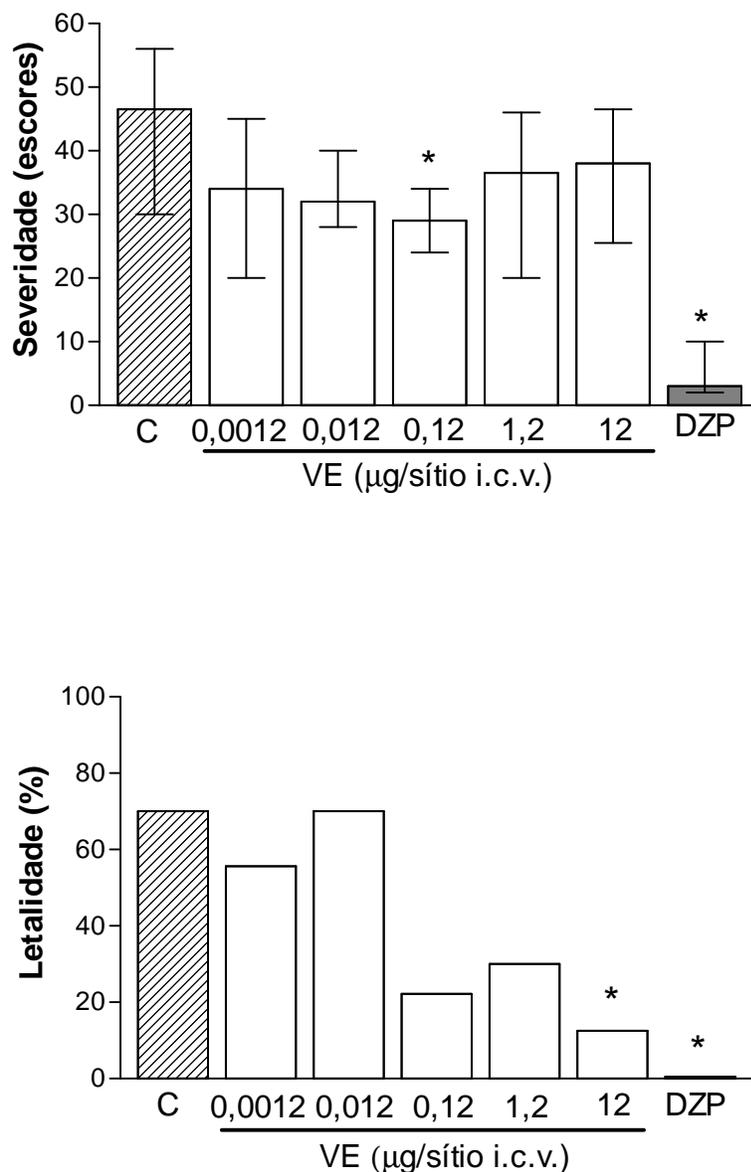


Figura 21. Severidade das convulsões e letalidade durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.), 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 8 - 10 animais, e como porcentagem de letalidade. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney para severidade, e teste de Fisher para número de mortes).

4.4 Atividade Antidepressiva

O modelo de suspensão pela cauda destina-se a investigar uma possível atividade antidepressiva das preparações. Uma vez que diversos sistemas centrais estão envolvidos com a depressão e ansiedade, entre eles o sistema serotoninérgico e GABAérgico, optou-se por testar as preparações também neste modelo.

Nenhuma das preparações testadas, nas doses selecionadas, foi capaz de interferir com a latência e a duração da imobilidade no modelo da suspensão pela cauda ($p > 0,05$; figuras 22 - 24), que indicasse um efeito tipo-antidepressivo. No entanto, o tratamento com VE, na dose de $0,12 \mu\text{g/sítio}$, promoveu uma redução da latência para a imobilidade de 82 (30 - 108) s no grupo controle para 17 (10 - 27) s no grupo tratado ($p = 0,025$). O tratamento com o controle positivo imipramina (15 mg/kg i.p.) foi capaz de aumentar a latência para a imobilidade além de reduzir o tempo de imobilidade dos animais em todos os experimentos: 134 (106 - 202) ($p = 0,0017$), 114,5 (105 - 134) ($p = 0,029$) e 143 (94 - 153) ($p = 0,035$)s de latência e 20 (10 - 79) ($p = 0,017$), 63,5 (20 - 94) ($p = 0,0098$) e 35 (21 - 73) s ($p = 0,017$) de imobilidade nos experimentos com EH, FB e VE, respectivamente.

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

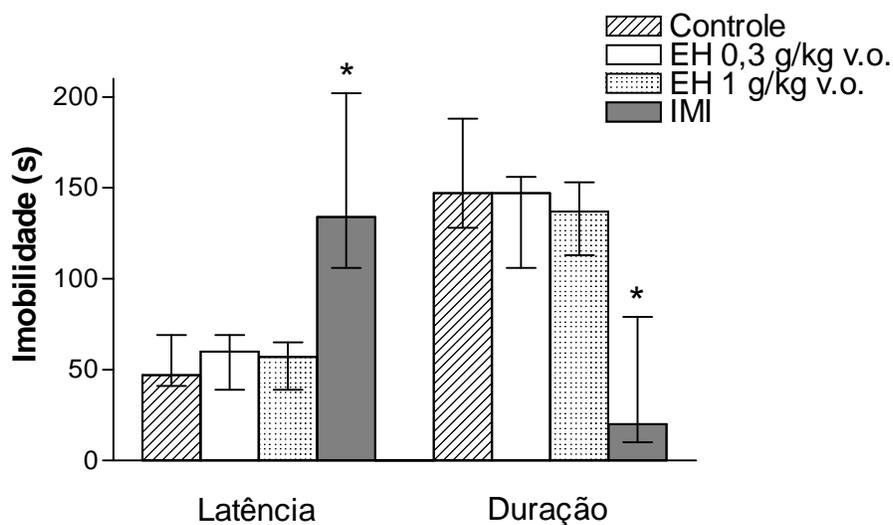


Figura 22 - Latência e duração da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 animais. A imipramina (IMI - 15 mg/kg i.p.) foi usada como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

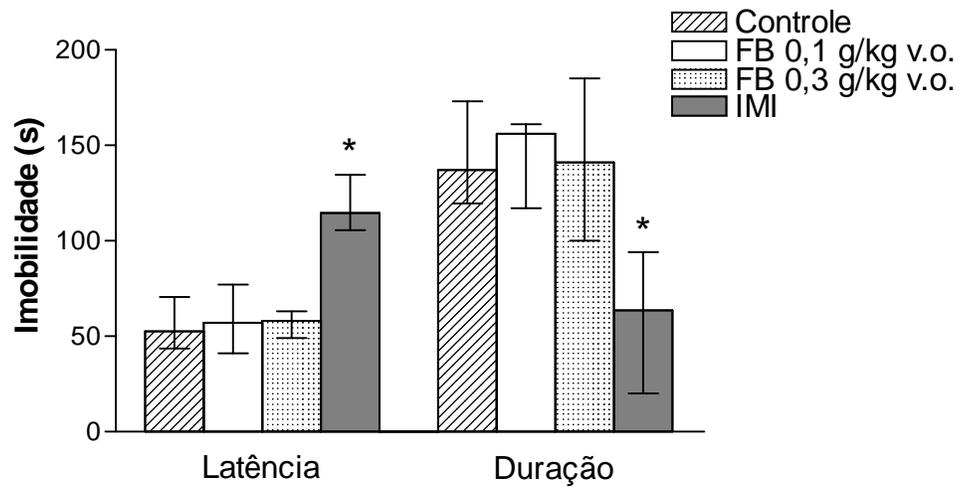


Figura 23 - Latência e duração da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 8 animais. A imipramina (IMI - 15 mg/kg i.p.) foi usada como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

VERBASCOSÍDEO

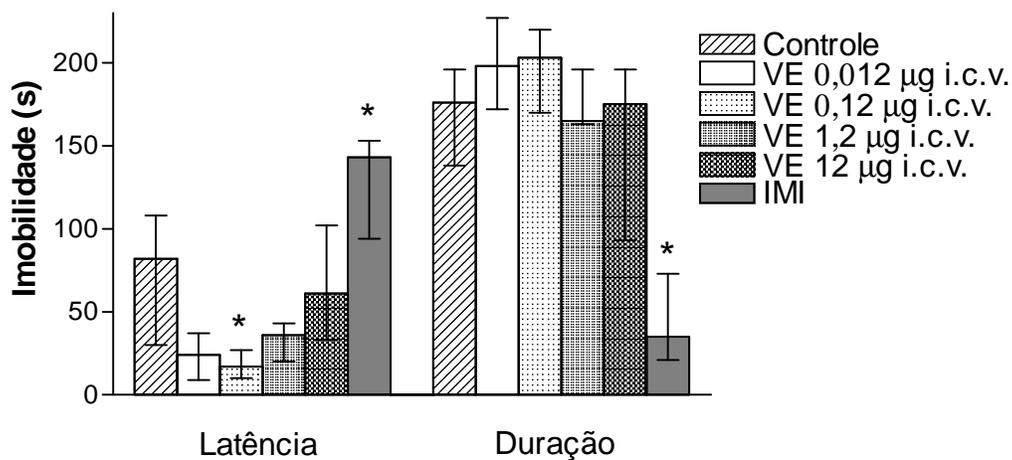


Figura 24 - Latência e duração da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 animais. A imipramina (IMI - 15 mg/kg i.p.) foi usada como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

4.5 Atividade Ansiolítica

Uma vez que a atividade hipno-sedativa poder estar associada à atividade ansiolítica, principalmente quando se considera o sistema GABAérgico (MÖHLER, et al., 2004), selecionou-se as doses das preparações (EH, FB e VE) que apresentaram melhores resultados nos modelos anteriores (sono, temperatura e convulsão) para serem investigadas num modelo de ansiedade, o teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Os parâmetros analisados neste modelo foram: porcentagem de tempo nos braços abertos (TA) e porcentagem de entradas nos braços abertos (EAB), ambos indicativos de atividade ansiolítica, e número de entradas nos braços fechados (EF), medida indicativa da atividade locomotora. Além disso, quatro parâmetros comportamentais não convencionais foram registrados: estiramentos corporais, que indicam avaliação de risco/ efeito tipo ansiogênico; imersões de cabeça, que indicam atividade exploratória e sugerem efeito do tipo ansiolítico; comportamento de levantar, indicativo de atividade exploratória e, por fim, o comportamento de auto-limpeza, indicativo de efeito tipo ansiogênico.

Os tratamentos com o EH e a FB não foram capazes de interferir nos parâmetros analisados no LCE ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney) (figuras 25 - 28). Entretanto, o tratamento com o VE reduziu o número de entradas nos braços fechados de 9 (5,5 - 12,5) no grupo controle para 3 (1 - 6,5) ou 2 (1 - 4,5) entradas nos grupos tratados com as doses de 0,12 ou 12 $\mu\text{g/sítio}$ i.c.v. ($p = 0,046$ e $p = 0,018$; respectivamente; figura 29). O tratamento com o VE, na dose de 1,2 $\mu\text{g/sítio}$ i.c.v, foi capaz de reduzir o número de imersões de cabeça ($p = 0,045$) de 7 (5 - 9) (controle) para 2,5 (2 - 5) imersões; e o comportamento de levantar de 5 (3 - 8,5) para 1 (0 - 2) comportamento ($p = 0,020$; figura 30). O tratamento com o controle positivo diazepam (1 mg/kg i.p.), conforme esperado, aumentou a porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, sem interferir com o número de entradas nos braços fechados, tendo também aumentado o número de imersões de cabeça nos experimentos. Os demais parâmetros e doses testadas não produziram efeito significativo ($p > 0,05$).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

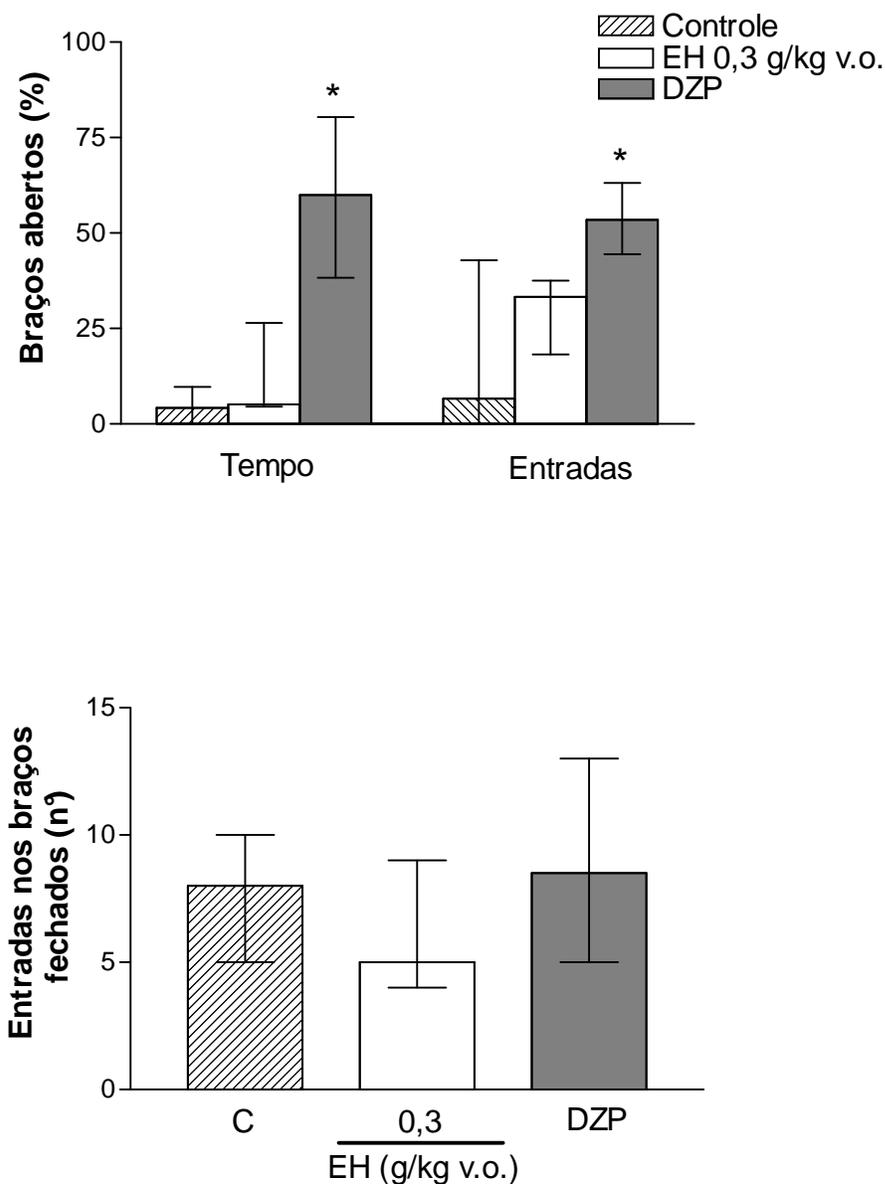


Figura 25 - Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do LCE, 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

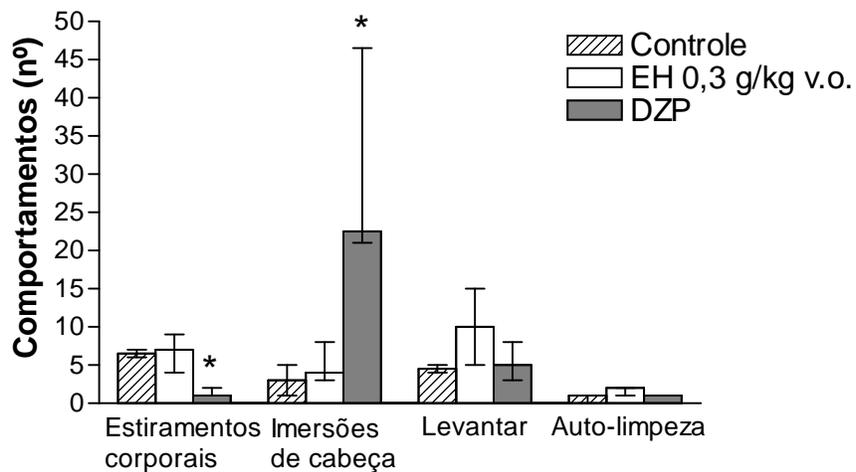


Figura 26 - Comportamentos observados no LCE, 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

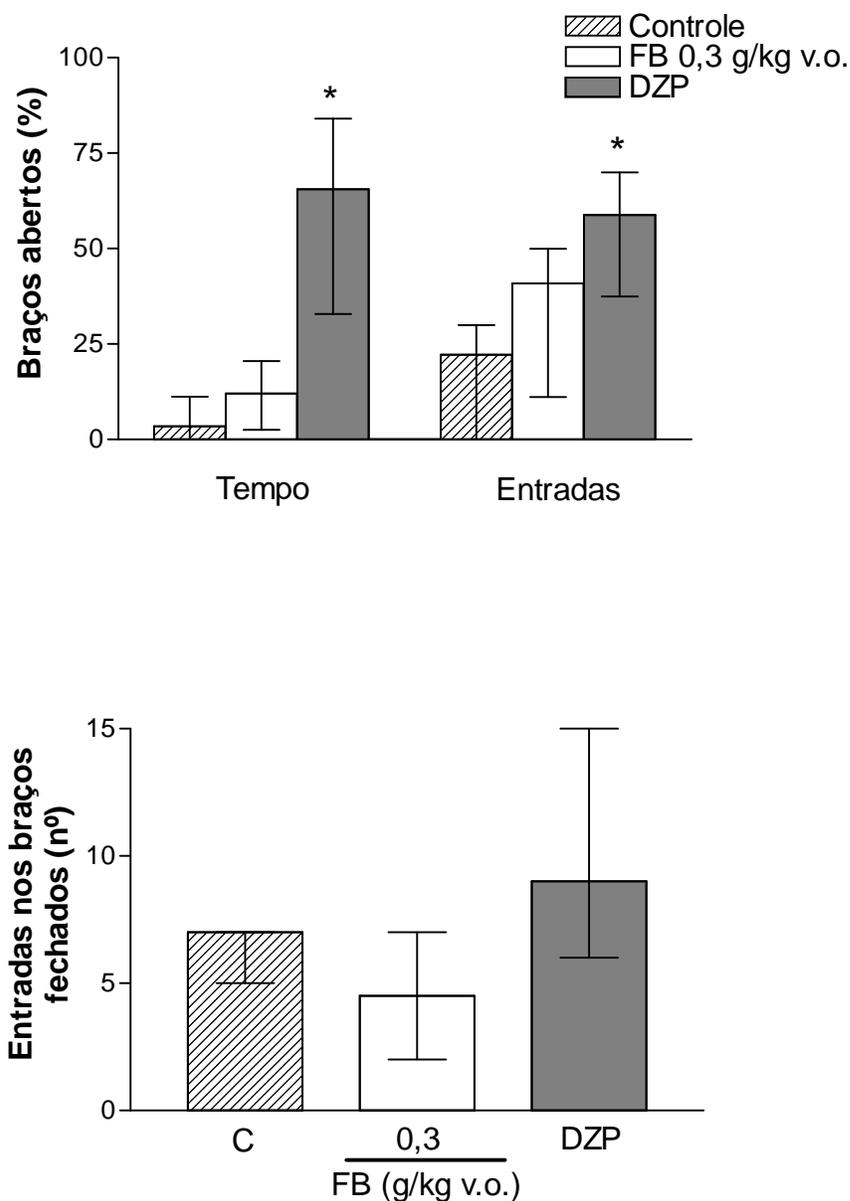


Figura 27 - Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do LCE, 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 10 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

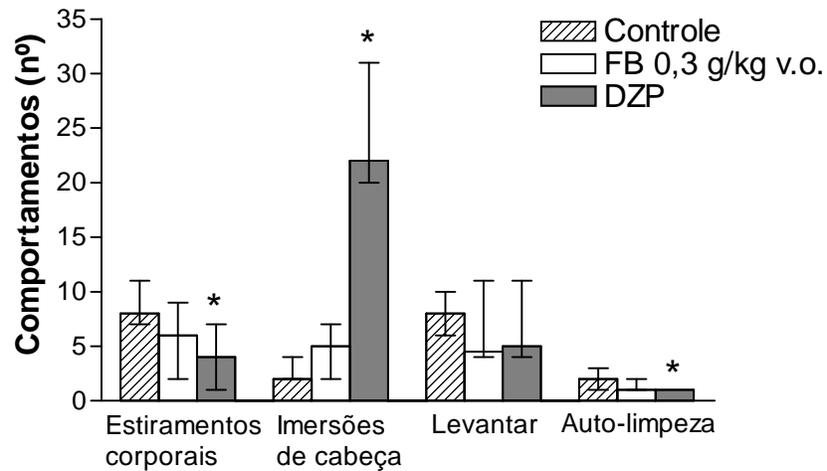


Figura 28 - Comportamentos observado no LCE, 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 7 - 10 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

VERBASCOSÍDEO

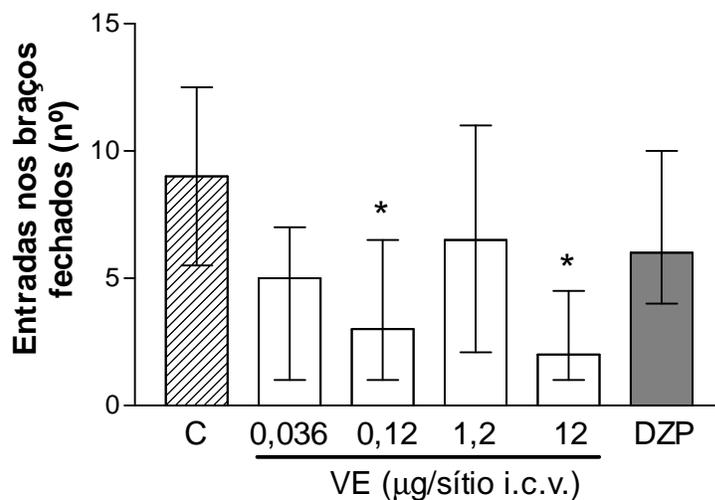
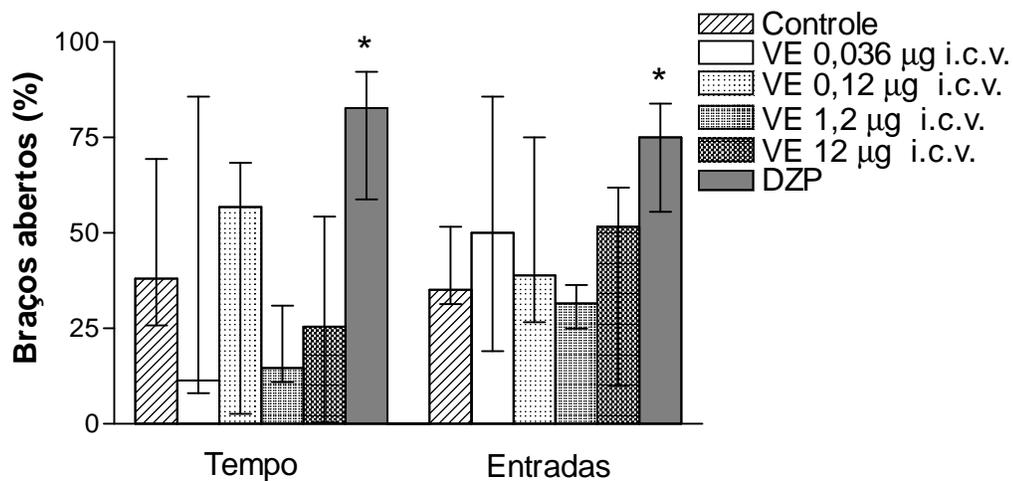


Figura 29 - Porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do LCE, 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 8 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

VERBASCOSÍDEO

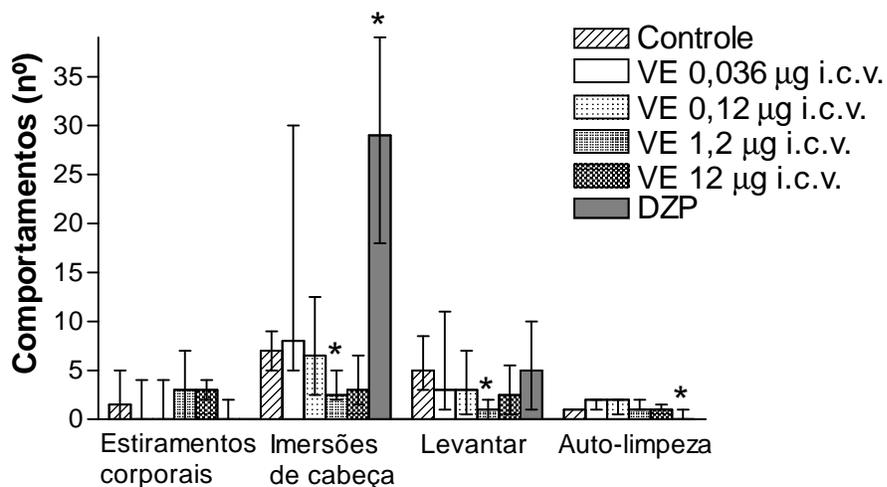


Figura 30 - Comportamentos observados no LCE, 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 8 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

4.6 Atividade sedativa/ relaxante muscular

Buscando elucidar a atividade sedativa das preparações, optou-se por testar doses selecionadas, a partir dos testes anteriores, em dois modelos para avaliar performance motora/ miorelaxamento: o rota-rod e o teste do arame.

Nenhuma das preparações testadas, nas doses selecionadas, foi capaz de interferir no tempo de permanência na barra giratória do rota-rod ou na capacidade de realizar a prova do arame ($p > 0,05$; figuras 31 - 36). O tratamento com o diazepam, na dose de 1 mg/kg i.p., não foi capaz de reduzir o tempo de permanência no rota-rod. Na dose de 1,5 mg/kg i.p. foi capaz de prejudicar o desempenho da tarefa no teste do arame, reduzindo o êxito de 100 % no grupo controle para 33 %, funcionando como controle positivo neste modelo em todos os experimentos ($p = 0,02$).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO

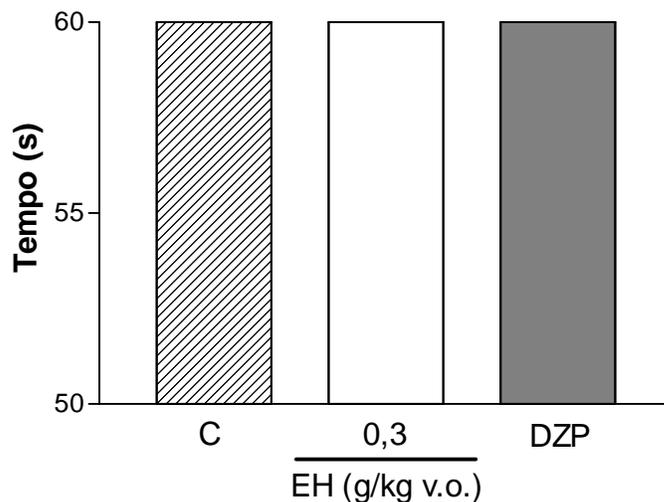


Figura 31 - Tempo de permanência na barra giratória do rota-rod, 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

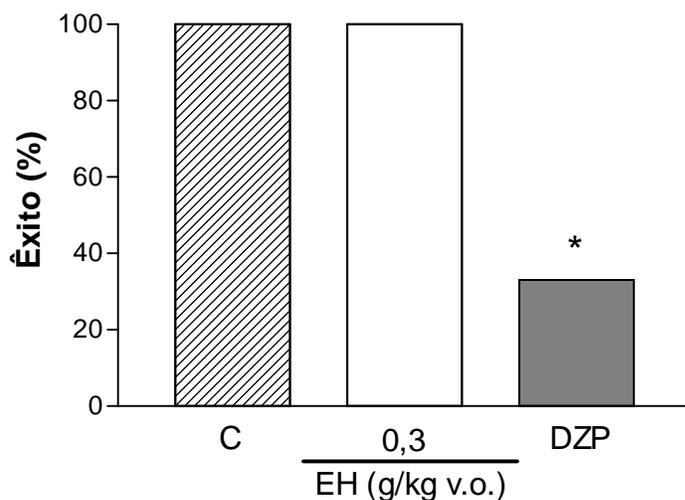


Figura 32 - Porcentagem de êxito no teste do arame, 1 h após o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) de *L. alba*. O número de animais a completar a prova está expresso como porcentagem de êxito de 6 - 7 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (teste de Fisher).

FRAÇÃO BUTANÓLICA

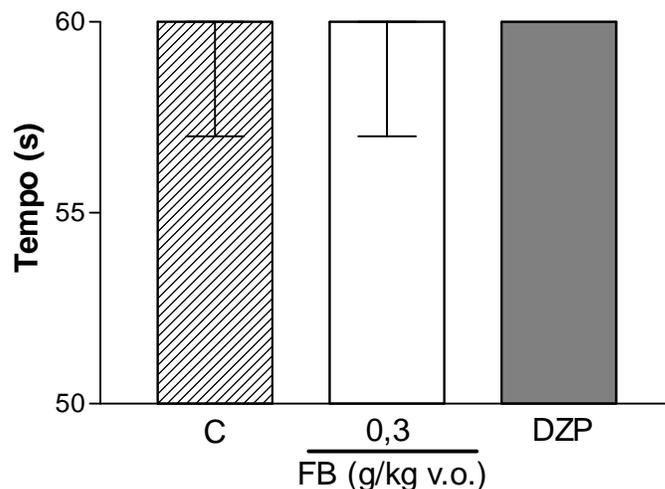


Figura 33 - Tempo de permanência na barra giratória do rota-rod, 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 7 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

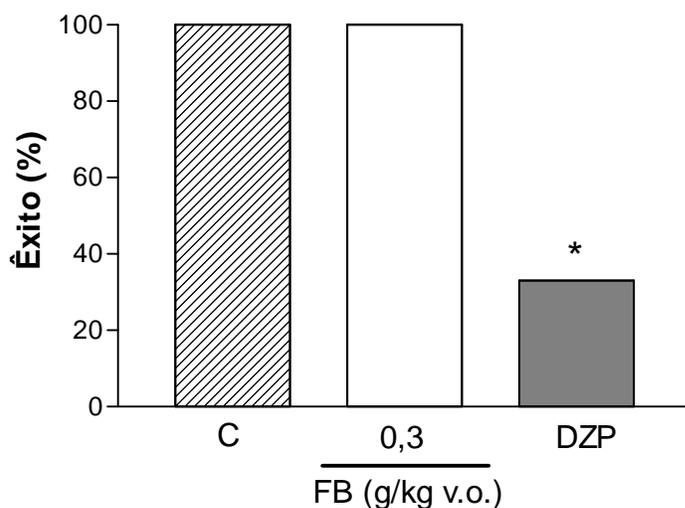


Figura 34 - Porcentagem de êxito no teste do arame, 1 h após o tratamento com a fração butanólica (FB) de *L. alba*. O número de animais a completar a prova está expresso como porcentagem de êxito de 6 - 7 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (teste de Fisher).

VERBASCOSÍDEO

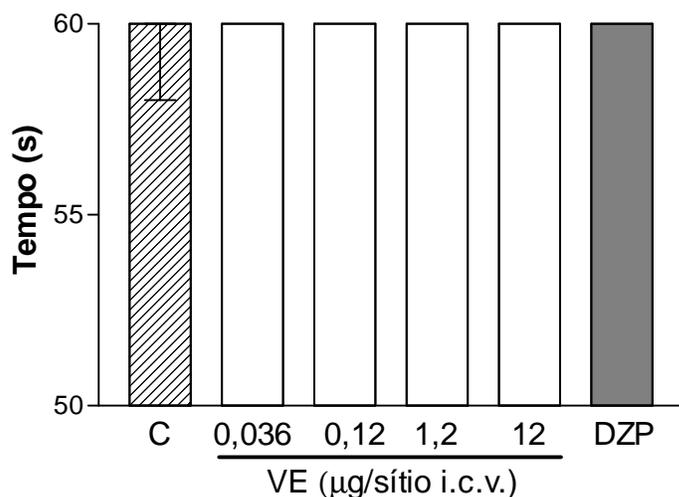


Figura 35 - Tempo de permanência na barra giratória do rota-rod, 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. Os valores estão expressos como mediana e intervalo interquartil de 6 - 8 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney).

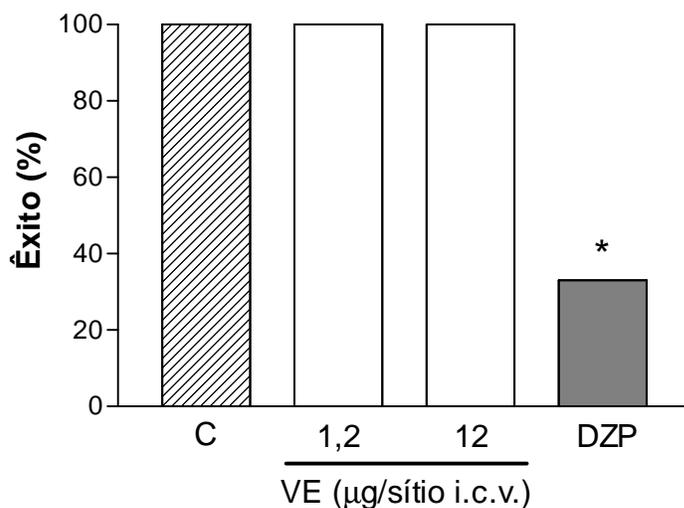


Figura 36 - Porcentagem de êxito no teste do arame, 5 min após o tratamento com o verbascosídeo (VE) de *L. alba*. O número de animais a completar a prova está expresso como porcentagem de êxito de 6 - 8 animais. O diazepam (DZP) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (teste de Fisher).

4.7 Efeito sinérgico do VE e Diazepam

Objetivando confirmar o efeito hipno-sedativo do VE, investigou-se se havia sinergismo entre os efeitos do DZP e do VE no teste do arame, uma vez que o VE não demonstrou efeito positivo *per se* neste modelo (figura 36).

Utilizou-se uma dose de diazepam, inferior àquela que produziu efeito no teste do arame, 1 mg/kg i.p. (DZP 1), seguida da administração do VE (12 µg/sítio i.c.v).

Como controle positivo foi utilizado diazepam na dose de 1,5 mg/kg i.p (DZP 1,5).

Os tratamentos com diazepam foram realizados 30 min antes da exposição ao modelo. Todos animais receberam injeção i.c.v. de veículo (controle, diazepam 1 ou 1,5 mg/kg) ou de verbascosídeo (grupo VE ou VE + DZP 1), 5 min antes do teste (figura 37).

Os tratamentos com diazepam na dose de 1 mg/kg ou de verbascosídeo (12 µg/sítio i.c.v.) não foram capazes de promover miorelaxamento nos animais, ou seja, prejuízo na capacidade de apreensão do arame ($p > 0,05$). No entanto, o tratamento com o DZP 1 e VE foi capaz de prejudicar o desempenho da tarefa ($p = 0,0004$), reduzindo a porcentagem de êxito de 100 % no grupo controle, para 10 % no grupo tratado (figura 38). O grupo tratado somente com VE obteve 100 % de êxito em desempenhar a tarefa, enquanto o grupo tratado com DZP 1 obteve êxito de 85,71 % . O DZP 1,5 (diazepam 1,5 mg/kg i.p.) reduziu o desempenho para 28,57 %, funcionando como controle positivo ($p = 0,0105$).

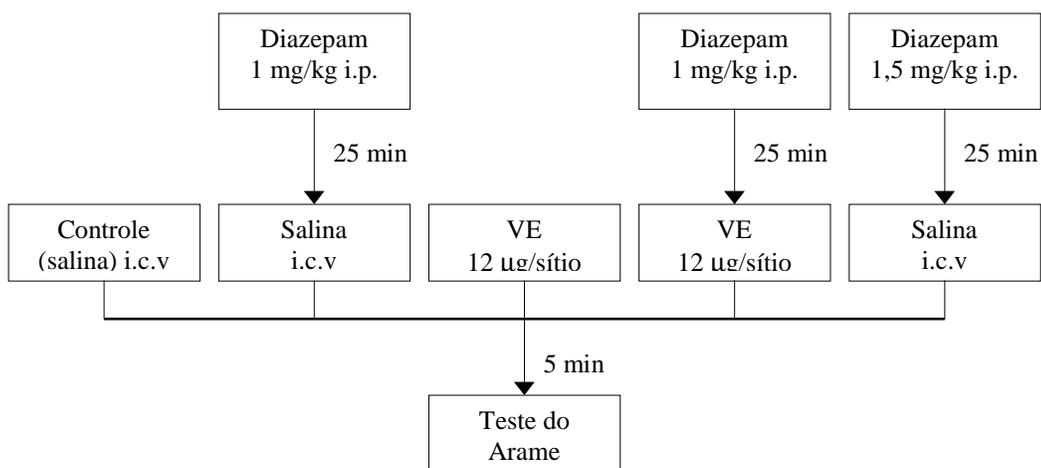


Figura 37 – Representação do protocolo de sinergismo VE e DZP.

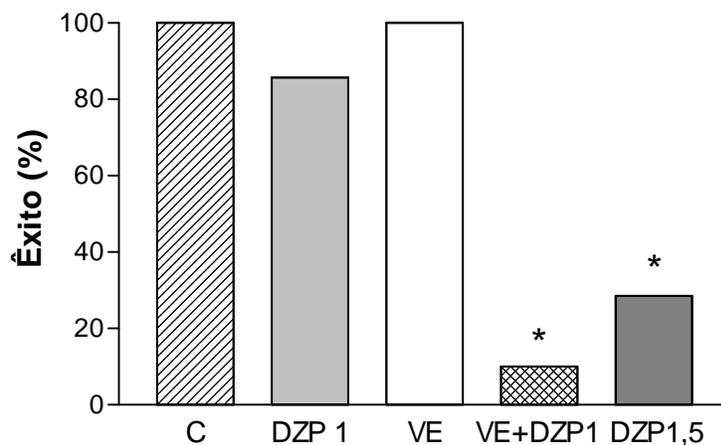


Figura 38 - Desempenho no teste do arame, após o tratamento com o diazepam 1 mg/kg i.p. (DZP 1), verbascosídeo 12 µg/sítio (VE), VE e DZP 1, ou diazepam 1,5 mg/kg (DZP 1,5). Todos os animais receberam injeção de veículo i.c.v. O número de animais a completar a prova está expresso como porcentagem de êxito de 7 - 10 animais. O diazepam (DZP 1,5) foi usado como controle positivo, e os tratamentos foram comparados com o grupo controle (salina). * $p < 0,05$ (teste de Fisher).

Experimentos									
Preparação testada	Doses e via	Sono Barbitúrico	Sono Etéreo	Temperatura Retal	Convulsões por PTZ	Labirinto em cruz	Rota -Rod	Arame	Suspensão pela cauda
Extrato Aquoso	0,1	-	---	-	---	---	---	---	---
	0,3	-	---	-	---	---	---	---	---
	1	-	---	-	---	---	---	---	---
	2 g/kg v.o.	-	---	+	---	---	---	---	---
Extrato Hidroalcolóico	0,1	-	---	-	-	---	---	---	---
	0,3	-	---	+	-	-	-	-	-
	1	-	---	+	-	---	---	---	-
	2 g/kg v.o.	-	---	-	-	---	---	---	---
Fração Butanólica	0,03	-	---	-	-	---	---	---	---
	0,1	-	---	+	-	---	---	---	-
	0,3 g/kg v.o.	+	-	+	+	-	-	-	-
Verbascosídeo	0,0012	↑duração	-	+	+	-	-	-	-
	0,012	---	-	---	-	---	---	---	---
	0,036	---	-	-	-	---	-	---	-
	0,12	-	+	+	+	+	-	---	+
	1,2	-	+	+	-	+	-	-	-
	12 μg/sítio i.c.v.	---	+	+	+	+	+	-	-
		↑duração	↑duração	↓temperatura	↓temperatura	↓severidade	↓EF		↓latência

(+) = Resultado significativo (p<0,05); (-) = Resultado não significativo (p>0,05); (---) = Dose não testada no experimento; (↑) = Aumento; (↓) = Redução.

Quadro 5 – Quadro Resumo dos resultados obtidos nos experimentos

5 DISCUSSÃO

Efeitos sedativos já foram descritos tanto para óleos voláteis (VALE et al., 1999) como para os extratos hidroalcoólicos (SANTOS et al. 1998; ZÉTOLA et al., 2002) de *L. alba*, indicando que compostos não voláteis são também responsáveis pelo efeito sedativo observado para esta espécie. Klueger e colaboradores (1996) propuseram que a *L. alba* possui uma atividade depressora inespecífica do SNC, decorrente possivelmente de uma ação fisiológica periférica como hipotensão e/ou hipotermia, o que já foi descrito para outras espécies vegetais. Entretanto, Guerrero e colaboradores (2002) não observaram atividade hipotensora em ratos naturalmente hipertensos ou ratos Wistar tratados com extrato etanólico de *Lippia alba*, via intravenosa, descartando a possibilidade de um efeito hipotensor ser responsável pela depressão geral observada após tratamento sistêmico com a *L. alba*.

Neste trabalho, investigou-se as atividades centrais de dois extratos, de uma fração e de uma substância isolada de *L. alba*. Buscou-se identificar quais preparações têm efeito central e se a substância isolada da fração butanólica poderia participar dos efeitos centrais desta espécie vegetal.

Para verificar a atividade hipno-sedativa, utilizou-se, inicialmente, os modelos do sono barbitúrico e/ou sono etéreo. Neste modelo, fármacos que deprimem o SNC em geral reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono, como o pentobarbital, ligante de sítios localizados nos receptores GABAérgicos do tipo A (CHWEH et al., 1987, LANCEL, 1999). Os benzodiazepínicos apresentam esse efeito, evidenciado principalmente pelo prolongamento da duração do sono induzido por agentes hipnóticos, o que foi bem observado nos resultados obtidos, quando o diazepam promoveu aumento do tempo de sono tanto barbitúrico como etéreo.

Alguns flavonóides, exercem efeitos depressores do SNC por interagirem com receptores benzodiazepínicos (VIOLA et al., 1995; WOFMAN et al., 1994), o que poderia contribuir para este efeito depressor central da espécie em estudo, uma vez que flavonóides estão presentes nas espécies de *Lippia* embora haja poucos estudos detalhando-os (PASCUAL et al., 2001b; SOARES, 2001). Já foi descrito um efeito do tipo sedativo para os extratos hidroalcoólicos de *L. alba* (Santos et al., 1998; Zétola et al., 2002), no modelo do sono induzido por pentobarbital. Segundo Zétola e

colaboradores (2002), a correlação entre o conteúdo de flavonóides e o efeito sedativo sugere que esse efeito seja devido à presença destes compostos. No entanto, Klueger e colaboradores (1997), testando a FB por v.o. ou i.p., em camundongos, não encontraram atividade no modelo do sono barbitúrico. Os resultados aqui obtidos para a mesma fração sugerem um efeito sedativo, uma vez que se observou uma potenciação do sono induzido pelo pentobarbital (na dose de 0,3 g/kg, v.o., 1 h após o tratamento oral com a FB); mas este efeito não foi confirmado no modelo do sono etéreo. No entanto, isso não descarta uma ação hipno-sedativa real, pois apenas uma dose de FB foi usada e há necessidade de ampliar a faixa de doses estudada para confirmar a ausência, ou não, de efeito hipno-sedativo no modelo do sono induzido por éter etílico.

Esses dados sugerem que a potencialização do sono barbitúrico pela FB pode ter ocorrido devido à uma interferência de ordem farmacocinética, como já descrito para a *Stachytarpheta cayennensis*, o que pode levar a um resultado falso positivo na avaliação do efeito sedativo/hipnótico no modelo do sono induzido pelo pentobarbital (VIEIRA, 2001). As enzimas hepáticas, envolvidas no processo de metabolização de diversos compostos, são importantes para a metabolização dos barbitúricos no organismo animal (PACIFICI; FRACCHIA, 1995), sendo também usadas na metabolização de outros xenobióticos como os constituintes de plantas ditas medicinais.

A este respeito, há alguns trabalhos mostrando a interação farmacocinética entre espécies de plantas, como *Smilax* sp, *Eucalyptus globulus*, *Blupearum falcatum*, *Piper methysticum*, *Stachytarpheta cayennensis*, entre outras, com fármacos tais como diazepam, álcool etílico e barbitúricos (BLUMENTHAL, 2000; BLUMENTHAL et al., 1998; CUPP, 1999; HU et al., 2005; VIEIRA, 2001).

Assim, a potencialização do sono induzido por barbitúrico poderia ser resultado de uma interferência, competição ou inibição do sistema microssomal hepático, o qual metaboliza o pentobarbital sódico. A administração de *Hypericum perforatum*, por exemplo, afeta o sistema micromossomal hepático P450, aumentando a atividade da isoenzima, CYP3A4, o que reduz possivelmente a atividade de fármacos que são substratos para essa enzima e que são administrados simultaneamente com a mesma, incluindo anti-histamínicos não-sedativos, contraceptivos orais, alguns anti-retrovirais, antiepilépticos, bloqueadores de canais de cálcio, ciclosporina, alguns

quimioterápicos, antibióticos macrolídeos, e antifúngicos (ROBY et al., 1999; 2000). Alguns compostos presentes na FB poderiam estar contribuindo para esse efeito potencializador do sono barbitúrico, como por exemplo, o próprio verbascosídeo, uma vez que o ele foi capaz de inibir este sistema microsomal hepático P 450 (LEE et al., 2004).

A interferência farmacocinética da FB sobre as enzimas hepáticas deve ser melhor investigada para se compreender seus efeitos farmacológicos, mas principalmente pela questão de segurança farmacológica, já que o uso concomitante com muitos outros fármacos é muito comum, e pode interferir com seus efeitos terapêuticos.

Ao testar o verbascosídeo, constituinte majoritário da FB, observou-se que esta substância foi capaz de reduzir a latência do sono etéreo na dose de 0,036 µg/sítio e potencializar a duração do sono nas doses de 0,12, 1,2 e 12 µg/sítio, quando administrado centralmente. Considerando que a via de administração do verbascosídeo não possibilita uma interferência farmacocinética expressiva, pode-se dizer que o constituinte contribui para o efeito hipno-sedativo da *L. alba*, mais especificamente da FB. No entanto, não observamos efeito significativo no sono induzido por pentobarbital. Este resultado pode ser esperado em virtude da curta duração de ação (de até 10 min) do verbascosídeo por esta via, consideravelmente inferior ao tempo do experimento (até 180 min), e do tempo de sono registrado para o grupo controle neste modelo (cerca de 60 min). O fato de não ter sido encontrado efeito positivo no modelo do sono etéreo para a FB, apesar da presença do VE na fração, pode ser atribuído a via de administração oral, o que permite um maior distribuição periférica do VE presente na fração, fazendo com que, na dose testada, uma parcela não significativa do mesmo atinja o SNC, e assim não seja capaz de promover um efeito positivo da FB no teste do SE, além disso, a presença de outros compostos na fração podem interagir e influenciar o resultado farmacológico final neste teste. Não foi também possível observar resultado positivo no modelo de sono barbitúrico teste-se o EA e o EH, possivelmente pelos constituintes ativos estarem em pequenas concentrações nestas duas preparações, e o uso da via sistêmica não proporcionar a chegada da substância em uma concentração efetiva central.

No tocante à temperatura corporal, mostrou-se com os resultados que o EA, o EH, a FB e o verbascosídeo foram capazes de reduzir as temperaturas corporais, quando comparadas às do grupo controle. Mecanismos inicialmente de ação periférica, como

vasodilatação ou hipoglicemia, podem contribuir para hipotermia (BUCHANAN et al., 1991) e ser considerados nos tratamentos via oral; no entanto, a via intracerebroventricular de administração do verbascosídeo e o curto período de início de atividade, 5 min, sugerem claramente seu efeito central.

Alguns mecanismos envolvidos na hipotermia podem estar correlacionados com a resposta ao sono experimental (CIRONE et al., 2004; DE FIEBRE; COLLINS, 1992), embora a primeira tenha sido observada em doses inferiores àquelas que potencializaram o sono. No caso do EA e EH, as doses de 2 g/kg (EA), e de 0,3 e 1 g/kg (EH) promoveram hipotermia, conforme descrito por Santos e col. (1998) para o extrato hidroalcoólico da *L. alba*, que relataram uma redução da temperatura de até 2°C em camundongos que receberam extratos etanólicos a 40 % e 80 %. Entretanto, mesmo tendo reduzido a temperatura retal, o EA e o EH não foram capazes de potencializar o sono barbitúrico. O mesmo pode ser pensado para explicar o resultado obtido com a dose de 0,1 g/kg da FB, embora a dose de 0,3 g/kg da FB e três doses do verbascosídeo (0,12, 1,2 e 12 µg/sítio) tenham sido efetivas nos dois modelos: temperatura e sono.

A temperatura corporal pode ser usada como índice de alterações de diversos neurotransmissores centrais como dopaminérgicos ou serotoninérgicos (LIN; CHUANG, 2002; SANCHEZ, 1989), bem como para distinguir entre agonistas totais ou parciais de receptores benzodiazepínicos (JACKSON; NUTT, 1990). Experimentos feitos com roedores mostraram que a estimulação dos receptores GABA_B produz hipotermia de origem central, demonstrada pela administração intracerebroventricular do agonista GABA_B baclofeno (GRAY et al., 1987), e que o tônus promovido pela ativação destes receptores modula os efeitos mediados pelos receptores GABA_A (QUÉVA et al., 2003). Sugere-se então que esta regulação, feita por algumas substâncias endógenas, esteja associada à atividade de neurônios termossensíveis e que o sítio de atuação seja o centro termorregulador hipotalâmico (YAKIMOVA et al., 1996). Além disso, alguns neurotransmissores, tais como serotonina, dopamina e norepinefrina, agem na região preótica e hipotálamo anterior, onde regulam a temperatura corporal em condições como a hipóxia, interferindo, por exemplo, com mecanismos como a de perda de calor (GARGAGLIONI et al., 2005; HASEGAWA et al., 2005).

Por se tratar de um mecanismo complexo, estudos devem ser conduzidos no intuito de elucidar quais mecanismos poderiam estar envolvidos com a hipotermia induzida pelos extratos, frações e substância isolada da *L. alba*. No entanto, estes resultados positivos contribuem para reforçar a hipótese de um efeito sedativo central.

Para analisar uma possível atividade anticonvulsivante submetemos os animais ao modelo das convulsões induzidas por PTZ. O tratamento com o EH não interferiu, de forma significativa, em todos os parâmetros analisados, embora a dose de 0,3 g/kg tenha reduzido a mortalidade dos animais de 57,1 % no grupo controle, para 28,6 % no grupo tratado com o EH. Esta dose também mostrou o melhor resultado no modelo da temperatura retal.

Para a FB (50 e 100 mg/Kg) já foi descrita atividade anticonvulsivante no modelo das convulsões induzida por pentilenotetrazol, com redução significativa do número de convulsões (SOARES, 2001). Os resultados aqui obtidos não foram significativos nos parâmetros latência e duração da primeira convulsão para todas as preparações/doses testadas. Quando analisou-se o parâmetro severidade das convulsões também não foi verificado qualquer efeito significativo; entretanto, vale ressaltar que, no modelo de convulsão utilizado e na dose de PTZ utilizada, alguns animais do grupo controle morreram nos minutos iniciais do experimento, o que gerou um curto período de observação, resultando em um número reduzido de escores de severidade das convulsões. Por outro lado, quando o tratamento promove aumento na sobrevivência do animal e não interfere significativamente no surgimento das convulsões, embora possa interferir na severidade da mesma, pode-se ter um aumento destas como resultado de um maior tempo de observação do grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Nos nossos experimentos, a FB na dose de 0,3 g/kg v.o. e o VE na dose de 12 µg/sítio i.c.v. protegeram os camundongos das mortes durante os 30 min de observação, enquanto a dose de 0,12 µg/sítio do VE reduziu significativamente a severidade das convulsões.

O PTZ é conhecido por provocar convulsões severas como consequência tanto da ativação de receptores glutamatérgicos, como por inibição da neurotransmissão inibitória GABAérgica. Nas convulsões induzidas por PTZ há o envolvimento e maior geração de espécies reativas de oxigênio no tecido cerebral (ILHAN et al., 2004). A este respeito, o gênero *Lippia* apresenta uma variedade de derivados do ácido caféico, sendo um deles o verbascosídeo, detectado em algumas espécies (PASCUAL et al.,

2001b), inclusive *Lippia alba* (MANCINI, 2005). Sabe-se que o verbascosídeo previne a oxidação induzida por radicais livres (WONG et al., 2001), estando esta atividade relacionada com seu efeito citoprotetor (CHIOU et al., 2004). Ilhan e colaboradores (2004) mostraram que o fenil-éster do ácido caféico, quando administrado em camundongos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ i.p. reduziu a severidade das convulsões induzidas pelo PTZ, embora seu efeito não tenha alcançado significância estatística. Entretanto, este mesmo trabalho mostrou que o estresse oxidativo e as disfunções resultantes das convulsões induzidas por PTZ podem aumentar a produção de radicais livres, e que substâncias antioxidantes, como o fenil-éster do ácido caféico, podem melhorar as convulsões por causa destes seus efeitos antioxidantes. Assim, os efeitos antioxidantes do verbascosídeo poderiam, pelo menos em parte, estar relacionados à atenuação da severidade e da letalidade durante as convulsões induzidas por PTZ.

Uma vez que algumas substâncias podem estar envolvidas com efeitos centrais hipotérmicos, do tipo ansiolítico e antidepressivo, simultaneamente (HOGG, 1996; OVERSTREET, 2003; RODGERS; COLE, 1994), investigou-se as preparações em um modelo para avaliar experimentalmente um efeito do tipo antidepressivo, o da suspensão pela cauda. Neste modelo, avaliou-se a capacidade das preparações em reduzir o tempo de imobilidade, uma vez que os camundongos tendem a adotar rapidamente uma postura de imobilidade quando suspensos pela cauda, e que fármacos antidepressivos fazem com que os animais mantenham esforços para fugir desta situação, contrapondo-se à resposta de imobilidade (para revisão ver CRYAN et al., 2005). Não se obteve qualquer efeito do tipo-antidepressivo para todas as preparações testadas. No entanto, o tratamento com o verbascosídeo, na dose de 0,12 $\mu\text{g/sítio}$, promoveu redução da latência para a imobilidade, sem interferir no tempo de imobilidade. Este efeito não é significativo para o modelo, considerando-se que uma redução da latência ou um aumento no tempo de imobilidade não podem ser considerados como indicativos de efeito do tipo depressivo (para revisão ver CRYAN et al., 2005), e o modelo é preditivo para um efeito tipo-antidepressivo. Já o tratamento de camundongos com fármacos benzodiazepínicos resultam em aumento do tempo de imobilidade e redução no vigor dos movimentos (PORSOLT et al., 1987; STERÚ et al., 1987), embora não esteja claro se este efeito está relacionado com o efeito do tipo-ansiolítico destes compostos (CRYAN et al., 2005; STERÚ et al., 1987)

ou é simplesmente consequência de um relaxamento motor ou sedação. Ainda assim, pode-se sugerir que a redução na latência para a imobilidade parece indicar um efeito sedativo do VE. Não se pode também deixar de considerar uma interação com o sistema serotoninérgico, dada a atividade inibitória da liberação de serotonina plaquetária induzida por cAMP, *in vitro*, descrita para o verbascosídeo (CAPASSO et al., 1993; GRICE et al., 2003). Embora não haja relatos de uma atividade específica sobre a liberação de serotonina no SNC, esta atividade, se presente, poderia estar contribuindo para o resultado encontrado, uma vez que fármacos inibidores da recaptação de serotonina aumentam a latência e reduzem o tempo de imobilidade, no modelo de suspensão pela cauda (CRYAN et al., 2005; STERÚ et al., 1987) e, ao interferir-se com a liberação deste neurotransmissor, poderia-se estar interferindo também com os parâmetros avaliados no modelo.

O modelo do LCE foi escolhido para verificar uma atividade do tipo ansiolítica por ser um modelo de fácil execução, confiável e útil, tanto para investigar fármacos ansiogênicos como ansiolíticos. O EH e a FB não apresentaram resultados significativos neste modelo, corroborando resultados descritos na literatura para a FB (KLUEGER et al., 1997) e divergindo dos resultados apresentados por Santos e colaboradores (1998) para o EH. O tratamento com VE, nas doses de 0,12 e 12 µg/sítio i.c.v., reduziu o número de entradas nos braços fechados, quando comparados ao controle, sem interferir com as porcentagens de tempo ou de entradas nos braços abertos. Uma vez que a atividade locomotora é avaliada pelo número de entradas totais ou número de entradas nos braços fechados do LCE (LISTER, 1987), os resultados obtidos mostraram uma redução da atividade locomotora nos animais tratados com o verbascosídeo. O mesmo tratamento não apresentou qualquer atividade do tipo ansiolítica ou ansiogênica, visto que não modificou as porcentagens de tempo ou de entradas nos braços abertos. Quanto à isto sabe-se que fármacos ansiogênicos, como a cafeína, reduzem a porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto, sem, no entanto, reduzir o número de entradas nos braços fechados (LISTER, 1987). As discrepâncias entre os resultados (Kluger x Santos x atuais) podem ter ocorrido devido ao fato de que os materiais botânicos testados por esses autores foram coletados em diferentes anos, estações e locais, o que pode alterar o teor de princípio(s) ativo(s) numa mesma espécie vegetal. Isso ressalta a necessidade de identificar marcadores fitoquímicos e padronizar os extratos vegetais, a fim de

garantir a quantidade de princípios ativos necessários para oferecer homogeneidade nas respostas farmacológicas.

No tocante aos outros comportamentos registrados no LCE, o tratamento com o VE na dose de 1,2 µg/sítio foi capaz de reduzir o número de imersões de cabeça, assim como o comportamento de levantar, sem interferir com os demais parâmetros. Wolfman e colaboradores (1994) relataram que o diazepam, na dose de 1 mg/kg i.p., aumentou o número de imersões de cabeça no modelo da placa perfurada, mas que na dose de 6 mg/kg i.p. reduziu o número de imersões, quando comparado com o grupo controle, caracterizando assim um efeito sedativo. No labirinto em cruz elevado, o comportamento de imergir a cabeça abaixo da plataforma, bem como o de levantar, são considerados comportamentos de avaliação de risco (para revisão ver RODGERS; COLE, 1994) ou comportamentos exploratórios (DE BOER; KOOLHAAS, 2003). Assim, uma redução destes comportamentos indica diminuição da atividade exploratória e pode ser indício de atividade do tipo ansiogênica ou sedação. Em conjunto, os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros comportamentais poderiam ser interpretados como um efeito sedativo do verbascosídeo no LCE.

Na experimentação animal é difícil separar os efeitos de sedação e alterações da coordenação motora (STANLEY et al., 2005). Assim, foram utilizados testes que avaliam a coordenação motora para mostrar o efeito sedativo das preparações testadas.

O tratamento com diazepam (1 mg/kg i.p.) não foi capaz de reduzir o tempo de permanência na barra giratória do rota-rod. Segundo Stanley e colaboradores (2005) o resultado negativo observado para o diazepam nesta dose pode ser explicado pelo fato deste benzodiazepínico só ser capaz de promover prejuízo na performance do rota-rod, numa ocupação de receptores benzodiazepínicos GABA_A de 72 %, em camundongos, enquanto efeitos sedativos são observados em humanos numa ocupação de aproximadamente 25 – 30 %; o que sugere que o modelo do rota-rod não é suficientemente sensível como modelo preditivo para sedação clínica. Não pode-se excluir assim um efeito sedativo real para as preparações testadas apenas pelos resultados apresentados por esse teste. Além disso, avaliando a latência para a queda no rota-rod girando a 16 r.p.m., não se observou efeito sedativo significativo na dose de 3 mg/kg de diazepam (STANLEY et al., 2005). Assim, optou-se por utilizar mais um modelo para sedação, o teste do arame. Em curva dose resposta de diazepam,

neste teste, a dose de 1 mg/kg i.p. não também foi capaz de reduzir a porcentagem de êxito no teste (dados não mostrados), assim utilizou-se como controle positivo o diazepam numa dose mais alta de 1,5 mg/kg, i.p.

Nenhuma das preparações ou doses testadas das mesmas foi efetiva em reduzir o tempo de permanência na barra giratória no rota-rod, ou impedir a realização da tarefa no modelo do arame. Os resultados obtidos confirmam os experimentos de Klueger e colaboradores (1997) para a FB, quando testada em camundongos no modelo do rota-rod, embora a literatura relate que os extratos hidroalcoólicos, neste último modelo (dose de 0,2 g/Kg, v.o.), foram capazes de reduzir o tempo de permanência dos animais na barra giratória, indicando um efeito sedativo (SANTOS et al., 1998).

Alguns animais tratados com verbascosídeo apresentaram sinais de ataxia quando observados nas gaiolas de observação, imediatamente antes da exposição aos modelos. No entanto, ao serem submetidos aos modelos de atividade motora, não produziram resultados positivos.

Para comprovar o efeito sedativo do VE, optou-se por testar uma possível atividade sinérgica com uma dose subsedativa de diazepam, no teste do arame, uma vez que o verbascosídeo *per se* não promoveu resultado significativo, e por ser este modelo simples, de rápida execução e já descrito pela literatura no estudo de atividade sedativa de plantas (HUI et al., 2002; VIOLA et al., 1995; YASUDA et al., 2005). A administração de diazepam (1 mg/kg, i.p.) e posteriormente de verbascosídeo foi capaz de provocar um sinergismo farmacológico, o que resultou em uma redução na porcentagem de animais que completaram a prova do arame. Enquanto 85,71 % dos animais tratados somente com a dose subsedativa de diazepam (DZP 1) apresentaram êxito no teste, e o VE, *per se*, não produziu qualquer alteração motora (100 % de êxito), o tratamento do verbascosídeo com o diazepam (VE + DZP1) reduziu este valor para 10 % dos animais. Assim, o tratamento com o DZP e VE foi capaz de prejudicar o desempenho da tarefa no teste do arame, sugerindo um sinergismo das substâncias neste modelo para sedação. Essa potencialização pode ter ocorrido tanto por uma atuação em receptores GABAérgicos, bem como por atuação em outro sistema neurotransmissor possibilitando uma interação de efeitos entre DZP e VE. Este teste não permite diferenciar um efeito central de um periférico, no entanto, a via de administração do verbascosídeo, i.c.v., e o tempo de execução do teste de 5 min

após a administração da substância, permite sugerir que o efeito obtido é produto inicialmente de ação central.

De acordo com os resultados obtidos, EA e o EH, bem como a FB, contêm substâncias com atividade no SNC. Por se encontrarem em menores concentrações no EA ou EH, ou mesmo pela presença de inúmeros outros compostos, não foi possível obter um efeito farmacológico claro. A resposta bifásica observada na curva dose-resposta com o EH não é rara, quando se trata de um extrato ou fração de produtos naturais, uma vez que esses são misturas complexas de compostos, e que podem interagir de formas variadas. Uma das explicações poderia ser atribuída à, pelo menos, dois tipos de substâncias: uma(s) com efeito “sedativo”, enquanto que outra(s) parece(m) atuar de maneira oposta, como “estimulante”. Em doses menores da preparação, a primeira substância poderia estar em concentração suficiente para expressar melhor seus efeitos, enquanto nas doses maiores o segundo composto poderia ocorrer em concentrações que permitiriam sobrepor seus efeitos aos da primeira substância, resultando na ausência de efeito quando aumenta-se a dose da preparação (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002).

Para a FB foi mostrado um efeito protetor para a letalidade, nas convulsões induzidas por PTZ, embora o efeito protetor na latência e severidade das mesmas não tenha sido observado. O VE, como um dos constituintes majoritários da FB, constituindo cerca de 11% dessa fração (MANCINI, 2005), mostrou efeito hipotérmico, hipno-sedativo e protetor da morte no modelo das convulsões induzidas por PTZ. A literatura relata que o verbascosídeo aumenta periféricamente os níveis de cAMP (PENNACCHIO et al., 1996), inibe a liberação de serotonina plaquetária induzida por ADP (CANO et al., 1990; GRICE et al., 2003), além de modular a atividade da PKC (HERBERT et al., 1991) e de espécies reativas de oxigênio (LEE et al., 2004; ZHOU; ZHENG, 1991). Assim, ele poderia estar modulando centralmente os níveis destes e de outros mensageiros celulares, metabólicos ou neurotransmissores, e produzindo seus efeitos farmacológicos.

Conclui-se que o EA e o EH de *L. alba* contêm compostos responsáveis pelos efeitos centrais da planta, como sugerido pelo uso popular e descrito preliminarmente na literatura. A FB possui efeito protetor das mortes durante as convulsões experimentais induzidas por PTZ em camundongos e o VE parece contribuir para este efeito protetor. A presença do VE pode justificar, pelo menos em parte, a atividade

farmacológica central observada para a FB, uma vez que as variações sazonais não interferem no perfil qualitativo dos constituintes majoritários das plantas (MANCINI, 2005; FERREIRA et al., 2002; TAVARES et al., 2005) e que o verbascosídeo está presente na fração n-butanólica em todas as coletas como o constituinte mais abundante (MANCINI, 2005). No entanto, devemos considerar que estes resultados são válidos para este lote da planta, uma vez que o clima, a estação do ano ou mesmo a forma de preparar os extratos podem interferir no aspecto quantitativo dos constituintes (TAVARES et al., 2004) e, portanto, promover variações nos resultados experimentais.

Esses estudos contribuem no sentido de mostrar os efeitos dos extratos aquoso e hidroalcolico, da fração butanólica e, principalmente, da substância isolada desta fração, o verbascosídeo. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos a fim de esclarecer o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o verbascosídeo promove atividade hipno-sedativa e anticonvulsivante. Sugere-se também que novas frações e substâncias sejam isoladas e submetidas aos testes farmacológicos para elucidar realmente se, além dos compostos já relatados, outros com novo mecanismo de ação possam estar envolvidos nas atividades farmacológicas desta espécie vegetal. Desta forma, será possível conhecer substâncias com novos mecanismos de ação, aumentando o potencial terapêutico de origem natural.

6 CONCLUSÕES

- O Extrato Aquoso e o Extrato Hidroalcoólico de *L. alba* contêm princípios responsáveis pelos efeitos centrais da planta. No entanto por se encontrarem em pequenas quantidades nessas preparações ou pela presença de uma variedade de outros compostos não se obteve-se um efeito farmacológico evidente.
- A Fração Butanólica de *L. alba* reduz a letalidade durante as convulsões experimentais induzidas por pentilenotetrazol e possui efeito hipotérmico em camundongos.
- O Verbascosídeo presente na FB reduz a letalidade durante as convulsões experimentais induzidas por pentilenotetrazol, possui efeito hipotérmico e sedativo em camundongos, sugerindo que o mesmo seja responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos centrais da FB de *L. alba*.
- O Verbascosídeo interage com o Diazepam de forma sinérgica promovendo um efeito sedativo/miorrelaxante em camundongos.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative constituents in plants. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, n.7, p.920 – 922, 2002.
- ALPERN, H.P.; McINTYRE, T.D. Evidence that the selectively bred long- and short-sleep mouse lines display common narcotic reactions to many depressants. **Psychopharmacology**, v.85, n.4, p.456 – 9, 1985.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v.76, p.375 – 378, 2005.
- BITRAN, D.; SHIEKH, M.; MC LEOD, M. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. **J. Neuroendocrinol.**, v.7, n.3, p.171 – 7, 1995.
- BLUMENTHAL, M. Interactions between herbs and conventional drugs: introductory considerations. **Herbal Gram**, v.49, p.52 – 63, 2000.
- BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C.W.; RISTER, R.S. (eds.). **The complete German Commission E Monographs: therapeutic guide in herbal medicines**, American Botanical Council, Boston, Integrative Medicine Communications, 1998.
- BOISSIER, J.R.; DREMONT, C.; ROBINS, R.; PAGNY, J. Tentative de pharmacologie prévisionnelle dans le domaine des neuroleptiques: actions sédative centrale et adréno-lytique de la N(dimethoxy-3,4phenetyl)N'(chloro-2 phenyl) piperazine. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.133, p.29 – 32, 1961.
- BROT, M.D.; AKWA, Y.; PURDY, R.H.; KOOB, G.F.; BRITTON, K.T. The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA receptors A. **Eur. J. Pharmacol.**, v.325, p.1 – 7, 1997.
- BUCHANAN, T.A.; CANE, P.; ENG, C.C.; SIPOS, G.F.; LEE, C. Hypothermia is critical for survival during prolonged insulin-induced hypoglycemia in rats. **Metabolism**, v.40, p.330 – 334; 1991.
- CANO, E.; VEIGA, M.; JIMENEZ, C.; RIGUERA, R. Pharmacological effects of three phenylpropanoid glycosides from mussatia. **Planta Med.**, v.56, n.1, p.24 – 6 , 1990.

CAPASSO, A.; DI GIANNUARIO, A.; DE MEDICI, D.; PIERETTI, S.; NICOLETTI, M. The effect of phenylpropanoid glycosides on rabbit platelet aggregation *in vitro*. **Pharmacol. Research**, v.27, n.1, p.113 – 114, 1993.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R., DA SILVEIRA-FILHO, N.G., FROCHTENGARTEN, M.L., BUENO, O.F.A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v.17, p.37 – 64, 1986.

CARLINI, E.A.; DE-OLIVIERA, A.B.; DE-OLIVEIRA, G.G. Psychopharmacological effects of the essential oil fraction and of the hydrolate obtained from the seeds of *Licaria puchury-majior*. **J. Ethnopharmacol.**, v.8, n.2, p.225 – 36, 1983.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.75, p.501 – 512, 2003.

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

CARVALHO-FREITAS, M.I.R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, n.12, p.1629 – 1633; 2002.

CHAMBERS, D.M.; JEFFERSON, G.C.; RUDDICK, C.A. Halothane-induced sleeping time in the mouse: its modification by benzodiazepines. **Eur. J. Pharmacol.**, v.50, n.2, p.103 – 112, 1978.

CHIOU, W.F.; LIN, L.C.; CHEN, C.F. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.56, n.6, p.743 – 8, 2004.

CHWEH, A.Y.; SWINYARD, E.A.; WOLF, H.H. Hypnotic action of pentobarbital in mice: a possible mechanism. **Exp. Neurol.**, v.97, p.70 – 76, 1987.

CIRONE, J.; ROSAHL, T.W.; NEWMAN, R.J.; O'MEARA, G.F.; HUTSON, P.H.; WAFFORD, K.A. Gamma-aminobutyric acid type A receptor beta 2 subunit mediates the hypothermic effect of etomidate in mice. **Anesthesiology**, v.100, n.6, p.1438 – 45, 2004.

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

COSTA, M.; DI STASI, L.C., KIRIZAWA, M.; MENDAÇOLLI, S.L.J.; Gomes, C.; Trolin, G. Screening in mice of some medical plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **J. Ethnopharmacol.**, v.27, p.25 – 33, 1989.

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M. I. L. Sucedâneos nacionais de bisabolol, citral, timol e carvacrol. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.40, n.7, supl., p.604, 1988.

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. **Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. J. Nat. Prod.**, v.44, p.598 – 601, 1981a.

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 medicinais do nordeste**. Fortaleza: EDUFC, 1981b.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, p.571 – 625, 2005.

CUPP, M.J. Herbal remedies: adverse effects and drug interactions. **Am. Fam. Phys.**, v.59, n.5, p.1239 – 1244, 1999.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacology**, v.25, n.5, p.465 – 469, 1986.

DAELS-RAKOTOARISON, D.A.; SEIDEL, V.; GRESSIER, B.; BRUNET, C.; TILLEQUIN, F.; BAILLEUL, F.; LUYCKX, M.; DINE, T.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C. Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*. **Arzneimittelforschung**, v.50, n.1, p.16 – 23, 2000.

DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.16, n.2, p.33 – 36, 1995.

DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. **Eur. J. Pharmacol.**, v.463, p.145 – 161, 2003.

DE FIEBRE, C.M.; COLLINS, A.C. Classical genetic analyses of responses to nicotine and ethanol in crosses derived from long- and short-sleep mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.261, n.1, p.173 – 80, 1992.

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

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

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

DÍAZ-VÉLIZ, G.; BUTRÓN, S.; BENAVIDES, M.S.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Gender, Estrous Cycle, Ovariectomy, and Ovarian Hormones Influence the Effects of Diazepam on Avoidance Conditioning in Rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.66, n.4, p.887 – 892, 2000. Abstract.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice. **J. Amer. Pharmac. Assoc.**, v.46, p.208 – 209, 1957.

ERSÖZ, T.; BERKMAN, M.Z.; TASDEMIR, T.; IRELAND, C.M.; CALIS, I. An Iridoid Glucoside from *Euphrasia pectinata*. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.1449 – 1450, 2000.

FERREIRA, J.L.P.; VELASCO, E.; DE ARAÚJO, R.B.; KUSTER, R.M.; AMARAL, A.C.F. Variação sazonal de flavonóides e fenilpropanóides em *Lippia alba*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XVII, 2002, Cuiabá. **Resumos**. Cuiabá, 2002.

GARGAGLIONI, L.H.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hyperthermia. **Brain Res.**, v.1044, n.1, p.16 – 24, 2005.

GOMES, E.C.; MINGUEL, O.G.; MOREIRA, E.A. Contribuição ao estudo anatômico de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. – Verbenaceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XI, 1990, João Pessoa. **Resumos**. João Pessoa, p.3.15, 1990.

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

GRAY, J.A.; GOODWIN, G.M.; HEAL, D.J.; GREEN, A.R. Hypothermia induced by baclofen, a possible index of GABA_B receptor function in mice, is enhanced by antidepressant drugs and ECS. **Br. J. Pharmacol.**, v.92, p.863 – 870; 1987.

GRICE, I.D.; GARHANAM, B.; PIERENS, G.; ROGERS, K.; TINDAL, D.; GRIFFITHS, L.R. Isolation of two phenylethanoid glycosides from *Eremophila gilesii*. **J. Ethnopharmacol.**, v.86, p.123 – 125, 2003.

GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M.L.; ARTEAGA, L.; SAN ROMÁN, L. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medical plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.80, p. 37 – 42, 2002.

GUPTA, M.P. (Ed.) **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. 1.ed. CYTED. Santa Fé de Bogotá: Editorial Presencia, 1995. p.557 – 567.

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

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, v.327, p.1 – 5, 1984.

HASEGAWA, H.; MEEUSEN, R.; SARRE, S.; DILTOER, M.; PIACENTINI, M.F.; MICHOTTE, Y. Acute dopamine/norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. **J. Appl. Physiol.**, v.99, n.4, p.1397 – 401, 2005.

HERBERT, J.M.; MAFFREND, J.P.; TAOUBI, K.; AUGEREAU, J.M.; FOURASTE, I.; GLEYS, J. Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. **J. Nat. Prod.**, v.54, n.6, p.1595 – 1600, 1991.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.54, n.1, p.21 – 30, 1996.

HOLTEZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027 – 1031, 2002.

HU, Z.; YANG, X.; HO, P.C.L.; CHAN, S.Y.; HENG, P.W.S.; CHAN, E.; DUAN, W.; KOH, H.L.; ZHOU, S. Herb-Drug Interactions. **Drugs**, v.65, n.9, p. 1239-1282, 2005.

HUI, K.M.; HUEN, M.S.Y.; WANG, H.Y.; ZHENG, H.; SIGEL, E.; BAUR, R.; REN, H.; LI, Z.W.; WONG, J.T.; XUE, H. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochem. Pharmacol.**, v.64, p.1415 – 1424, 2002.

ILHAN, A.; IRAZ, M.; GUREL, A.; ARMUTCU, F.; AKYOL, O. Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylenetetrazol-induced seizures in mice. **Neurochem. Res.**, v.29, n.12, p.2287 – 2292, 2004.

JACKSON, H.C.; NUTT, D.J. Body temperature discriminates between full and partial benzodiazepine receptor agonists. **Eur. J. Pharmacol.**, v.185, n.2-3, p.243 – 246, 1990.

JIA, Z.J.; LIU, Z.M.; WANG, C.Z. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis lasiophrys*. **Phytochemistry**, v.31, n.1, p.263 – 6, 1992.

KANCHANAPOOM, T.; RUCHIRAWAT, S.; KASAI, R.; OTSUKA, H. Aliphatic Alcohol and Iridoid Glycosides from *Asystasia intrusa*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.52, n.8, p.980 – 982, 2004.

KANEDA, N.; LEE, I.S.; GUPTA, M.P.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, A.D. (+)-4 beta-hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **J. Nat. Prod.**, v.55, n.8, p.1136 – 41, 1992.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6.ed. Sup. de Tradução: Penildon Silva. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Título original: Basic & Clinical Pharmacology.

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

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

LANCEL, M. Role of GABA_A receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. **Sleep**, v.22, n.1, p.33 – 42, 1999.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; DE LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole, 2003.

LAU, C.; CHEN, Z.; WONG, C.; YAO, X.; HE, Z.; Xu, H.; Huang, Y. Attenuated endothelium-mediated relaxation by acteoside in rat aorta: Role of endothelial [Ca²⁺]_i and nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Life Sci.**, v.75, p.1149 – 1157, 2004.

LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J. Pharmacol. Meth.**, v.16, n.4, p.355 – 7, 1986.

LEE, K.J.; WOO, E.; CHOI, C.Y.; SHIN, D.W.; LEE, D.G.; YOU, H.J.; JEONG, H. G. Protective Effect of Acteoside on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. **Life Sci.**, v.74, p.1051 – 1064, 2004.

LI, J.X.; XIN, D.; LI, H.; LU, J.F.; TONG, C.W.; GAO, J.N.; CHAN, K.M. Effect of verbascoside on decreasing concentration of oxygen free radicals and lipid peroxidation in skeletal muscle. **Zhongguo Yao Li Xue Bao.**, v.20, n.2, p.126 – 30, 1999. Abstract.

- LIN, M.T.; CHUANG, J.I. Melatonin potentiates 5-HT_{1A} receptor activation in rat hypothalamus and result in hypothermia. **J. Pineal Res.**, v.33, p.14 – 19, 2002.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, n.2, p.180 – 185, 1987.
- LIU, M.; LI, J.; GUO, H.; LEE, K.; Qin, L.; CHAN, K. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. **Life Sci.**, v.73, p.883 – 892, 2003.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.**, v.2, p.145 – 181, 1988.
- MACAMBIRA, L.M.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A. Naphthoquinoids from *Lippia sidoides*. **J. Nat. Prod.**, v.49, p.310 – 312, 1986.
- MANCINI, M. **Estudo fitoquímico da fração n-butanólica de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**. 2ed. Fortaleza: EUFC, 1994.
- MELLO, L.E.A.; BOTOLLOTZO, Z.A.; CAALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: Uma revisão. **Neurobiologia**, v.49, p.231 – 268, 1986.
- MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; LANGELOH, A.; URIATT, A.H. Plantas Medicinais utilizadas no município de Fagundes Varela, RS. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, XII, 1992, Curitiba. **Resumos**. Curitiba, 15 – 17 set., 1992. 296 p., p.271.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Specimen lists and maps**. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_pick?name=Lippia+alba>. Acesso em: 6 Mar. 2006, 11:33.
- MIYASE, T.; YAMAMOTO, R.; UENO, A. Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis*. **Phytochemistry**, v.43, n.2, p.475 – 479, 1996.
- MÖHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; CRESTANI, F.; HENSCH, T.; RUDOLPH, U. Specific GABA_A circuits in brain development and therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v.68, p.1685 – 1690, 2004.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.48, n.4, p.254 – 60, 1955.
- OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, n.5, p.666 – 668, 2002.

OVERSTREET, D.H.; COMMISSARIS, R.C.; DE LA GARZA, R.; FILE, S.E.; KNAPP, D.J.; SEIDEN, L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. **Stress**, v.6, n.2, p.101 – 10, 2003.

OWEN, R.W.; HAUBNER, R.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. **Food. Chem. Toxicol.**, v.41, p.703 – 717, 2003.

PACIFICI, G.M.; FRACCHIA, G.N. (eds). **Advances in drug metabolism in man**. 1st ed. Bélgica: Ed European Communities, 1995.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v.56, p.501 – 504, 2001a.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.2001 – 214, 2001b.

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. **J. Neurosci. Meth.**, v.14, p.149 – 167, 1985.

PENNACCHIO, M.; ALEXANDER, E.; SYAH, Y.M.; GHISALBERTI, E.L. The effect of verbascoside on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels in isolated rat heart. **Eur. J. Pharmacol.**, v.305, p.169 – 171, 1996.

PESCE, M.E.; ACEVEDO, X.; BUSTAMANTE, D.; MIRANDA, H.E.; PINARDI, G. Progesterone and testosterone modulate the convulsant actions of pentylenetetrazol and strychnine in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v.87, n.3, p.116 – 9, 2000.

PETTIT, G.R.; NUMATA, A.; TAKEMURA, T.; ODE, R.H.; NARULA, A.S.; SCHMIDT, J.M.; CRAGG, G.M.; PASE, C.P. Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. **J. Nat. Prod.**, v.53, n.2, p.456 – 8, 1990. Abstract.

PHAM, H.C.; KOFFI, Y.; PHAM, H.C. Comparative effects on TXA₂ biosynthesis of products extracted from *Lippia multiflora* Moldenke leaves. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.34, n.2, p.83 – 8, 1988.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis ao Brasil**. Ministério de Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Vol III, 1984. p. 395.

PORSOLT, R.D.; CHERMAT, R.; LENEGRE, A.; AVRIL, I.; JANVIER, S.; STERU, L. Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.288, v.1, p.11 – 30, 1987.

PU, X.; SONG, Z.; LI, Y.; TU, P.; LI, H. Acteoside from *Cistanche salsa* inhibits apoptosis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in cerebellar granule neurons. **Planta Med.**, v.69, n.1, p.65 – 6, 2003.

QUÈVA, C.; BREMNER-DANIELSEN, M.; EDLUND, A.; EKSTRAND, J.; ELG, S.; ERICSON, S.; JOHANSSON, T.; LEHMANN, A.; MATTSSON, J. Effects of GABA agonists on body temperature regulation in GABAB(1) ^{-/-} mice. **Br. J. Pharmacol.**, v.140, p.315 – 322, 2003.

ROBY, C.A.; ANDERSON, G.D.; KANTOR, G.A. St. John's worth: Effect on CYP3A4 activity. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.67, p.451 – 457, 2000.

ROBY, C.A.; KANTOR, E.; GIAMBANCO, V. St. John's worth impact on CYP3A4 activity, **39th Annual Meeting of New Clinical Drug Evaluation Unit Program**, Boca Raton, 1999.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.289 – 304, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. **The elevated plus-maze: Pharmacology, Methodology and Ethology**. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A., editors. *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley, 1994. p.9 – 44.

SÁNCHEZ, C. The effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists on body temperature in male mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.171, p.201 – 206, 1989.

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

SCHAPOVAL, E.E.S.; DE VARGAS, M.R.W.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **J. Ethnopharmacol.**, v.60, p.53 – 59, 1998.

SHENG, G.; ZHANG, J.; PU, X.; MA, J.; LI, C. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v.451, p.119 – 124, 2002.

SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; RAMOS, M.F.S.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.C.K.V. Linalool from *Lippia alba*: Study of Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.3518 – 3521, 2002.

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

STANLEY, J.L.; LINCOLN, R.J.; BROWN, T.A.; MCDONALD, L.M.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. **J. Psychopharmacol.**, v.19, n.3, p.221 – 227, 2005.

STASHENKO, E.E.; LARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown, grown antioxidant activity. **J. Cromatogr.**, v.1025, p.93 – 103, 2004.

STERÚ, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367 – 370, 1985.

STERÚ, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; MICO, J.A.; LENEGRE, A.; STERU, P.; SIMON, P.; PORSOLT, R.D. The automated Tail Suspension Test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v.11, n.6, p.659 – 71, 1987. Abstract.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.106, p.319 – 330, 1952.

SWINYARD, E.A.; WOODHEAD, H.; WHITE, S.; FRANKLIN, M.R. **Experimental selection, quantification and evaluation of anticonvulsants.** In: LEVY, R., MATTSON, R., MELDRUM, B., PENRY, J.K., DREIFUSS, F.E. (eds); Antiepileptic Drugs, 3^a edition. Raven Press, New York, 1989.

TAM, W.; CHEN, Z.; HE, Z.; YAO, X.; LAU, C.; HUANG, Y. Enhancement of contraction of rat mesenteric artery by acteoside: role of endothelial nitric oxide. **J. Nat. Prod.**, v.65, p.990 – 995, 2002.

TAMURA, Y.; NISHIBE, S. Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.2514 – 2518, 2002.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de três quimiotipos de *L. alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, n.1, p.1 – 5, 2005.

THOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HARBORNE, J.B.; SELF, R. Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. canescens*. **Phytochemistry**, v.26, p.2281 – 2284, 1987.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.44, n.2, p.463 – 469, 1993.

VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; DE LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B. Behavioral effects of essential oil from *Lippia alba* (Miller) N.E.Brown chemotypes. **J. Ethnopharmacol.**, v.167, p.127 – 133, 1999.

VIANA, G.S.; DO VALE, T.G.; SILVA, C.M.; MATOS, F.J. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown. **Biol. Pharm. Bull.**, v.23, n.11, p.1314 – 1317, 2000.

VIEIRA, R.A. **Avaliação dos efeitos centrais do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* Vahl.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Med.**, v.61, n.3, p.213 – 216, 1995.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.47, n.1, p.1 – 4, 1994.

WONG, I.Y.F.; HE, Z.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.3113 – 3119, 2001.

YAKIMOVA, K.; SANN, H.; SCHMID, H.A.; PIERAU, F.K. Effects of GABA agonists and antagonists on temperature-sensitive neurones in the rat hypothalamus. **J. Physiol.**, v.494, p.217 – 230, 1996.

YASUDA, T.; ENDO, M.; KON-NO, T.; KATO, T.; MITSUZUKA, M.; OHSAWA, K. Antipyretic, Analgesic and Muscle Relaxant Activities of Pueraria Isoflavonoids and Their Metabolites From *Pueraria lobata* Ohwi – a Traditional Chinese Drug. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, n.7, p.1224 – 1228, 2005.

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

ZHOU, Y.C.; ZHENG, R. L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochem. Pharmacol.**, v.42, n.6, p.1177 – 9, 1991.