

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ISOLAMENTO DO PRINCIPAL CONSTITUINTE ATIVO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN COM POTENCIAL  
ANESTÉSICO GERAL E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Clarissa Giesel Heldwein**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**ISOLAMENTO DO PRINCIPAL CONSTITUINTE ATIVO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN COM POTENCIAL  
ANESTÉSICO GERAL E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO**

**Clarissa Giesel Heldwein**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração em Farmacologia aplicada à produção animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de mestrado**

**ISOLAMENTO DO PRINCIPAL CONSTITUINTE ATIVO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN COM POTENCIAL  
ANESTÉSICO GERAL E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO**

elaborada por  
**Clarissa Giesel Heldwein**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Berta Maria Heinzmann, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Marilise Escobar Bürger, Dra. (UFSM)**

**Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 24 de janeiro de 2011.

Na vida, não existem soluções.  
Existem forças em marcha:  
é preciso criá-las e, então,  
a elas seguem-se as soluções.

(Antoine de Saint-Exupéry)

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela força em todos os momentos. Obrigada por eu ter concretizado mais um sonho.
- Aos meus pais, Arno B. Heldwein e Elfrida S. G. Heldwein, eu agradeço por todo amor, apoio e compreensão que tiveram comigo, em toda minha vida e principalmente durante essa etapa. O meu muito obrigada de coração!
- À minha irmã, Carolina G. Heldwein, pela amizade e carinho dados mesmo a distância.
- À Profa. Dra. Berta Maria Heinzmann, meu agradecimento e minha profunda admiração pela orientação, amizade e confiança que sempre depositou em mim.
- Ao Prof. Dr. Carlos Fernando de Melo pela amizade e co-orientação.
- Ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto pela co-orientação e pelos aprendizados.
- À professora Marilise Escobar Burguer pela colaboração nos experimentos.
- Aos professores Bráulio Otomar Caron e Denise Schmidt pelo cultivo e fornecimento do material vegetal.
- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelos ensinamentos.
- Às colegas de laboratório e amigas Lenise Lima da Silva, Thaylise Vey Parodi e Eduarda Zago Gai.
- Aos demais colegas e ex-colegas de laboratório, Simone Benovit, Juliana Tondolo, Cassiela Roman, Teodoro Oliveira, Viviane Garcia, Gloria da Silva, Aline Bolzan, Anelise Murari, Maikon Barros e Manuela Soliz.

- Aos meus amigos que souberam em muitos momentos compreender a minha ausência e, ainda assim, continuaram ao meu lado durante toda a caminhada, me dando força e apoio.
- A todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram e contribuíram para que eu realizasse esse trabalho.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Elfrida e Arno, por todo amor, dedicação e apoio que sempre deram para mim.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ISOLAMENTO DO PRINCIPAL CONSTITUINTE ATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN COM POTENCIAL ANESTÉSICO GERAL E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO**

AUTORA: CLARISSA GIESEL HELDWEIN

ORIENTADOR(A): BERTA MARIA HEINZMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de janeiro de 2011.

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é uma planta odorífera utilizada popularmente com finalidade ansiolítica e para o tratamento de distúrbios gastrintestinais. Na literatura existem muitos trabalhos que confirmam a propriedade sedativa do seu óleo essencial (OE), porém, somente há pouco tempo a sua propriedade anestésica foi confirmada. Este trabalho apresenta o isolamento de dois constituintes majoritários do OE de *L. alba*, linalol e eucaliptol, bem como a avaliação de sua atividade anestésica geral em jundiás juvenis (*Rhamdia quelen*). Ainda, o linalol foi definido como o constituinte ativo majoritário do OE com potencial anestésico, enquanto que o eucaliptol não apresentou atividade nas concentrações testadas. Adicionalmente foi estudado o envolvimento do sistema GABAérgico no mecanismo de ação do OE e de seu constituinte ativo majoritário. Os resultados correspondentes aos estudos de mecanismo permitem afirmar que existe(m) um ou mais compostos presentes no OE, que atuam em sinergismo com o linalol e por mecanismos distintos. Enquanto que para o OE de *L. alba* foi detectado um mecanismo tipo benzodiazepínico, o linalol age por outro mecanismo ainda não esclarecido. Em adição, este trabalho relata pela primeira vez um caso de dermatite de contato causada pelas folhas frescas de *L. alba* quimiotipo linalol. Por fim, no sentido de estabelecer uma boa qualidade da matéria prima vegetal para posteriores trabalhos, após a análise de rendimento e composição química do OE, 1,0 x 0,8 m foi definido como melhor espaçamento para o cultivo de *L. alba*. O trabalho encontra-se na forma de manuscritos, contendo três artigos científicos.

**Palavras-chave:** falsa-melissa, dermatite de contato, anestesia, linalol, eucaliptol, GABAa.



## ABSTRACT

### ISOLATION OF THE MAIN ACTIVE COMPOUND OF THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN WITH POTENTIAL ANESTHETIC ACTIVITY AND ITS MECHANISM STUDY

AUTHOR: CLARISSA GIESEL HELDWEIN

ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown is an aromatic herb commonly used as sedative and for the treatment of gastrointestinal disturbs. Many literature data confirm the sedative property of the essential oil (EO) of this species; however, just recently its anesthetic activity was confirmed. The present study reports the isolation of two major chemical constituents of the EO of *L. alba*, linalool and eucalyptol, and also the evaluation of their anesthetic activity in juveniles of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Additionally, linalool was defined as the major active compound of the EO with anesthetic property, and eucalyptol did not presented activity in the tested concentration. The involvement of GABAergic system on the mechanism of action of the EO and its major constituent was also studied. The results showed that the EO contains one or more compounds which act in synergism with linalool and also by different mechanism. Benzodiazepine like effect was detected for the EO of *L. alba*, but not for linalool. In addition, this work brings a case report of contact dermatitis caused by the leaves of *L. alba* chemotype linalool. Finally, to establish a good quality of the plant material, after yield and chemical composition analyses of the EO, 1,0 x 0,8 m was defined as the better spacing for cultivation of *L. alba*. The results are presented in three manuscripts.

**KEY-WORDS:** false-melissa, contact dermatitis, anesthesia, linalool, eucalyptol, GABAa.

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	15
2.2 Descrição botânica.....	16
2.3 Constituintes químicos de <i>L. alba</i> .....	17
2.4 Atividades biológicas descritas para o óleo essencial de <i>L. alba</i> .....	18
2.5 Toxicidade dos extratos de <i>L. alba</i> .....	20
2.6 Produtos naturais com atividade anestésica em peixes.....	20
2.7 Óleos essenciais com ação central.....	21
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
5.1 Procedimentos gerais.....	24
5.2 Material vegetal.....	25
5.3 Extração do óleo essencial.....	25
5.4 Análise da composição do óleo essencial.....	26
5.5 Separação dos constituintes por método de cromatografia em coluna.....	26
5.5.1 Fracionamento 1.....	26
5.5.2 Fracionamento 2.....	26
5.6 Identificação dos constituintes isolados.....	28
5.7 Avaliação da atividade anestésica geral.....	28
5.8 Avaliação de diferentes espaçamentos no cultivo de <i>L. alba</i> .....	29

<b>5.9 Análises estatísticas.....</b>	<b>30</b>
<b>6 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1 Allergic contact dermatitis by leaves of <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown – Case Report .....</b>	<b>31</b>
<b>6.2 The involvement of GABAergic system in the anesthetic effect of the essential oil of <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....</b>	<b>40</b>
<b>6.3 Sedative and anesthetic properties of a monoterpenoid isolated from <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown in <i>Rhamdia quelen</i> and studies on its mechanism of action.....</b>	<b>66</b>
<b>7 RESULTADOS ADICIONAIS.....</b>	<b>87</b>
<b>7.1 Separação dos constituintes por método de cromatografia em coluna.....</b>	<b>87</b>
<b>7.2 Atividade do eucaliptol na indução de anestesia em juvenis de jundiá.....</b>	<b>87</b>
<b>7.3 Diferentes espaçamentos no cultivo de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown como fatores de variabilidade quali e quantitativa do óleo essencial.....</b>	<b>87</b>
<b>8 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>89</b>
<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A origem da utilização e da procura de plantas medicinais para a prevenção, cura ou controle de um grande número de doenças é bastante antiga. Apesar dos muitos avanços tecnológicos que ocorrem continuamente, este tipo de cultura medicinal ainda persiste e promove um grande interesse pela pesquisa da flora mundial (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Embora apenas em torno de 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada, relata-se que aproximadamente 140 mil ou até mais metabólitos intermediários oriundos, sobretudo, de plantas superiores, já foram isolados e caracterizados. A maioria, no entanto, ainda não foi avaliada farmacologicamente, demonstrando mais uma vez o potencial terapêutico das plantas medicinais (CRAGG et al., 1997; NEWMAN et al., 2003).

O Brasil possui uma enorme e complexa biodiversidade e conta com mais de 55.000 espécies já catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000. O fato de haver uma diversidade de compostos, em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas nas plantas, fornece à flora brasileira um papel importante como fonte de produtos naturais (SIMÕES et al., 2003).

Os óleos essenciais são misturas de elementos voláteis, originados do metabolismo secundário das plantas e têm como função principal garantir a proteção das mesmas contra microrganismos. A composição química é bastante complexa e seus constituintes principais pertencem à classe dos terpenóides e/ou fenilpropanóides (SIQUI et al., 2000 apud OLIVEIRA et al., 2006). Quanto às funções químicas dos componentes dos óleos, estes ocorrem preponderantemente na forma de hidrocarbonetos e seus derivados oxigenados. Normalmente os óleos essenciais apresentam alguns componentes majoritários, além de existirem também constituintes traço, que são aqueles presentes em pequeníssimas quantidades (SIMÕES et al., 2003).

A extração de óleos essenciais pode ser feita através de diversas metodologias, sendo a escolha da técnica e os fatores ambientais, tais como clima, composição do solo, órgão e idade da planta, determinantes da qualidade, do rendimento e da composição do mesmo.

As atividades biológicas dos óleos essenciais são diversas e incluem, entre outras, ação citotóxica, fototóxica, antimutagênica, antioxidante, e antimicrobiana, além de apresentarem frequentemente uma ação central, que é determinada pela sua composição química (BAKKALI et al., 2008; PASSOS et al., 2009).

Além da fototoxicidade dos óleos essenciais citada anteriormente, estes ainda podem ocasionar por via tópica reações cutâneas como, por exemplo, as alergias. Essa reação adversa é bastante comum e já foi relatada para diversas famílias de espécies vegetais (MITCHELL; DUPUIS, 1971; DEL POZO et al., 1994; POTTER et al., 1995; GORDON, 1999).

Adicionalmente aos efeitos farmacológicos, muitos óleos essenciais são capazes de interferir na ação de medicamentos como, por exemplo, antibióticos, seja por um efeito antagônico ou sinérgico. De acordo com Oliveira et al. (2006), esta interferência varia de acordo com o tipo de antibiótico, de óleo essencial e de cepa bacteriana ensaiada. Este efeito dos óleos essenciais ainda é pouco explorado, e pode ser alvo de novas pesquisas em relação a outros medicamentos e atividades.

Em relação aos estudos de atividade anestésica, ainda são poucos os relatos na literatura a respeito de constituintes isolados de óleos essenciais de plantas medicinais que possuem potencial anestésico para peixes, especialmente para *Rhamdia quelen* (jundiá), uma espécie rústica e comum em cursos de água do sul do Brasil. Nesta espécie, foram somente relatados estudos com eugenol, substância obtida a partir do óleo de cravo (CUNHA, 2007).

Recentemente, foi verificado efeitos anestésicos para o óleo essencial de *L. alba* sobre o jundiá (PI0706182-0; CUNHA et al., 2010). Contudo, o(s) constituinte(s) ativo(s) ainda não foi (foram) identificado(s), assim como também ainda não foi investigado o mecanismo de ação para o efeito anestésico do óleo essencial desta espécie vegetal.

Esta dissertação foi organizada na forma de manuscritos. Ao todo, são apresentados três manuscritos no item Manuscritos Científicos, os quais encontram-se formatados conforme os periódicos aos quais foram ou ainda serão submetidos. Os resultados, cuja abordagem não foi apresentada nos manuscritos, encontram-se no item Resultados Adicionais.

No item Revisão da Literatura são apresentados os principais relatos da espécie estudada, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, incluindo a descrição botânica, usos populares, principais constituintes químicos e propriedades farmacológicas até

agora descritos. Por fim, na Discussão Geral, é apresentada uma visão geral do trabalho, com a interpretação dos resultados e sua correlação com os dados da literatura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

A família Verbenaceae, subfamília Verbenoideae, apresenta aproximadamente 36 gêneros e 1.035 espécies. Entre os gêneros mais representativos desta família encontra-se *Lippia*, que contém aproximadamente 200 espécies de plantas aromáticas amplamente distribuídas principalmente em regiões tropicais, semitemperadas e temperadas, que podem ser herbáceas, arbustivas e pequenas árvores (PASCUAL et al., 2001a; JUDD et al., 2002 apud SOUSA, 2006).

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é uma erva aromática nativa da América do Sul, que ocorre em diversas regiões do mundo, como no norte da Argentina, Índia, Austrália e Brasil (HENNEBELLE et al., 2008). No Brasil, distribui-se em todo o território como uma planta espontânea em terrenos abandonados ou é cultivada em hortas medicinais. Possui numerosos nomes populares, mas é principalmente conhecida no Brasil como erva-cidreira, erva-cidreira-brava, falsa-melissa, chá-do-tabuleiro, salsa-limão (MATOS et al., 1996; RAO, 2000), sálvia-do-rio-grande (HEINZMANN; BARROS, 2007) e orégano-de-cerro (STASHENKO et al., 2004). Outras espécies recebem denominações populares idênticas a *L. alba*, como por exemplo: *Melissa officinalis* L. (Labiatae) e *Cymbopogon citratus* (Poaceae), ambas designadas por erva-cidreira (MATOS et al., 1996), fato explicado pelas propriedades organolépticas semelhantes.

*L. alba* está entre as principais plantas medicinais utilizadas pela população brasileira, possuindo grande importância na medicina popular do nosso país devido às propriedades terapêuticas do seu óleo essencial, e é considerada promissora para o desenvolvimento de um novo medicamento (HEINZMANN; BARROS, 2007). Seus principais usos medicinais são destinados ao tratamento de doenças gástricas. Adicionalmente, seus constituintes químicos conferem aos extratos obtidos a partir desta espécie vegetal propriedades antimicrobiana, antiinflamatória, anti-reumática, antiulcerogênica, diurética, sedativa e analgésica, entre outras (BEZERRA et al.,

1980; GOMES, 1990; PASCUAL et al., 2001b; MOREIRA et al., 2002; BARROS et al., 2009).

## 2.2 Descrição botânica

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é um subarbusto decumbente, com ramos quadrangulares quando jovens. Planta aromática, que atinge até 1,70 metros de altura. As folhas patentes são simples, inteiras, membranáceas, pecioladas, pubescentes, com aroma cítrico. Ocorrem em pares decussados ou em número de três por nó. O limbo possui formato variável, em geral ovado, com ápice agudo, base cuneada e decurrente, bordo serreado (menos na base propriamente dita), tendo em média 8,3 cm de comprimento por 3,3 cm de largura. A venação é do tipo craspedódroma, com a nervura principal saliente na face dorsal. A inflorescência é axilar, pedunculada, do tipo recemosa, com flores rosa, de face amarela, que ocorrem em capítulos subglobulosos (BRITTON, 1965 apud BARROS, 2008).

A literatura traz, ainda, informações mais detalhadas e complementares à descrição acima, sobre a morfologia de *L. alba*:

Arbusto aromático rizomatoso, de 1-1,5 m de altura, muito ramoso, de ramos delgados, flexíveis, eretos ou arqueados, às vezes decumbentes e arraizantes, de entrenós em geral largos; Folhas opostas ou alternas ovadas ou ovado-oblongas, de 2-6 cm de comprimento por 1,2-4,5 cm de largura, cuneadas em pecíolo curto, conspícuas e regularmente serreadas, rugosas, subtriplinérvias, hirtas-ásperas na face adaxial, velutino-tomentosas ou vilosas e resinosas-pontuadas na face abaxial, reticulada venosa e com nervuras marcadamente proeminentes; Inflorações em capítulos axilares, 1 ou mais raramente 2 por axila, pubescentes, globosos (invólucro de cerca de 8 cm de diâmetro), cilindros até 2,5 cm de comprimento, brevemente pedunculados; Flores violáceas com face amarela e branca. Brácteas imbricadas, pluriseriadas, ovadas, de 5 a 6 mm de comprimento, largamente acuminadas, sericeo-pubescentes e ciliadas; Cálice 2-filo, de 1,5 a 1,7 mm de comprimento, pubescentes; Corola marcadamente zigomorfa, de lábio inferior notavelmente desenvolvido, com lóbulo médio maior e tubo ensanchado na metade superior, pubescente exteriormente; Estames insertos na metade



superior do tubo corolino, inclusos; Ovário globoso, estilete curto (1,8 mm de compr.), estigma lateral; Fruto esquizocárpico subgloboso a obovóide, de 2,8-3,0 mm de diâmetro, coberto pelo cálice acrescente (BUKART, 1979 apud GOMES et al., 1993).

### 2.3 Constituintes químicos de *L. alba*

Dentre os metabólitos secundários descritos na literatura para *L. alba*, é relatada a presença de óleos essenciais, flavonóides, taninos, terpenóides, fenilpropanóides, geniposídeos (iridóides), saponinas triterpênicas, açúcares, resinas e mucilagens (CRAVEIRO et al., 1981; PANSERA et al., 2003; GAZOLA et al., 2004; BARBOSA et al., 2006; SENA FILHO, 2007; PÉRTILE, 2007; FARIAS et al., 2010). Quanto aos componentes do óleo essencial, são citados os monoterpenóides e os sesquiterpenóides como constituintes majoritários (AGUIAR e COSTA, 2005). Recentemente foi realizado um estudo sobre as influências sazonais no rendimento e composição química do óleo essencial desta espécie, correlacionando-se os resultados com as rotas biossintéticas para os terpenóides presentes no seu óleo essencial (BARROS et al., 2009).

O potencial farmacológico existente para *L. alba* pode ser explicado pela grande variabilidade química, sendo que esta é particularmente pronunciada no óleo essencial, o que leva à sua classificação em diferentes quimiotipos, permitindo uma caracterização de acordo com seu constituinte majoritário (PASCUAL et al., 2001a; HENNEBELLE et al., 2008). No Brasil, distinguem-se principalmente três quimiotipos de *L. alba* com base nas variações qualitativas e quantitativas dos teores de citral, carvona e linalol, sendo eles denominados de La1, La2 e La3. Alternativamente, alguns autores classificam esta espécie, de forma arbitrária, nos quimiotipos I, II e III, respectivamente, como a exemplo de Matos (1996), Vale et al. (1999) e Tavares et al. (2005).

Além da variação química, estes quimiotipos também apresentam algumas variações morfológicas. Tais variações foram observadas de acordo com a distribuição geográfica dos mesmos. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que, quando expostos ao mesmo ambiente, tais quimiotipos mantêm suas

diferenças tanto químicas quanto morfológicas, demonstrando que esta variabilidade é, em grande parte, controlada geneticamente (TAVARES et al., 2005). Esta colocação torna-se ainda mais evidente com os estudos citogenéticos que têm sido realizados entre os quimiotipos. A partir das observações de Sousa (2006), concluiu-se que o número cromossômico não está relacionado com quimiotipos específicos de *L. alba* e que esta variação química, provavelmente, ocorra por meio de algum mecanismo de controle genético.

Quando há interesse em desenvolver um medicamento a partir de uma espécie vegetal, a taxa de variação do(s) constituinte(s) ativo(s) deve(m) ser a(s) mínima(s) possível(eis) para obtenção de um fitoterápico seguro e eficaz, que apresente efeito farmacológico reprodutível. Portanto, são de extrema importância a identificação e a correta classificação de quimiotipos, de modo a garantir a qualidade do material vegetal (PASCUAL et al., 2001a).

#### **2.4 Atividades biológicas descritas para o óleo essencial de *L. alba***

As atividades farmacológicas descritas na literatura fornecem indícios que podem explicar, pelo menos em parte, alguns dos usos terapêuticos de *L. alba* na medicina popular. Em relação ao óleo essencial, Stashenko et al. (2004) evidenciaram atividade antioxidante *in vitro*, onde o óleo essencial de *L. alba* extraído por hidrodestilação exibiu ação similar à vitamina E. Outros autores (BRASILEIRO et al., 2006; DUARTE et al., 2007; BARROS, 2008) demonstraram atividade antimicrobiana para o óleo essencial. Barros (2008) determinou também que ocorre variabilidade qualitativa e semiquantitativa em relação às estações do ano, além de determinar que as diferentes épocas de coleta influem sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *L. alba*.

Ainda, sabendo-se que muitos autores atribuem a atividade antimicrobiana de *L. alba* aos monoterpenóides oxigenados presentes no seu óleo essencial, realizou-se fracionamentos bio-guiados do mesmo. Através desta metodologia, foram isolados e identificados dois constituintes: germacreno-D-4-ol e linalol. A atividade antimicrobiana de ambas substâncias foram avaliadas, porém apenas o sesquiterpenóide germacreno-D-4-ol demonstrou atividade para as cepas de *S.*

*cereviseae*, *P. zopfii* e *S. aureus* avaliadas, sendo que o monoterpenóide linalol não apresentou atividade nas concentrações testadas (BARROS, 2008). Segundo este autor, os resultados sugerem a existência de outros mecanismos de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia alba*, além da ação dos compostos monoterpenóides oxigenados. A existência de diferentes mecanismos que atuariam concomitantemente e poderiam explicar a atividade antibacteriana de *L. alba* é provável, uma vez que a literatura descreve a ocorrência de sinergismo e antagonismo entre os diferentes componentes dos óleos essenciais (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003). No entanto, Carson e Riley (1995) relataram a atividade antibacteriana deste composto frente às cepas de *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Atividade antifúngica para a referida espécie vegetal foi evidenciada no estudo de Oliveira (2000), onde o óleo essencial inibiu o crescimento de *Geotrichum* spp., fungo isolado de diferentes frutas *in natura*. O aumento da vida útil de frutas como acerola, laranja e mamão, foi a principal relevância dada a este estudo. Evidenciou-se também atividade antifúngica do óleo essencial contra patógenos da cana-de-açúcar (RAO et al., 2000), sendo tal evidência explicada pelo efeito no controle da germinação de telesporos de *Ustilago scitaminea* e conídios de *Colletotrichum falcatum*. Ainda, o estudo de Aguiar (2006) comprovou o potencial antifúngico dos extratos brutos e do óleo essencial de *L. alba*, assim como o estudo realizado por Oliveira et al. (2006), onde foi verificada a atividade antifúngica para espécies de *Candida* sp.

Embora a maioria dos metabólitos secundários de origem vegetal não apresente valores de CIM (concentração inibitória mínima) que justifiquem seu uso clínico, vários deles têm aumentado a sensibilidade de cepas microbianas resistentes aos antibióticos de uso convencional. Como exemplo, podem ser citados: reserpina, 5-metoxiidnocarpina, galato de epigalocatequina, corilagina, telimagrandina I, nerolidol, farnesol, bisabolol, apritona e ácido isopimárico (SCHMITZ et al., 1998; STERMITZ et al., 2000; SHIMIZU et al., 2001; ZHAO et al., 2002; BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003; SHIOTA et al., 2004; SMITH et al., 2005). Este sinergismo descrito entre os antibióticos e diferentes constituintes vegetais pode ter várias explicações, sendo uma delas a interferência nos mecanismos de resistência de bactérias e fungos frente a antibióticos (TEGOS et al., 2002; ALEKSHUN; LEVY, 2007; HEMAISWARYA et al., 2008).

Viana et al. (2000) verificaram a existência de atividade anticonvulsivante de óleos essenciais de três quimiotipos distintos de *L. alba*, com mecanismo de ação similar ao diazepam, além de indicar o citral, o  $\beta$ -mirceno e o limoneno como os prováveis componentes ativos.

As propriedades sedativa e miorelaxante de *L. alba* já foram descritas em roedores (VALE et al., 1999; VALE et al., 2002; ZÉTOLA et al., 2002). No estudo de Zétola et al. (2002), essas propriedades foram constatadas para o extrato etanólico das folhas de *L. alba*, obtido por percolação. O mesmo estudo comparou também os constituintes presentes no extrato etanólico com os constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *L. alba*, porém constatou-se que as substâncias voláteis majoritários do óleo essencial não são encontrados no extrato etanólico. Assim, os efeitos foram relacionados com os compostos não-voláteis, possivelmente flavonóides.

Em relação às atividades descritas para as raças químicas desta espécie, estudos demonstram diferentes propriedades para cada um dos quimiotipos existentes (VALE, 1999; TAVARES et al., 2005).

## **2.5 Toxicidade dos extratos de *L. alba***

Quanto à toxicidade dos extratos de *L. alba* ainda há poucos relatos. Hennebelle (2008), em seu recente estudo de revisão, citou os resultados obtidos por Aguiar (2006), que determinou a  $DL_{50}$  por v.o., em ratos, de 460 mg/kg para extrato etanólico das folhas e 1466 mg/kg para extrato clorofórmico das raízes. Ainda, foi pesquisada a atividade anti-tumoral destes mesmos extratos, porém não foram verificados efeitos significativos (AGUIAR, 2006).

Em relação à fototoxicidade ou reações cutâneas alérgicas, não há nenhum relato na literatura até o presente momento.

## **2.6 Produtos naturais com atividade anestésica em peixes**

O procedimento de anestesia é muito utilizado para o manejo de diversas espécies de peixes com finalidade principal de diminuir o estresse, para o qual os produtos químicos mais aplicados são o metanosulfonato de triclaína (MS-222), a quinaldina, benzocaína e 2-fenoxietanol (ROSS e ROSS, 1984). Porém, esses produtos são de difícil obtenção, de alto custo e ainda podem gerar danos ao meio ambiente. Como alternativa, na última década vem sendo muito pesquisada a utilização de produtos naturais para fins anestésicos, a exemplo de óleos essenciais (CUNHA et al., 2010) e de constituintes extraídos de plantas medicinais. Substâncias isoladas como o eugenol, obtido de *Eugenia caryophyllata* (ROUBACH et al., 2005; CUNHA, 2007; GONÇALVES et al., 2008; VIDAL et al., 2008), e o mentol, extraído de plantas do gênero *Mentha* (FAÇANHA; GOMES, 2005; SIMÕES; GOMES, 2009), já possuem sua eficácia comprovada em diversas espécies de peixes.

Para espécies nativas como *Rhamdia quelen*, até o momento há somente o relato da atividade anestésica do óleo essencial de *Lippia alba* (CUNHA et al., 2010) e do eugenol (CUNHA, 2007).

## 2.7 Óleos essenciais com ação central

Os óleos essenciais (OEs) e seus constituintes isolados apresentam diversas propriedades farmacológicas. Muitos OEs possuem ação farmacológica no sistema nervoso central (SNC), destacando-se na literatura as propriedades sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e antidepressiva, como os OEs de *Croton zehntneri* (BATATINHA; SOUZA-SPINOSA; BERNARDI, 1995), *Citrus aurantium* L. (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002), *Acorus gramineus* (KOO et al., 2003), *Citrus bergamia* (BAGETTA et al., 2010), *Cymbopogon citratus* (BLANCO et al., 2009), *Salvia sclarea* (SEOL et al., 2010), *Lavandula angustifolia* (UMEZU et al., 2006), entre outros.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral:

- Isolar e identificar os constituintes ativos majoritários do óleo essencial de *L. alba* com potencial anestésico geral, assim como avaliar o envolvimento do sistema GABAérgico no seu mecanismo de ação.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinação do componente ativo majoritário com atividade sedativa e anestésica geral em *Rhamdia quelen*

- Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico na atividade anestésica geral do óleo essencial e do seu constituinte majoritário isolado

- Determinação do espaçamento para cultivo de *L. alba* com maior rendimento e maior proporção do constituinte majoritário ativo

- Descrição da toxicidade cutânea de *L. alba*.

## 4 JUSTIFICATIVA

*Lippia alba* é uma espécie medicinal nativa, cuja propriedade sedativa e anestésica geral já foram comprovadas, havendo um grande potencial para a descoberta de um novo medicamento para este fim. Através da determinação de o(s) constituinte(s) ativo(s) majoritário(s) da atividade sedativa e anestésica geral, poderão ser escolhidos marcadores químicos e biológicos para futuras preparações fitofarmacêuticas e possibilitar a sua produção e comercialização com maior eficácia, segurança e qualidade. Adicionalmente, os resultados deste trabalho possibilitarão definir o melhor espaçamento para o cultivo desta planta medicinal, o que contribuirá para a qualidade da matéria-prima.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes utilizados nos experimentos foram das marcas: Belga, Quimex e Merck, de grau p.a. Todos os solventes, assim como também a água, utilizados nos experimentos e na preparação de reagentes e diluentes foram previamente destilados, com exceção do éter etílico.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas com gel de sílica G/ UV<sub>254</sub> ALUGRAM® MN de espessura de 0,2 mm com suporte de alumínio 20 x 20 cm. Todas as análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente. Como fases móveis foram utilizados vários eluentes, tais como hexano:acetona, hexano:acetato de etila, hexano:éter etílico:acetona, em diferentes proporções.

A detecção das substâncias sobre CCD se deu pela visualização sob luz ultravioleta (UV) em comprimentos de ondas de 254 e 365 nm, seguida de aspersão da placa com o reagente cromogênico anisaldeído-ácido sulfúrico e aquecimento a 100°C.

Para as cromatografias em coluna (CC), foram utilizados gel de sílica 60 Merck com tamanhos de partículas 63-200 µm.

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizadas as seguintes técnicas espectrais: espectrometria de massas; espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C). Os espectros de massas das substâncias isoladas e as análises do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram obtidos nos Laboratórios de Análises Micotoxicológicas e de Química Ambiental, ambos da UFSM.

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica Marte AY220 classe I (220-0,01)
- Balança semi-analítica Bel engineering SSR-600 classe II (600-200)
- Bomba de vácuo Kohlbach
- Aparelho de clewenger



- Mantas de aquecimento FISATON
- Estufa BIOMATIC
- Evaporador rotatório Buchi R-114; Banho Buchi B-480
- Lâmpada de UV
- Cromatógrafo gasoso Agilent-6890 acoplado a espectrômetro de massas com detector seletivo Agilent 5973 (coluna HP-5MS).
- Cromatógrafo Gasoso acoplado a espectrômetro de massas Varian, modelo CP-3800 (coluna VF-5MS).

Os fármacos padrões diazepam e flumazenil, utilizados nos experimentos visando os estudos de mecanismo de ação, foram obtidos da DEG (Brasil) e Cristália, respectivamente.

## 5.2 Material vegetal

As amostras de óleo essencial de folhas frescas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) foram obtidas do material vegetal coletado na área experimental do departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Material vegetal também foi obtido de cultivos localizados no município de Frederico Westphalen. A espécie foi identificada pelo botânico Gilberto Dolejal Zanetti. O material testemunha encontra-se depositado no Herbário do departamento de Biologia da UFSM sob o número SMDB 10050.

## 5.3 Extração do óleo essencial

As folhas frescas de *L. alba* foram separadas e grosseiramente divididas com auxílio de tesouras e podões. Posteriormente, o material vegetal foi pesado e óleo essencial foi extraído em triplicata, durante 2 horas após o início da ebulição, utilizando-se o método de hidrodestilação com aparelho do tipo clewenger, conforme

preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4 ed. (2000). Os rendimentos de cada extração foram determinados em relação ao peso do material vegetal extraído.

#### **5.4 Análise da composição do óleo essencial**

As amostras dos óleos essenciais provenientes das diferentes extrações foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). As análises por CG-MS TIC foram realizadas utilizando cromatografia gasosa Agilent-6890 acoplado a um detector de massas seletivo Agilent 5973, sob as seguintes condições: coluna HP-5MS (5%-fenil - 95%-metilsiloxano, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); EI-MS: 70 eV; Condições de operação: split inlet 1:100; temperatura do programa, 40-260°C; 40°C por 4 min; taxa de rampa, 4°C/min; gás carreador He: taxa de fluxo, 1 mL/min; injetor e detector de temperatura, 220°C; temperatura de interface 250°C; Databank NIST 2002.

#### **5.5 Separação dos constituintes por método de cromatografia em coluna**

Nessa técnica, o gel de sílica foi suspenso em um eluente e a suspensão foi transferida para uma coluna de vidro. Após a transferência e compactação do adsorvente, a amostra de óleo foi ressuspensa em uma pequena quantidade de eluente e, então, aplicada sobre a coluna. Desta maneira, os constituintes do óleo foram eluídos da coluna sob pressão atmosférica.

Os resultados da separação foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se para detecção uma solução de anisaldeído-ácido sulfúrico, seguido de aquecimento a 100°C. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança de seus constituintes e então concentradas. Ainda, foi determinado o seu peso seco para cálculo do rendimento.

As separações por cromatografia em coluna sobre gel de sílica foram repetidas até a obtenção dos compostos isolados. Abaixo segue a descrição, com maiores detalhes, de todo o procedimento realizado.

### 5.5.1 Fracionamento 1

Este fracionamento foi repetido por 3 vezes, sendo que as colunas (22,5 cm x 3,2 cm) correspondentes receberam os códigos CH 1A, CH 2A e CH 3A. Como eluente foi utilizado hexano:acetona 95:5 e como adsorvente gel de sílica G (70 g), sendo coletadas frações de 50 mL. Os dados referentes às diferentes colunas encontram-se na tabela 1.

Através deste fracionamento, obteve-se a substância codificada como BCGH I da fração 4, nas quantidades de 227,6 mg; 700,9 mg; 671,5 mg para CH 1A, CH 2A e CH 3A, respectivamente. Como as frações apresentaram um só constituinte em CCD, foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). A substância isolada foi identificada como linalol (manuscrito 3).

Tabela 1: Quantidade de amostra aplicada, frações reunidas e rendimento total (%) das três colunas correspondentes ao fracionamento inicial do óleo essencial de *Lippia alba*.

Fracionamento	Amostra de OE (g)	Frações obtidas	Rendimento (%)
CH 1A	5,02	1-8	95,55
CH 2A	5,03	1-11	96,14
CH 3A	4,90	1-14	98,75

### 5.5.2 Fracionamento 2 (CH4)

A partir do fracionamento da fração 2 da coluna CH 1A, utilizando-se coluna cromatográfica (47,5 cm x 4,0 cm) com adsorvente gel de sílica G (270 g), foi obtido o composto BCGH V (22 mg). De acordo com a literatura (ADAMS, 2001; base de dados NIST, 2002), o composto foi identificado como 1,8-cineol; Rf (hexano:acetato de etila 98:2; duas migrações): 0,29; Rt (GC): 14,25 min; GC KI: 1013; EI-MS m/z (%): 156 (0,2), 154 (27), 139 (26), 125 (5,4), 111 (35); 108 (39), 93 (30), 84 (31), 81

(50), 71 (37), 69 (32); 55 (32), 43 (99), 41 (40), 39 (29). As análises de RMN não foram realizadas, uma vez que trata-se de um composto bem conhecido.

Tabela 2: Dados e rendimento total (%) da segunda coluna, visando o fracionamento do óleo essencial de *Lippia alba*.

Fracionamento	Amostra - Fração 2 (mg)	Frações obtidas	Rendimento (%)
CH4A	270	1-22	74,81
CH4B	261	1-17	78,15

## 5.6 Identificação dos constituintes isolados

A elucidação estrutural dos constituintes isolados foi realizada através do método de espectrometria de massas (EM). Como substância majoritária do óleo essencial de *L. alba* havia sido isolada anteriormente da mesma espécie vegetal por Barros (2008), pertencente ao nosso grupo de pesquisa, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) não foi repetida para o composto, uma vez que esta já havia sido realizada. O composto, após o seu reisolamento, foi identificado pelo seu índice de retenção e pelo modelo de fragmentação de seu espectro de massas. O mesmo método de identificação foi utilizado para o 1,8-cineol, por ser um composto bem conhecido e já descrito para a espécie em estudo.

## 5.7 Avaliação da atividade anestésica geral

A avaliação da atividade anestésica geral *in vivo* do óleo essencial, de suas frações e constituintes isolados foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, do Laboratório de Fisiologia de Peixes, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM. Nos ensaios foram utilizados jundiás juvenis (*Rhamdia quelen*), com peso variável entre 5 e 9 g. Previamente à realização dos ensaios, os peixes ficaram em jejum por um período de 24 h e foram então transferidos para aquários de 1 L contendo o óleo / substância teste solubilizados em etanol, solvente que foi utilizado, na mesma concentração, no controle.

Em cada aquário foram colocados 2 peixes por vez, para avaliação do tempo para indução ao estágio 4 de anestesia segundo Schoettger e Julin (1967), (tabela 3). Após a indução, os animais foram transferidos para aquários livres de anestésicos, para avaliar o tempo para recuperação. Os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 3 - Estágio de anestesia em peixes (SCHOETTGER E JULIN, 1967).

Estagio	Descrição	Características
1	Sedação leve	Perda parcial da reação aos estímulos externos.
2	Sedação profunda	Perda parcial do equilíbrio, nenhuma reação aos estímulos externos.
3 <sup>a</sup>	Perda total do equilíbrio	Os peixes viram, mas retêm a habilidade da natação.
3b	Perda total do equilíbrio	A habilidade da natação para, mas respondem à pressão no pedúnculo caudal.
4	Anestesia	Perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos, mesmo aos fortes.
5	Colapso bulbar (morte)	O movimento respiratório cessa (morte).

As concentrações testadas dos constituintes isolados e os resultados são apresentados no manuscrito 3 (linalol) e anexo 1 (1,8-cineol).

### 5.8 Avaliação de diferentes espaçamentos no cultivo de *L. alba*

No sentido de estabelecer as melhores condições para o cultivo de *L. alba*, investigou-se a influência de diferentes espaçamentos tanto na composição química quanto no rendimento do seu OE. Os cultivos de *L. alba* foram realizados na área experimental do Laboratório de Melhoramento Vegetal e Produção de Plantas, do CESNORS/UFMS, no município de Frederico Westphalen – RS. O local do

experimento está situado geograficamente a 27°23'26" latitude sul, 53°25'43" longitude oeste e 461,3m de altitude. O clima dessa região, segundo a classificação de Koeppen, é subtropical úmido, tipo Cfa2.

Os experimentos de cultivo foram realizados com os seguintes espaçamentos entre plantas e linhas (A x B): 1,0 x 1,0 m; 1,0 x 0,8 m; 1,0 x 0,6 m e 1,0 x 0,4 m. O óleo essencial de folhas provenientes de cultivos com diferentes espaçamentos foram extraídos em triplicata, conforme metodologia descrita no item 3.3, visando a comparação dos rendimentos e composição química. Os mesmos foram determinados segundo metodologia anteriormente descrita (item 3.4).

## **5.9 Análises estatísticas**

Para os testes estatísticos, os dados foram submetidos ao teste de Levene, para ser verificada a homogeneidade das variâncias. Para variâncias homogêneas, a comparação estatística entre os diferentes grupos e tempos foi efetuada por análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores seguido pelo teste de Tukey, através do programa Sigma Plot, com nível mínimo de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Para dados não homogêneos, a comparação estatísticas dos dados foi realizada por Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney, também com nível mínimo de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Nos testes para indução e recuperação anestésica foram realizadas análises de regressão (concentração do agente anestésico x tempo de indução da anestesia) utilizando o programa "Slide Write Plus" (Advanced Graphics Software), 1996.

## 6 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

### 6.1 Manuscrito 1

HELDWEIN, C.G.; HEINZMANN, B.M. Allergic contact dermatitis by leaves of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown – Case Report. Submetido a revista Contact Dermatitis.

















Figure 1: Leaves of *Lippia alba*.



Figure 2: Clinical appearance of skin sensitization by leaves of *Lippia alba*.







## 6.2 Manuscrito 2

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F.M.C.; BÜRGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C.A.; SCHMIDT, D.; CARON, B.O.; HEINZMANN, B.M. The involvement of GABAergic system in the anesthetic effect of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

**THE INVOLVEMENT OF GABAergic SYSTEM IN THE ANESTHETIC EFFECT OF  
THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**

Clarissa Giesel Heldwein<sup>1</sup>, Lenise de Lima Silva<sup>1</sup>, Patrícia Reckziegel<sup>2</sup>, Francisco  
Maikon Corrêa de Barros<sup>1</sup>, Marilise Escobar Bürger<sup>2</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>2</sup>, Carlos  
Augusto Mallmann<sup>3</sup>, Denise Schmidt<sup>4</sup>, Bráulio Otomar Caron<sup>4</sup>, Berta Maria  
Heinzmann<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia Industrial, UFSM

<sup>2</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária, UFSM

<sup>4</sup> UFSM-CESNORS, Campus Frederico Westphalen

\*Corresponding author

Berta Maria Heinzmann

Departamento de Farmácia Industrial

Universidade Federal de Santa Maria

Prédio 26, Campus Universitário

BR-97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: hberta@ccs.ufsm.br

Phone: + 5555 3220 9674 Fax: + 5555 3220 8248

## Abstract

*Lippia alba* is an aromatic herb whose essential oil (EO) has presented anesthetic propriety in silver catfish (*Rhamdia quelen*). The aim of this study was to verify the composition of the EO of *L. alba*, its anesthetic potential and the possible involvement of GABAergic system on this anesthetic effect. For the study of this mechanism, we propose a new animal model using fish exposed to anesthetic bath. In order to observe the induction and potentialization of anesthetic effect of EO, the experiment 1 was performed with juveniles of silver catfish, which were placed in aquaria (1L) containing different concentrations (50, 100 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) of EO of *L. alba* in presence or absence of diazepam (150  $\mu\text{M}$ ), (an agonist of high-affinity binding sites for benzodiazepinic (BDZ) sites coupled to GABA<sub>A</sub> receptor complex). In experiment 2 another fish group was previously anesthetized as described above and then transferred to an anesthetic-free aquarium containing flumazenil, (a selective antagonist of binding sites for BDZ sites coupled to GABA<sub>A</sub> complex), or water to assess recovery time from anesthesia. The results showed that diazepam potentiates the anesthetic effect of the EO in all concentrations tested. Fish exposed to diazepam and EO at 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  showed faster recovery from anesthesia when flumazenil was added to the recovery bath. Regarding to the chemical composition of the analyzed EOs, the major components were almost the same but variations appear in their percentage. In conclusion, our results showed the involvement of the GABAergic system on the anesthetic effect of the EO of *L. alba*.

Key-Words: false-melissa, silver catfish, benzodiazepines, flumazenil, GABA

## 1. Introduction

Different substances and combinations of substances, such as barbiturates, quinaldine, tricaine methanesulfonate (MS 222), metomidate, etomidate and benzocaine have been used to induce anesthesia in different species of fish and, consequently, minimize stress in these animals (Muench, 1958; Amend et al., 1982; Mattson and Ripley, 1989; Gomes et al., 2001). However, in the last years, natural products, as clove oil and isoeugenol (AQUI-S), have demonstrated less toxicity and similar or superior effectiveness as anesthetic for fish (Okamoto et al., 2009; Sattari et al., 2009).

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown known as “false-melissa” in Brazil, has been commonly used for its sedative propriety, which has been demonstrated in some studies (Vale et al., 1999; 2002). Recently, the essential oil (EO) of *L. alba* had its anesthetic effect verified in silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Cunha et al., 2010). The EO of this plant is considered a new natural sedative and anesthetic agent with a promising use in aquaculture practices due to the reduction of the stress in fish and consequently of the economic losses in fish culture (Cunha et al., 2010).

Most anesthetics exert their effects by regulating GABA (gamma-aminobutyric acid) receptor complex, since GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) (Sieghart, 2006). The synaptic GABA release activates GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> ionotropic receptors, and also the metabotropic receptor GABA<sub>B</sub> (Tanelian et al., 1993; Alexander et al., 2008). GABA<sub>A</sub> receptors have been implicated in the majority of GABAergic signaling in mammals. High-affinity binding sites for benzodiazepines (BDZ) are called as “central BDZ receptor”, where these allosteric modulatory exert their pharmacological action. The activation

of these sites enhance GABA-induced chloride ion flux, resulting in hiperpolarization and central depression. Expression of the GABAergic system seems to be analog among vertebrates, from fishes to mammals (Delgado and Schmachtenberg, 2008). This system was detected in some brain parts of zebrafish (Kim et al., 2004; Delgado and Schmachtenberg, 2008) and could be involved in the response to anesthetics. The mechanism of action of the EO of *L. alba* was not identified yet. In order to verify the mechanism of the anesthetic effect of this EO, we propose a new animal model using silver catfish to determine the GABAergic mechanism in fish exposed to anesthetic bath.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Plant material**

*L. alba* was grown at the CESNORS campus, Frederico Westphalen-RS (geographically situated a 27°23'26" south latitude, 53°25'43" west longitude and 461,3 m of level). The species was identified by Gilberto Dolejal Zanetti, Department of Industrial Pharmacy, UFSM, and a voucher specimen (SMDB No. 10050) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM.

### **2.2 EO extraction and analysis**

EO was obtained from the fresh leaves by hydrodistillation process with a Clevenger type apparatus (European Pharmacopeia, 2007), by 2 h. The yield was calculated w/w (%). The EO was stored at - 20°C until composition analysis and tests. For comparison purposes, the composition of the EO used in this study (EO 1)

and the corresponding data for the EO used by Cunha et al (2010) (EO 2) are presented in table 1. Both EOs had their compositions analyzed by GC-MS.

GC-MS TIC analysis was performed using an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector, under the following conditions: HP-5MS column (5%-phenyl - 95%-methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ); EI-MS: 70 eV; Operating conditions: split inlet 1:100; temperature program, 40-260°C; 40°C for 4 min; ramp rate, 4°C/m in; carrier gas He: flow rate, 1 mL/min; injector and detector temperature, 220°C; interface temperature 250°C; Databank NIST 2002.

The constituents of the EOs were identified by comparison of the mass spectra with a mass spectral library (NIST, 2002) and the Kovats retention index with literature data (Adams, 2001).

### 2.3 Animals

Juvenile silver catfish ( $9.30 \pm 1.85$  g;  $10.15 \pm 0.95$  cm) were housed in continuously aerated 250 L tanks ( $18.46 \pm 0.51$ °C; pH  $7.47 \pm 0.073$ ; total ammonia levels  $0.0883$  mg L<sup>-1</sup>; dissolved oxygen levels  $8.84 \pm 0.37$  mg L<sup>-1</sup>). A semi-static system was used and 50% of the water volume was changed daily. The fish received a commercial diet (Vicente Alimentos S.A. Presidente Prudente/SP, Brazil) with 3.5% Ca<sup>2+</sup>, 28.0% crude protein and 3500 kcal kg<sup>-1</sup> digestible energy, according to the manufacturer. Juveniles were fed once a day and were fasted for a period of 24 h prior to the experiments. The water parameters were measured before the experiments. Dissolved oxygen and temperature were measured with an YSI oxygen meter (Model Y5512; YSI Inc. Yellow Springs, OH, USA). The pH was verified with

DMPH-2 pH meter (Digimed, São Paulo, SP, Brazil) and nesslerization verified total ammonia levels according to the method of Greenberg et al. (1976).

Experiments were approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (Process N. 23081.014553/2009-39).

#### 2.4 Standardization of the test conditions

Previously to the potencialization test, diazepam concentration (BDZ) (DEG, Brazil) was standardized. Fish were transferred to 1 L aquaria with BDZ at 25, 100 and 150  $\mu\text{M}$ , previously solubilized in 0.033% Tween 80. To evaluate the time required for stages of anesthesia induction, three juveniles were used for each concentration tested, and each juvenile was used only once, according to the method of Schoettger and Julin (1967). The maximum time of observation was 30 minutes. After induction, animals were transferred to an anesthetic-free aquarium to assess the recovery time.

For mechanism tests, flumazenil (Flumazil®, Cristália, Brazil) concentration in the recovery bath was also standardized. Fish ( $n = 6$ ) were submitted to sedation induction with BDZ 150  $\mu\text{M}$  in 1 L aquaria. After induction animals were separated in two groups: one group was transferred to an anesthetic free aquarium with water and the second group was placed in aquarium containing flumazenil. In both groups, fish behavior was noted by scores after 1, 5, 10, 15 and 20 minutes, as described in table 2. At the end of 20 minutes, the sum of scores of each fish was calculated. When agitation was verified in the performed fish, we added 0.5 in the score of this time. Each observation included an external stimulus to observing the fish, because they



tend to remain stationary. This stimulation corresponded to successive hits made with a glass rod at the bottom of the aquarium.

## 2.5. Experiment 1: Potencialization with BDZ

Different concentrations (50, 100 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) of EO of *L. alba* (previously diluted 1:10 in ethanol) were placed along with BDZ (150  $\mu\text{M}$ ) in 1L aquaria. Six fish were tested individually for each concentration. Evaluation of BDZ that corresponds to BDZ with vehicle of EO, EO with vehicle of BDZ and both vehicles (Tween 80 and ethanol in the same proportions used) were also performed. The evaluation of the stages of anesthesia induction and recovery time was done according to the protocol described in item 2.4.

## 2.6. Experiment 2: Reversion of anesthetic effects

The same protocol described previously in item 2.4 was repeated with the EO of *L. alba* at 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ . After induction fish were separated in two groups: one group was transferred to an anesthetic free aquarium with water and the second group was placed in aquarium containing 5  $\mu\text{M}$  of flumazenil. The results were noted by scores (table 2) after 1, 5, 10, 15 and 20 minutes and expressed by the sum of the scores.

## 2.5. Statistical analyses

To verify the homogeneity of variances, all data were submitted to a Levene test. One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used in the potentiation test, when appropriated (SPSS version 17.0). Results of the mechanism test were compared by two-way ANOVA and Tukey's test with Sigma Plot (version 11.0). Significance was set at a level of 95% ( $p < 0.05$ ). Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

### 3. Results

#### 3.1 EO composition

The EO yield was 0.35%. The chemical composition of the EO used in this work (EO1) is similar to the corresponding data of the EO used by Cunha et al. (2010) (EO2). However, EO1 contained 49 identified compounds while the EO2 contained 62 compounds. The monoterpene compounds represent 45.16% of EO1 and 40.81% of EO2, and the sesquiterpenes 43.55 and 53.06 %, respectively. The major components of the EOs were linalool (59.66 and 37.47 %), 1,8-cineole (9.11 and 8.59 %), camphor (3.15 and 6.87 %), germacrene D (3.78 and 5.40 %) and  $\beta$ -cariophyllene (2.84 and 4.09 %) (Table 1).

#### 3.2 Standardization of the test conditions

Fish exposed to 25  $\mu$ M BDZ reached deep sedation (stage 2), while in those exposed to 100 and 150  $\mu$ M presented total loss of equilibrium (stage 3a). Silver

catfish exposed to the studied concentrations of diazepam did not reach stage 4 of anesthesia. The concentration of 150  $\mu\text{M}$  was chosen for the subsequent tests because fish reach stage 3a in a relative short time and show a high recovery time when compared to those exposed to 100  $\mu\text{M}$ . The high recovery time was required in order to better determine the efficacy of the antagonist in the mechanism tests.

The standardization of flumazenil concentration was performed by testing 0.05, 1.0 and 5.0  $\mu\text{M}$  of this GABA receptors antagonist. Scores of recovery from anesthesia in fish exposed to 1  $\mu\text{M}$  (data not shown) and 5  $\mu\text{M}$  of flumazenil were significantly different from control ( $p < 0.05$ ). Fish that recovered in water with flumazenil 0.05  $\mu\text{M}$  showed scores ( $7.8 \pm 0.3$ ) not significantly different from animals that recovered in water alone ( $8.5 \pm 0.3$ ). In this test the highest score is related to fish whose recovery from anesthesia occurs faster.

### 3.3 Experiment 1: Potentialization with BDZ

The ethanol used for dilution of the EO of *L. alba*, used alone or together with benzodiazepinic drug had no significant effect on the induction time of anesthesia (data not shown), but recovery time was significantly faster at 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  OE ( $p < 0.05$ ) (Figure 1).

The combination BDZ+EO of *L. alba* reduced significantly time to reach anesthesia compared to the EO alone, i.e., BDZ potentialized deep sedation (stage 2) and total loss of equilibrium (stage 3a) of the EO of *L. alba*, except in those exposed to 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  regarding stage 2a (Figure 1A and 1B). The concentration of 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  of EO, which only leads to stage 3a, in combination with BDZ leads to anesthesia or stage 4. The highest EO concentrations evaluated (100 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$

<sup>1</sup>) also lead to stage 4, but the combination with BDZ decreased the time to reach this stage (Figure 1C). The time to recover from EO of *L. alba* anesthesia was significantly higher in fish exposed to 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  and the combination BDZ +EO of *L. alba* did not change recovery time (Figure 1D).

### 3.4 Experiment 2: Reversion of anesthetic effects

Fish anesthetized with EO of *L. alba* (300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) or exposed to BDZ presented significantly higher sum of recovery scores when recover in water with flumazenil than in water alone ( $P < 0.05$ ) (Figure 2). Therefore, recovery was faster in water with flumazenil.

## 4. Discussion

The EO used in this study, and also by Cunha et al. (2010), was obtained from *L. alba* chemotype linalool. This chemotype was previously described by Frighetto et al. (1998) and Duarte et al. (2005). Comparing the compositions of the EO used in this study and those used by Cunha et al. (2010), we observed similar chemical compositions. Whereas the percentage of the major components presented discrepancies, the effects observed for the anesthetic natural mixture used without BDZ were expected and we demonstrated that the EO used in our assays can reproduce the effect observed by Cunha et al (2010). However, the time to achieve stage 4 was higher in this study than that observed by Cunha et al. (2010). This fact can be explained by the different percentage of some compounds, including the major compound (linalool).

GABA complex ligands include agonists, antagonists and modulators. Typically, some behavioral effects that resulted of positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors are anxiolysis, cessation of convulsions, sedation and general anesthesia (Onaivi et al., 1992; Wolffgramm et al., 1994; Johnston, 2006). All these activities were described for the EO of *L. alba* (Vale et al., 1999; 2002; Furtado et al., 2000; Viana et al., 2000; Cunha et al., 2010). Additionally, Vale et al. (1999) verified that EOs of *L. alba* belonging to limonene and citral chemotypes have similar pharmacological profiles to benzodiazepines (BDZ), being possible that they might interact with the binding sites for benzodiazepines located adjacent to the GABA complex.

The possible GABAergic involvement was evaluated by the potentiation of the anesthetic effect of the EO of *L. alba* with BDZ. The best result observed in this study was regarding the induction of anesthesia with the lowest concentration of EO tested. This indicated clearly the synergism of the compounds, and made possible the use of them in association to reduce the concentration of both in fish anesthesia. Additionally, the results indicate that the EO of *L. alba* have some activity on GABA-receptor complex. This finding was confirmed by the faster recovery observed with flumazenil after EO bath. In the animal model developed in this work, the sum of scores is performed at the end of 20 min of observation. Following, these values were converted to percentages. In this calculation, 100% was considered the higher number of the sum (17.5), which corresponds to the maximum score possible. Fish exposed to EO showed recovery score percents of 40.91% with flumazenil and 20.00% in water. Similar to this behavior, for the standard drug (BDZ) we observed recovery scores percents of 68.57% in flumazenil and 52.34% in water.

The faster recovery indicates that the depressor effects of BDZ or EO GABA<sub>A</sub> mediated were reversed by flumazenil. In fact, this study demonstrates the involvement of GABA<sub>A</sub> receptors on the anesthetic effect of the EO of *L. alba* in *Rhamdia quelen*. However the occurrence of against-regulatory mechanisms can not be excluded.

The literature describes the CNS activity of some essential oils, including the effect on the GABAergic system (Umezu, 1999; Koo et al., 2003; Hossain et al., 2004; Rakhshandah and Hosseini, 2006). Some natural products, including terpenoids, which are the main components of the EO tested, have exhibited actions on GABA<sub>A</sub> receptors (Johnston et al., 2006). Some of these constituents, as  $\alpha$ -pinene (Aoshima and Kamamoto, 1999), nerolidol (Hossain et al., 2002), linalool (Hossain et al., 2002; Aoshima et al., 2006), borneol (Granger, Campbell, Johnston, 2005) and viridiflorol (Jäger et al., 2007) are positive modulators of GABA<sub>A</sub> receptors, as described in literature. This result was also observed for EO1 and EO2, which contain these substances, as shown in table 1. However, knowing that EOs are complex mixtures of components and that some of their constituents can act by synergism, more studies are necessary to discover the active compound(s) responsible for the anesthetic effect of the EO of *L. alba*.

In conclusion, we are shown by the first time the effect of the BDZ on the potentialization of EO anesthetic effects in *R. quelen*. In addition the anesthetic effects of *L. alba* were reversed more quickly by flumazenil, suggesting the involvement of GABAergic system on this effect of the EO.

## Acknowledgements

This study was supported by research funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, process 10/0016-8) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, process 470964/2009-0). B. Baldisserotto and M. E. Bürger are grateful to CNPq by research fellowships; C.G. Heldwein is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by M.Sc. fellowship. Authors thank to Gilberto D. Zanetti for the botanical identification of *L. alba*.

**References:**

Adams R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation.

Alexander et al., 2008. GABA<sub>A</sub> (γ-aminobutyric acid). British Journal of Pharmacology, 153 (2), 101-103.

Amend, D.F., Goven, B.A., Elliot, D.G., 1982. Etomidate: Effective dosages for a new fish anesthetic. Transactions of the American Fisheries Society, 111, 337-341.

Aoshima, H.; Kamamoto, K., 1999. Potentiation of GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 63 (4), 743-748.

Aoshima, H., Takeda, K., Okita, Y., Hossain, S.J., Koda, H., Kiso, Y., 2006. Effects of Beer and Hop on Ionotropic γ-Aminobutyric Acid Receptors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 2514-2519.

Cunha, M.A., Barros, F.M.C., Garcia, L.O., Veeck, A.P.L., Heinzmann, B.M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B., 2010. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 306, 403-406.

Delgado, L.; Schmachtenberg, O., 2008. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABA<sub>A</sub>α1 and GABA<sub>B</sub>1 in the zebrafish cerebellum. Cerebellum, 7, 444–450.

Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 97, 305–311.

European Pharmacopeia (2007) Strassbourg, European Directorate for the Quality of Medicines 6<sup>th</sup> ed.

Frighetto, N., Oliveira, J.G., Siani, A.C., Chagas, K.C., 1998. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br (Verbenaceae) as a source of linalool. Journal of Essential Oil Research, 10, 578–580.



Furtado, E.C., do Vale, T.G., Viana, G.S.B., 2000. Anticonvulsivant effect of hidroalcoholic extract and essential oil from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, limonene-citral chemotype. *Pesquisa Medica de Fortaleza*, 3 (1-4), 28-37.

Gomes, L.C., Gomes, A.R.C., Lopes, N.P., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A.R.M., 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32 (4), 426–431.

Granger, R.E.; Campbell, E.L.; Johnston, G.A.R., 2005. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$  GABA<sub>A</sub> receptors. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 1101–1111.

Greenberg, A.E., Taras M.J., Rand M.C., 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14<sup>th</sup> edition, Bru-El Graphic, Springfield, 1193p.

Hossain, S.J., Hamamoto, K., Aoshima, H., Hara, Y., 2002. Effects of Tea Components on the response of GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3954-3960.

Hossain, S.J., Aoshima, H., Koda, H., Kiso, Y., 2004. Fragrances in oolong tea that enhance the response of GABA<sub>A</sub> receptors. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68 (9), 1842-1848.

Jäger, A.K., Almqvist, J.P., Vangsre, S.A.K., Stafford, G.I., Adsersen, A., Van Staden, J., 2007. Compounds from *Mentha aquatica* with affinity to the GABA-benzodiazepine receptor. *South African Journal of Botany*, 73, 518–521.

Johnston, G.A.R., Hanrahan, J.R., Chebib, M., Duke, R.K., Mewett, K.N., 2006. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Advances in Pharmacology*, 54, 285-316.

Kim, Y.J., Nam, R.H., Yoo, Y.M., Lee, C.J., 2004. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters*, 355, 29–32.

Koo, B.S., Park, K.S., Ha, J.H., Park, J.H., Lim, J.C., Lee, D.U., 2003. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26 (7), 978-982.

Mattson, N.S., Ripple, T.H., 1989. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83, 89-94.

Muench, B., 1958. Quinaldine, a new anesthetic for fish. *The Progressive Fish-Culturist*, 20, 42-44.

Okamoto, M.H., Tesser, M.B., Louzada, L.R., Santos, R.A., Sampaio, L.A., 2009. Benzocaine and eugenol as anaesthetics for pompano juvenile *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural*, 39 (3), 866-870.

Onaivi, E.S., Maguiri, P.A., Tsai, N.F., Davies, M.F., Locu, G.H., 1992. Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43 (3), 825-831.

Rakhshandah, H., Hosseini, M., 2006. Potentiation of pentobarbital hypnosis by *Rosa damascena* in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 910-912.

Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamif, A., Lourakzade, R., Bahonar, A., Mousavi, H.E., Niasari, A., 2009. Comparison of electroanesthesia with chemical anesthesia (MS-222 and clove oil) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using plasma cortisol and glucose responses as physiological stress indicators. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4 (6), 306-313.

Schoettger, R.A., Julin, M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Invest. Fish Contr.*, 13, 1-15.

Sieghart, W., 2006. Structure, pharmacology, and function of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Advances in pharmacology*, 54, 231-263.

Sugawara, Y., Hara, C., Tamura, K., Fujii, T., Nakamura, K-i., Masujima, T., Aoki, T., 1998. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta*, 365, 293-299.

Tanelian, D.L., Kosek, P., Mody, I., MacIver, M.B., 1993. The role of the GABA<sub>A</sub> receptor/ chloride channel complex in anesthesia. *Anesthesiology*, 78 (4), 757-776.

Umezu, T., 1999. Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64 (1), 35-40.

Vale, T.G., Matos, F.J.A., de Lima, T.C.M., Viana, G.S.B., 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, 167, 127-133.

Vale, T.G., Furtado, E.C., Santos Jr., J.G., Viana, G.S.B., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine*, 9, 709-714.

Viana, G.S.B., do Vale, T.G., Silva, C.M., Matos, F.J., 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 23 (11), p. 1314-1317.

Wolffgramm, J., Mikolaicz, K.C., Coper, H., 1994. Acute and subchronic benzodiazepine-barbiturate-interactions on behavior and physiological response of the mouse. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 349, 279-286.

Table 1: Chemical constituents of the essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown used in the present study (EO1) and by Cunha et al. (2010) (EO2).

Components	Relative %		Retention time		IK Calculated		IK Literature
	EO1	EO2	EO1	EO2	EO1	EO2	
$\alpha$ -thujone	-	0.04	-	10.5	-	925	930*
$\alpha$ -pinene	0.128	0.23	10.103	10.7	911	931	939*
Camphene	0.200	0.50	10.668	11.4	927	947	954*
$\alpha$ -phellandrene	1.324	-	11.762	-	954	-	1003*
sabinene	0.218	1.90	11.830	12.4	956	972	975*
1-octen-3-ol	0.102	-	12.152	-	964	-	979*
myrcene	0.841	1.37	12.577	13.1	974	990	991*
limonene	0.481	1.11	14.058	14.7	1007	1029	1029*
1,8- cineole	9.112	8.59	14.178	14.9	1011	1034	1031*
<i>Z</i> - $\beta$ -ocimene	0.092	0.13	14.525	15.1	1021	1038	1037*
<i>E</i> - $\beta$ -ocimene	0.666	0.62	14.933	15.5	1032	1048	1050*
$\gamma$ -terpinene	0.027	0.04	15.298	15.9	1041	1059	1060*
<i>Z</i> -sabinene hydrate	0.137	-	15.656	-	1051	-	1070*
<i>E</i> -linalool oxide	-	0.47	-	16.5	-	1073	1073*
isoterpinolene	-	0.48	-	16.9	-	1085	1088*
<i>Z</i> -linalool oxide	0.053	0.16	15.919	17.1	1057	1089	1087*
terpinolene	0.225	-	16.490	-	1071	-	1089*
<i>E</i> -sabinene hydrate	0.022	-	16.944	-	1082	-	1098*
linalool	59.66	37.47	17.331	18.0	1091	1111	1097* 1094**
3- <i>Z</i> -hexenyl isobutanoate	-	0.03	-	19.2	-	1143	1147*
hotrienol	0.105	-	17.379	-	1092	-	1104**
1,3,8- <i>p</i> -mentatriene	0.072	-	17.906	-	1106	-	1110*
6-camphenol	0.039	-	18.082	-	1111	-	1114*
camphor	3.153	6.87	18.762	19.5	1130	1152	1146* 1144**
<i>E</i> -chrysanthenol	0.026	-	19.234	-	1143	-	1164*
biciclo[2.2.1] heptan-3-ona,6,6-dimetil, 2-metilene	0.288	-	19.458	-	1149	-	1149**

pinocarvone	-	0.66	-	20.0	-	1165	1165*
borneol	0.369	1.06	19.577	20.4	1153	1176	1169*
<i>p</i> -mentha-1,5-dien-8-ol	0.648	-	19.651	-	1155	-	1170*
neiso-isopulegol	0.089	-	19.959	-	1163	-	1171*
terpinen-4-ol	0.075	-	20.032	-	1165	-	1177*
$\alpha$ -terpineol	0.583	0.88	20.564	21.3	1178	1199	1189*
myrtenal	0.106	0.09	20.762	21.2	1183	1198	1196*
2,6-dimetil-3,5,7-octatrien-2-ol, <i>Z,Z</i>	0.644	-	21.010	-	1190	-	1090**
2,6-dimetil-3,5,7-octatrien-2-ol, <i>E,E</i>	1.652	-	21.313	-	1197	-	1134**
citronellol	0.024	-	22.036	-	1219	-	1226*
neral (citral b)	0.147	-	22.485	-	1232	-	1238*
geranial (citral a)	0.144	-	23.572	-	1263	-	1267*
isobornyl acetate	0.070	0.16	24.115	24.3	1278	1285	1286*
myrtenyl acetate	-	0.03	-	25.7	-	1325	1327*
$\delta$ -elemene	0.035	0.03	25.933	26.0	1332	1335	1338*
exo-2-hydroxycineole acetate	0.107	-	26.123	-	1338	-	1354**
$\alpha$ -cubebene	0.013	0.02	26.359	26.4	1345	1346	1351*
$\alpha$ -copaene	0.193	0.38	27.261	27.4	1373	1375	1377*
$\beta$ -burbonene	0.170	0.12	27.580	27.6	1382	1383	1388*
$\beta$ -elemene	1.325	0.69	27.841	27.8	1390	1389	1391*
$\alpha$ -gurjenene	0.023	0.07	28.426	28.4	1407	1406	1410*
$\beta$ -cariophyllene	2.841	4.09	28.773	28.8	1419	1420	1419*
$\beta$ -copaene	0.112	0.15	29.067	29.1	1429	1429	1432*
$\gamma$ -elemene	0.912	-	29.225	-	1434	-	1437*
$\alpha$ -humulene	0.364	0.89	29.880	29.9	1455	1456	1455*
<i>E</i> - $\beta$ -farnesene	0.211	-	29.970	-	1458	-	1458**
allo-aromadendrene	0.168	0.28	30.122	30.0	1463	1460	1460*/1459**
$\gamma$ -murolene	-	0.16	-	30.6	-	1476	1480*
$\alpha$ -amorphene	0.108	-	30.659	-	1479	-	1485*/1480**
germacrene D	3.784	5.40	30.823	30.8	1484	1483	1485*

							1486**
4-epi-cubebol	0.089	-	31.231	-	1497	-	1494*
Bicyclogermacrene	0.136	0.27	31.284	31.2	1499	1495	1500*
$\alpha$ -murolene	0.228	0.58	31.400	31.3	1502	1498	1500*
germacrene A	-	0.88	-	31.6	-	1508	1509*
10-epi-cubebol	0.424	-	31.891	-	1520	-	1535*
$\gamma$ -cadinene	0.357	1.16	32.135	31.7	1529	1513	1523*
Z-nerolidol	0.177	-	32.601	-	1545	-	1533*
germacrene B	-	3.65	-	33.1	-	1561	1561*
E-nerolidol	-	0.58	-	33.2	-	1564	1563*
germacrene D-4-ol	1.054	2.56	33.786	33.7	1585	1580	1576*
cariophyllene oxide	0.617	0.91	34.027	33.8	1593	1584	1583*
viridiflorol	0.056	-	34.650	-	1616	-	1593*
humulene epoxide II	-	0.15	-	34.6	-	1612	1608*
1,10-di-epi-cubenol	-	0.12	-	34.8	-	1617	1619*
$\tau$ -cadinol	-	0.17	-	35.5	-	1645	1640*
$\tau$ -muurolol	0.214	0.53	35.762	35.6	1656	1647	1642*
$\alpha$ -muurolol	-	0.18	-	35.7	-	1650	1646*
14-hidroxy-9-epi-E-cariophyllene	0.175	-	35.988	-	1664	-	1670*
$\alpha$ -cadinol	0.252	0.62	36.143	35.9	1670	1659	1654*
14-hidroxy- $\alpha$ -muurolene	0.256	-	39.111	-	1780	-	1780*
$\Sigma$ (%) of identified compounds	<b>90.35</b>	<b>95.75</b>					

\* ADAMS, 2001.

\*\* Databank NIST, 2002.

Table 2: Scores of recovery after anesthesia in fish.

Scores	Behavior
0	Without any sign of recovery
0.5	Reaction only after a caudal peduncle stimulus
1	First sign of recovery but without posture
1.5	Stopped after erratic swimming
2	Normal swimming, but without reflex after external stimulus
2.5	Stopped after normal swimming, but without reflex after external stimulus
3	Normal swimming with reflex after external stimulus

Table 3: Standardization of diazepam concentration: time to silver catfish *Rhamdia quelen* reach different stages of anesthesia and recovery. Silver catfish exposed to the studied concentrations of diazepam did not reach stage 4 of anesthesia.

	Diazepam ( $\mu\text{M}$ )		
	25	100	150
Stage 1	43.67 $\pm$ 6.89	75.67 $\pm$ 13.67	99.67 $\pm$ 17.83
Stage 2	522.33 $\pm$ 203.09ab	998.00 $\pm$ 15.10b	370.33 $\pm$ 87.29a
Stage 3a	--	1336.00 $\pm$ 85.00b	545.66 $\pm$ 74.03a
Recovery time	--	310.00 $\pm$ 31.56b	1100.00 $\pm$ 100.00a

Different letters in the rows indicate significant differences by ANOVA supplemented by Tukey test ( $p < 0.05$ ).



Figure 1: Time required for induction and recovery from anesthesia using the essential oil of *L. alba* (EO), diazepam (BDZ) and the combination essential oil + diazepam (EO + BDZ) in silver catfish juveniles. Stages according to Schoettger and Julin (1967). Maximum observation time was 30 min. Time to reach different stages of anesthesia: A - stage 2 ; B - stage 3a ; C - stage 4 ; D - recovery time. Different letters indicate significant difference between EO concentrations in the same group: EO, BDZ or EO+BDZ;

\* significantly different from group EO tested at the same concentration ( $p < 0.05$ ).

Figure 2: Sum of the scores of recovery after anesthesia in silver catfish *Rhamdia quelen*. Significant differences from recovery in water are demonstrated by \* ( $p < 0.05$ ).

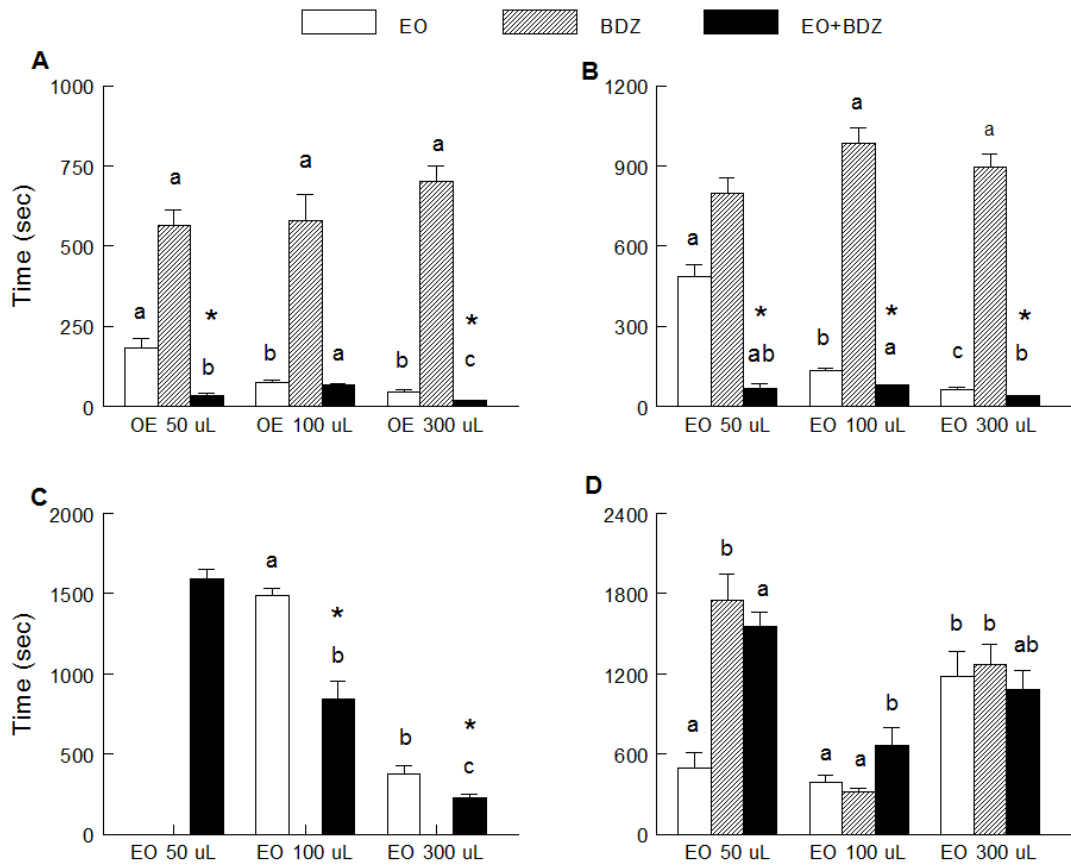


Figure 1

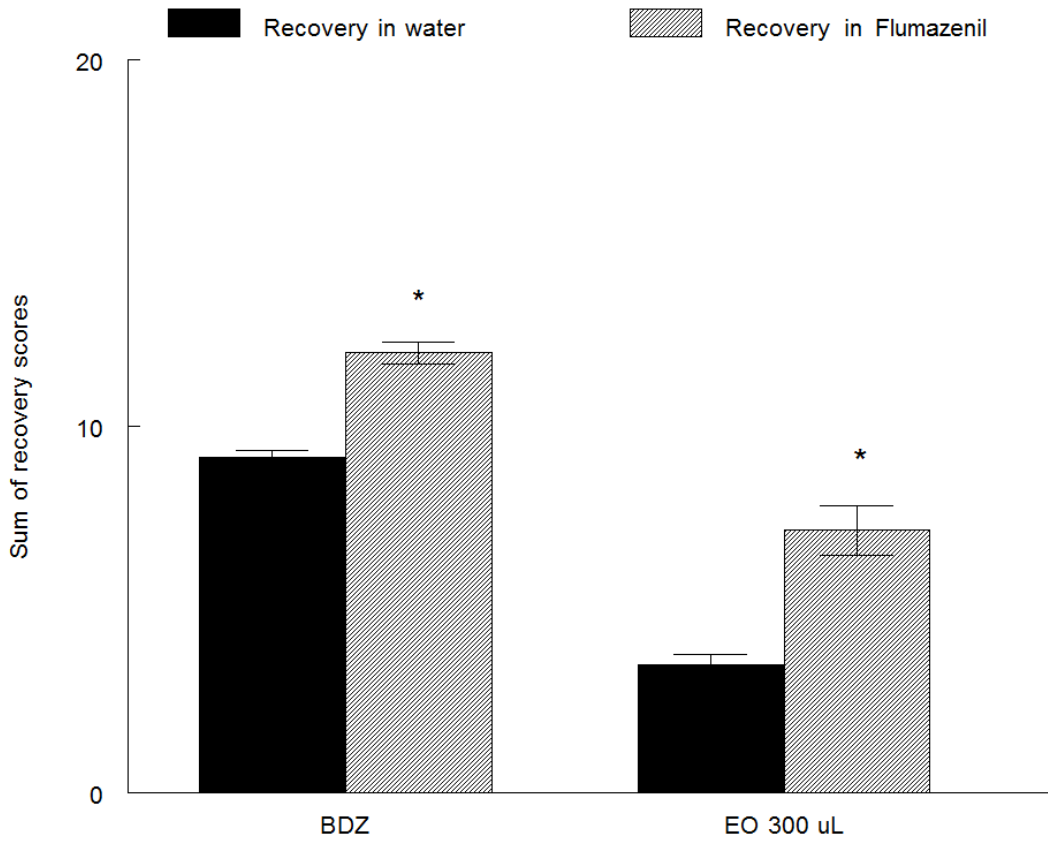


Figure 2

### 6.3 Manuscrito 3

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; GAI, E.Z.; ROMAN, C.; PARODI, T.V.; BÜRGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M; HEINZMANN, B.M. Sedative and anesthetic properties of a monoterpenoid isolated from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown in *Rhamdia quelen* and studies on its mechanism of action.

**SEDATIVE AND ANESTHETIC PROPERTIES OF A MONOTERPENOID  
ISOLATED FROM *Lippia alba* (Mill.) N.E. BROWN IN *Rhamdia quelen* AND  
STUDIES ON ITS MECHANISM OF ACTION**

Clarissa Giesel Heldwein<sup>1</sup>, Lenise de Lima Silva<sup>1</sup>, Eduarda Zago Gai<sup>1</sup>, Cassiela Roman<sup>1</sup>, Thaylise Vey Parodi<sup>2</sup>, Marilise Escobar Bürger<sup>2</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>2</sup>,  
Érico Marlon de Moraes Flores<sup>3</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM, <sup>3</sup>Departamento de Química, UFSM.

\*Corresponding author

Berta Maria Heinzmann

Departamento de Farmácia Industrial

Universidade Federal de Santa Maria

Prédio 26, Campus Universitário

BR-97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: hberta@ccs.ufsm.br

Phone: + 5555 3220 9674 Fax: + 5555 3220 8248

## Abstract

*Lippia alba* (Mill) N. E. Brown is an aromatic herb whose essential oil (EO) has presented anesthetic propriety in silver catfish (*Rhamdia quelen*), which seems to involve the gabaergic system. The aim of the present study was isolate the main active compound of the EO of *L. alba* with sedative and/ or anesthetic properties and to verify the involvement of GABAergic system on this activity. The major compound (1) of the EO was isolated by chromatographic methods. Spectroscopic analysis indicates the structure of linalool. Results of anesthetic assays in juveniles of silver catfish showed that 1 has a similar sedation profile to the EO, however, it has a different profile of anesthesia. An animal model developed in fish to evaluation of mechanism of action for anesthetic agents was used to determine the potentialization. Silver catfish were exposed to both 1 (30, 60 and 180  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) and diazepam (150  $\mu\text{M}$ ) bath and then were allocated in other bath to assess anesthesia recovery in water with flumazenil. Fish exposed to diazepam showed faster anesthesia recovery in water with flumazenil, but the same did not occur with 1. Our results demonstrated that 1 has sedative and anesthetic properties, but its mechanism of action seems not to involve the GABAergic system. We conclude that 1 is not the only active substance with depressing property on the central nervous system present in the EO, which contains other compounds that can act in synergism with 1, whose mechanism of action may involves the GABAergic system.

Key-Words: Linalool, anesthesia, sedation, silver catfish

## 1. Introduction

Essential oils (EOs) are complex mixtures of volatile compounds. Most studies have focused the attention on their antimicrobial, repellent or larvicidal effects (Dorman and Deans, 2000; Choochote et al., 2007; Cheng et al., 2009). However recent studies had demonstrated the potential of EOs and their isolated compounds as anesthetics in aquaculture to minimize stress and mortality during handling and transportation (Gonçalves et al., 2008; Cunha et al., 2010a,b).

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, known as "false-melissa", is an aromatic shrub commonly used as a tranquilizer. Central activities as sedative (Vale et al., 1999; 2002) and anticonvulsivant (Viana et al., 2000) have been demonstrated for the EO of this species. More recently, the anesthetic property of its EO was described in silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Cunha et al., 2010a) and this action was correlated to GABAergic system (Heldwein et al., 20XX). No studies aimed to identify the compound responsible for the anesthetic activity of the EO of *L. alba* in fish.

Several studies have shown the involvement of some OE constituents as carvacrol, borneol and thymol with the GABA<sub>A</sub> system (Mohammadi et al., 2001; Granger et al., 2005; Melo et al., 2009). Thus, the aim of the present study was to isolate and identify the major active compound of the EO of *L. alba* and to verify if its mechanism of action has an involvement with the GABAergic system, as detected for the EO.

## 2. Material and methods

## 2.1 Plant material

*L. alba* was grown at the CESNORS campus, Frederico Westphalen-RS (geographically situated at 27°23'26" south latitude, 53°25'43" west longitude and 461,3 m of level) and collected in January 2009 and February 2010. The species was identified by Dr. Gilberto Dolejal Zanetti, Department of Industrial Pharmacy, UFSM. A voucher specimen (SMDB No. 10050) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM.

## 2.2 Extraction of the essential oil of *L. alba*

The essential oil (EO) was obtained from the fresh leaves by hydrodistillation process with a Clevenger type apparatus by 2 h, according to the European Pharmacopeia (2007). The samples were stored at - 20°C until isolation procedure and pharmacological tests. The EO composition was previously analyzed by GC-MS and described by Heldwein et al. (20XX).

## 2.3 Isolation and identification of 1

EO of *L. alba* (5 g) was submitted to a chromatography column (CC) (22.5 cm x 3.2 cm), containing 70 g of silica-gel 60 (Merck, 70-230 mesh). The compounds were eluted with a mixture of hexane:acetone (95:5 v/v), at maximum flux. Fractions (50 mL) were monitored by TLC (sílica gel F254, hexane:acetone 95:5 v/v, detection: anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and pooled according to their chromatographic profiles and then concentrated under reduced



pressure, at 40 °C. Fraction 4 (701 mg) was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) as described by Barros et al. (2009). Compound 1 was identified by comparison of its chromatographic and spectroscopic data with a mass spectral library (NIST, 2002) and literature data (Adams, 2001).

Compound 1: Rf (hexane:acetone 95:5): 0.18; Rt (GC): 17.37 min; GC KI: 1092; EI-MS m/z (%): 154 [M<sup>+</sup>] (0.3), 136 (6.8), 121 (22), 107 (7), 93 (72), 83 (16), 80 (30), 71 (99), 69 (43), 67 (24), 55 (62), 53 (19), 43 (83), 41 (85), 39 (35); <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR: according to Barros et al., 20XX;

#### 2.4 Animals

Juvenile silver catfish (9.24±2.83 g; 10.25±1.08 cm) were housed in continuously aerated 250 L tanks (18.35±0.65°C, pH 7.45±0.095, total ammonia levels 0.08569 mg L<sup>-1</sup>, dissolved oxygen levels 8.99±0.41 mg L<sup>-1</sup>). A semi-static system was used and 50% of the water volume was changed daily. The fish received a diet of commercial feed (Vicente Alimentos S.A. Presidente Prudente/SP, Brazil) with 3.5% Ca<sup>2+</sup>, 28.0% crude protein and 3500 kcal kg<sup>-1</sup> digestible energy, according to the manufacturer. Juveniles were fed once a day, at 12:00 a.m. and were fasted for a period of 24 h prior to the experiments.

The methodology used in this study was approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (Process N. 23081.014553/2009-39).

## 2.5 Anesthetic evaluation of 1 and comparison with the corresponding activity of the essential oil of *L. alba*

Fish were transferred to 1 L aquaria and 1 at 30, 60 and 180  $\mu\text{L L}^{-1}$  (25.5, 51 and 153  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively, considering the density of 0.85) previously solubilized in ethanol (1:10). The ethanol used to dilution had no effect on the induction time of anesthesia (Cunha et al., 2010b). To evaluate the time required for stages of anesthesia induction, six juveniles were used for each concentration tested, and each juvenile was used only once, according to the method of Schoettger and Julin (1967). The maximum observation time was 30 minutes. After induction, the animals were transferred to an anesthetic-free aquarium to assess the recovery time.

Induction and recovery times of 1 (30, 60 and 180  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) were compared with EO of *L. alba* (50, 100 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). These concentrations were chosen in order to maintain the proportion of 1 in the EO (60%) used in the study of Hedwein et al. (20XX).

## 2.6 Potentialization of the depressant effects of 1 on the CNS by benzodiazepinic (BDZ) drug

Different concentrations of 1 (30, 60 and 180  $\mu\text{L L}^{-1}$ , diluted in ethanol 1:10) were placed together with 150  $\mu\text{M}$  BDZ, (DEG, Brazil), previously solubilized in tween 80 at 0.033 %, in 1 L aquaria. BDZ with vehicle of EO, EO with vehicle of BDZ and both vehicles (Tween 80 and ethanol in the same proportions used in the solutions) were also performed.

## 2.7 Reversion the depressor effects of 1 on the CNS

In order to evaluate the possible benzodiazepinic mechanism, the fish previously submitted to 1 or BDZ were allocated into aquarium containing flumazenil, an benzodiazepinic selective antagonist. Thus, after anesthesia induction with 1 at 30 and 180  $\mu\text{L L}^{-1}$ , animals were separated in two groups: one group was transferred to an anesthetic free aquarium with water and the second group was placed in an aquarium containing 5  $\mu\text{M}$  of flumazenil. The animals of both groups were submitted to an external stimulus to facilitate the observation of their behavior. The results were noted by scores, as described by Heldwein et al., 20XX after 1, 5, 10, 15 and 20 minutes. After the observation period, the scores were added for each evaluated fish. When the performed fish showed a stage of agitation after 20 min, we added 0.5 to the score.

## 2.8 Statistical analyses

To verify the homogeneity of variances, the data were submitted to a Levene's test. T-test was used to compare the anesthetic activity of the EO of *L. alba* with the corresponding activity of 1. One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used in the potentialization test, when appropriate (SPSS version 17.0). Results of the reversion test were compared by two-way ANOVA and Tukey's test with Sigma Plot (version 11.0). Significance was set at a level of 95% ( $p < 0.05$ ). Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

### 3 Results

#### 3.1 Anesthetic evaluation of 1 and comparison with the corresponding activity of the essential oil of *L. alba*

The comparison of the results concerning the anesthetic property of 1 with the corresponding data for the EO of *L. alba* is showed in figure 1. A relationship could be determined for 1 at stage 2 ( $\ln y = 9.0591 - 1.0837 \ln(x)$ ) with  $r^2 = 0.999$ , where  $y$  is the time to reach the stage and  $x$  is the concentration of 1 ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ). According to the results, the concentration of  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  1 only leads to stage 2 ( $218.66 \pm 29.83$  s) within 30 min of observation. At the concentration of  $180 \mu\text{L L}^{-1}$ , 1 leads also to stage 4 in a relative short time ( $706.8 \pm 68.56$  s). The results concerning the recovery time demonstrated a positive correlation among its duration and the contact period with the natural anesthetic agent.

Figure 1A showed significant differences in all stages of anesthesia induction for the lowest concentrations of 1 and EO tested ( $30$  and  $50 \mu\text{L L}^{-1}$ , respectively), except in stage 2. At the intermediate concentrations tested ( $60 \mu\text{L L}^{-1}$  1 and  $100 \mu\text{L L}^{-1}$  EO, Fig. 1B), significant differences for all stages can be observed, except for stage 3a. However, the higher concentrations evaluated ( $180 \mu\text{L L}^{-1}$  1 and  $300 \mu\text{L L}^{-1}$  EO, figure 1C) presented more similarity among the stages, except in the stage 1 and 4 ( $p < 0.05$ ).

#### 3.2 Potentiation of the depressant effects of 1 on the CNS by BDZ

The ethanol used for dilution of 1 and added proportionally to the controls of benzodiazepinic drug (BDZ + vehicle of EO group) had no significant effect on the time for anesthesia induction. However, on the recovery time the controls of BDZ demonstrated significant differences in all concentrations ( $p < 0.05$ ).

Using  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  of 1 plus BDZ (1+BDZ group) we observed significant differences in time for anesthesia induction ( $p < 0.05$ ) compared with 1 and BDZ alone. However, when the concentration of 1 was increased no differences were observed among 1, BDZ and 1 plus BDZ (Figure 2A).

For stage 3a, significant differences among the combination 1 plus BDZ, compound 1 and BDZ alone were also observed for the lower ( $30 \mu\text{L L}^{-1}$ ) and higher ( $180 \mu\text{L L}^{-1}$ ) concentrations of 1 ( $p < 0.05$ ) (Figure 2B).

At stage 4 of anesthesia no significant differences were detected among 1 and 1 plus BDZ (Figure 2C), and indicates potentialization absence of the anesthetic effect of 1 with BDZ. Finally, the results regarding the recovery times did not follow a dose-response curve, which was verified in all analyzed groups (Figure 2D). Animals treated with 1 plus BDZ at the concentrations of 30 and  $60 \mu\text{L L}^{-1}$  showed longer recovery times compared to animals treated with 1 and BDZ alone.

### 3.3 Reversion the depressor effects of 1 on the CNS

Fish exposed to BDZ presented significantly higher sum of recovery scores when in contact with flumazenil compared to water ( $p < 0.05$ ). However, compound 1 at both concentrations tested did not present statistical difference regarding the sum of recovery scores (Figure 3).

## 4 Discussion

Many anesthetics and alcohols have exhibited a regulatory influence on GABA<sub>A</sub> receptor activity. Natural products including terpenoid compounds have also showed effects on GABA<sub>A</sub> receptors (Johnston et al., 2006). Vale et al. (1999) verified the behavioral effects of EOs obtained from three different chemotypes of *L. alba* in mice and suggested that these products containing limonene and citral as major compounds, have similar pharmacological profiles to BDZ. According to the authors the EO might interact with BDZ receptor located adjacent to GABA receptor complex. The interaction of the EO of *L. alba* with these receptors in fish was described by Heldwein et al. (20XX) for the linalool chemotype.

Linalool (compound 1), the major constituent of the EO of *L. alba* studied here, was isolated in this work and had its anesthetic activity determined (Figure 1). EOs rich in 1 had demonstrated local anesthetic activity (Ghelardini et al., 1999). In addition, Binet (1972) and Binet et al (1972) investigated the activity of some terpene alcohols including 1 on the nervous system (in fish and mice, respectively), but the action of 1 was practically null in both tests. So, by our knowledge, no previous study demonstrated general anesthetic activity of 1 as isolated substance. The present results demonstrated that 1 is a new alternative to fish anesthesia and can be used at 180  $\mu\text{L L}^{-1}$  for anesthetic induction in silver catfish.

Additionally, just the study of Power et al (2010) and Heldwein et al (20XX) attempted to correlate the anesthetic activity with mechanism of action in the same condition of the administration in fish. Comparing the results

obtained for anesthesia induction of 1 and the EO of *L. alba* (figure 1) is visible that induction time to reach stage 2 showed no significant differences, except at  $60 \mu\text{L L}^{-1}$  1 and  $100 \mu\text{L L}^{-1}$  EO. However 1 takes a longer time to reach deep anesthesia (stage 4) than EO in all tested concentrations.

Differences between time for anesthesia induction of the EO and 1 could be explained because it is not the only active compound of the EO. However, 1 is a constituent with high sedative activity when used in low concentrations, and just have an anesthetic action when used in high concentrations. These hypotheses were confirmed by the additional results presented in this work. This fact can be confirmed in figure 1B, when at same proportional concentration, 1 did not reach any stage of anesthesia, while the EO was effective.

When BDZ was used together with 1, no potentialization of the anesthetic activity was observed (Figure 2C). The same occurred regarding the involvement of GABAergic system. The animal model used in this work was previously described by Heldwein et al. (20XX) and, accordantly, a higher sum of score corresponds to faster recovery. Compound 1 shows a similar score in both recovery baths used (water and flumazenil), and therefore does not show GABAergic activity. These results do not contradict our previous results, which were obtained for the EO of *L. alba* (Heldwein et al., 20XX). Taken together, these data suggest that one or more compounds (except 1) present in the EO have a benzodiazepine-like effect on GABA receptor complex. Thus, we hypothesized that the anesthetic effect of the EO of *L. alba* is resulting of the synergism of different components, being 1 one of the active substances and at least one constituent acts on the GABAergic system.

Regarding the mechanism of action of linalool, it has exhibited an inhibitory effect on glutamate binding (Elisabetsky et al., 1999), which is the main excitatory neurotransmitter in mammalian CNS. The literature describes the occurrence of NMDA receptor in teleost fish (Linn e Gafka, 1999; Sundin et al., 2003; Burleson, 2009), and there is a correlation of this receptor with anesthesia (Wang et al., 2009). There is also evidence that linalool suppresses voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels by non selective mode (Narusuye et al., 2005). More recently, Leal-Cardoso et al. (2010) studied the pharmacologic effects of linalool in somatic sensory neurons and demonstrated local anesthetic activity in peripheral nerves and their sensory ganglia related to modulation of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels.

Since sedation and anesthesia are mediated by distinct GABA<sub>A</sub> receptor isoforms (Reynolds et al., 2003), another possibility for the mechanism of action of linalool is the interference with  $\beta 2$  subunit of GABA<sub>A</sub>. As described by Reynolds et al. (2003), the  $\beta 2$  subunit mediates the sedative properties of anesthetics and  $\beta 3$  is only related to anesthesia. However, more studies are necessary to confirm these hypotheses and also the presence of different receptor isoforms in silver catfish.

In conclusion, our results show by the first time, the general anesthetic property of linalool isolated from the EO of *L. alba* in silver catfish. However, this effect differs from the effect detected for the EO in some anesthetic stages and demonstrated distinct mechanism of action. These findings indicate that linalool is not the only active compound responsible for anesthetic effect of this EO. More studies are necessary to identify other constituents present in the EO of *L. alba*, which potentiate the depressor effects of linalool.



## Acknowledgements

This study was supported by research funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, process 10/0016-8) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, process 470964/2009-0). B. Baldisserotto and M. E. Bürger are grateful to CNPq by research fellowships; C.G. Heldwein is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by M.Sc. fellowship. Authors thank to Gilberto D. Zanetti for the botanical identification of *L. alba*, to Bráulio Otomar Caron and Denise Schmidt for the cultivation of *L. alba* and to Ubiratan Flores da Silva for the GC-MS analysis.

## References

Adams R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation.

Barros, F.M.C., Zambarda, E.O., Heinzmann, B.M., 2009. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova*, 32 (4), 861-867.

Binet, M.P., 1972. Action de quelques alcools terpéniques sur Le système nerveux des poissons. *Annales pharmaceutiques françaises*, 30 (10), 653-658.

Binet, L., Binet, P., Miocque, M., Roux, M. Bernier, A., 1972 Recherches sur les propriétés pharmacodynamiques (action sédative et action spasmolytique) de quelques alcools terpéniques aliphatiques. *Annales pharmaceutiques françaises*, 30 (9), 611-616.

Burleson, M.L., 2009. Sensory innervation of the gills: O<sub>2</sub>-sensitive chemoreceptors and mechanoreceptors. *Acta histochemica*, 111, 196—206.

Cheng, S.-S., Chua, M.T., Chang E.-H., Huang, C.-G., Chen, W.-J., Chang, S.-T., 2009. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresource Technology*, 100 (1), 465-470.

Choochote, W., Chaithong U., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Tuetun, B., Champakaew, D., Pitasawat, B., 2007. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78 (5), 359-364.

Cunha, M.A., Barros, F.M.C., Garcia, L.O., Veeck, A.P.L., Heinzmann, B.M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B., 2010a. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306, 403-406.

Cunha, M.A., Zeppenfeld, C.C., Garcia, L.O., Loro, V.L., Fonseca, M.B., Emanuelli, T., Veeck, A.P.L., Copatti, C.E., Baldisserotto, B., 2010b. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*, ahead of print, pp. 0-0. Epub Oct 01, 2010. ISSN 0103-8478.

Dorman, H.J.D, Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), 308–316.

Elisabetsky, E., 1995. Sedative properties of linalool. *Fitoterapia*, 66 (5), 407-414.

Elisabetsky, E., Silva Brum, L.F., Souza, D.O., 1999. Anticonvulsivant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, v. 6 (2), 107-113.

European Pharmacopeia (2007) Strassbourg, European Directorate for the Quality of Medicines 6<sup>th</sup> ed.

Gonçalves, A.F.N., Santos, E.C.C., Fernandes, J.B.K., Takahashi, L.S., 2008. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum. Animal Sciences.*, 30 (3), 339-344.

Granger, R. E., Campbell, E. L., Johnston, G. A. R., 2005. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> receptors. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1101–1111.

Heldwein, C.G., Silva, L.L., Reckzieguel, P., Barros, F.M.C., Burguer, M.E., Baldisserotto, B., Malmann, C.A., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., 20XX. The involvement of gabaergic system in the anesthetic effect of the essential oil of *Lippia alba* N. E. (Mill) Brown (artigo submetido).

Johnston, G.A.R., Hanrahan, J.R., Chebib, M., Duke, R.K., Mewett, K.N., 2006. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Advances in Pharmacology*, 54, 285-316.

Leal-Cardoso, J.H., Silva-Alves, K.S., Ferreira-da-Silva, F.W., Santos-Nascimento, T., Joça, H.C., Macedo, F.H.P., Albuquerque-Neto, P.M., Magalhães, P.J.C., Lahlou, S., Cruz, J.S., Barbosa, R., 2010. Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na<sup>+</sup> current in dissociated dorsal root ganglia neurons. *European Journal of Pharmacology*, 645, 86–93.

Linn, C.L., Gafka, A.C., 1999. Activation of metabotropic glutamate receptors modulates the voltage-gated sustained calcium current in a teleost horizontal cell. *Journal of Neurophysiology*, 81 (2), 425-434.

Melo, F.H.C., Venâncio, E.T., Souza, D.P., Fonteles, M.M.F., Vasconcelos, S.M.M., Viana, G.S.B., Souza, F.C.F., 2010. Anxiolytic-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 4, 437-443.

Mohammadi, B., Haeseler, G., Leuwer, M., Dengler, R., Krampfl, K., Bufler, J., 2001. Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA<sub>A</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, v. 421 (2), 85-91.

Narusuye, K., Kawai, F., Matsuzaki, K., Miyachi, E., 2005. Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neural Transmission*, 112, 193–203.

Power, D.M., Fuentes, J., Harrison, A.P., 2010. A noninvasive monitoring device for anesthetics in fish. *Animal Physiology*, 2, 17–23.

Reynolds, D.S., 2003. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA<sub>A</sub> receptor isoforms. *The Journal of Neuroscience*, 23 (24), 8608-8617.

Schoettger, R.A., Julin, M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Investment in Fish Control, U.S. Dept. Int.*, 13, 1-15.

Sundin, L., Turesson, J., Burlison, M., 2003. Identification of central mechanisms vital for breathing in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Respir. Physiology and Neurobiology*, 138, 77–86.

Vale, T.G., Matos, F.J.A., Lima, T.C.M., Viana, G.S.B., 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, 67 (2), 127-133.

Vale, T.G., Furtado, E.C., Santos JR., J.G., Viana, G.S.B., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine*, 9, 709-714.

Viana, G.S.B., do Vale, T.G., Silva, C.M., Matos, F.J., 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 23 (11), p. 1314-1317.

Figure 1: Time required for induction and recovery from anesthesia using the essential oil of *Lippia alba* (EO) and linalool (1) in silver catfish juveniles. Stages was according to Schoettger and Julin (1967) and maximum observation time was 30 min. A: EO 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  and 1 30  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; B: EO 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  and 1 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; C: EO 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  and 1 180  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

\* significantly different from EO in the same stage ( $p < 0.05$ ).

Figure 2: Time required for induction and recovery from anesthesia using linalool (1), diazepam (BDZ) and the combination linalool + diazepam (1 + BDZ) in silver catfish juveniles. Stages according to Schoettger and Julin (1967). Maximum observation time was 30 min. A: stage 2; B: stage 3a; C: stage 4; D: recovery. Different letters indicate significant difference among diferent concentrations of 1 in the same group: 1, BDZ or 1+BDZ;

\* significantly different from group 1 tested at the same concentration ( $p < 0.05$ ).

Figure 3: Sum of the scores of the depression reversion of compound 1 (linalool) in comparison with the control (BDZ). Significant differences are demonstrated by \* ( $p < 0.05$ ).

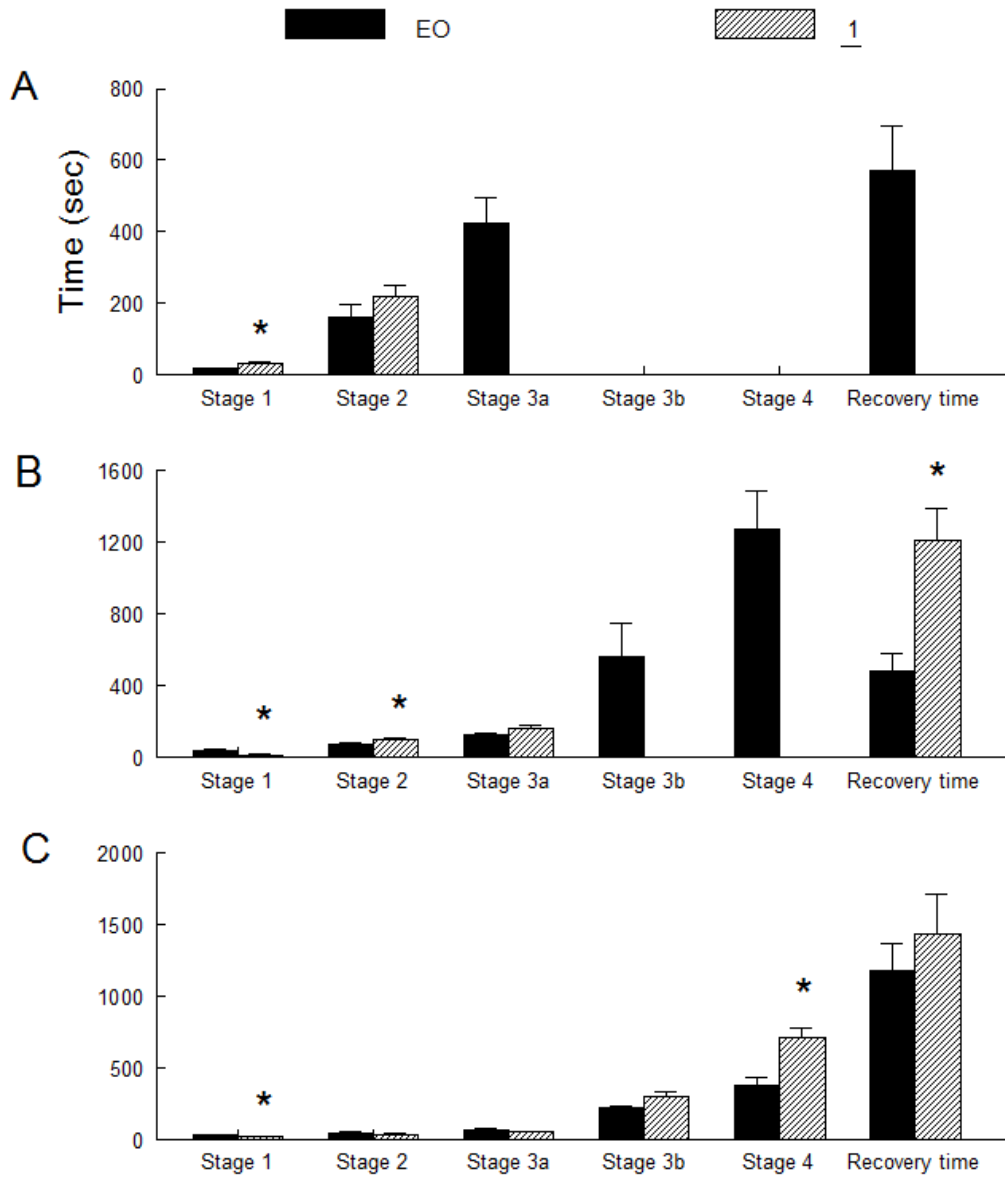


Figure 1

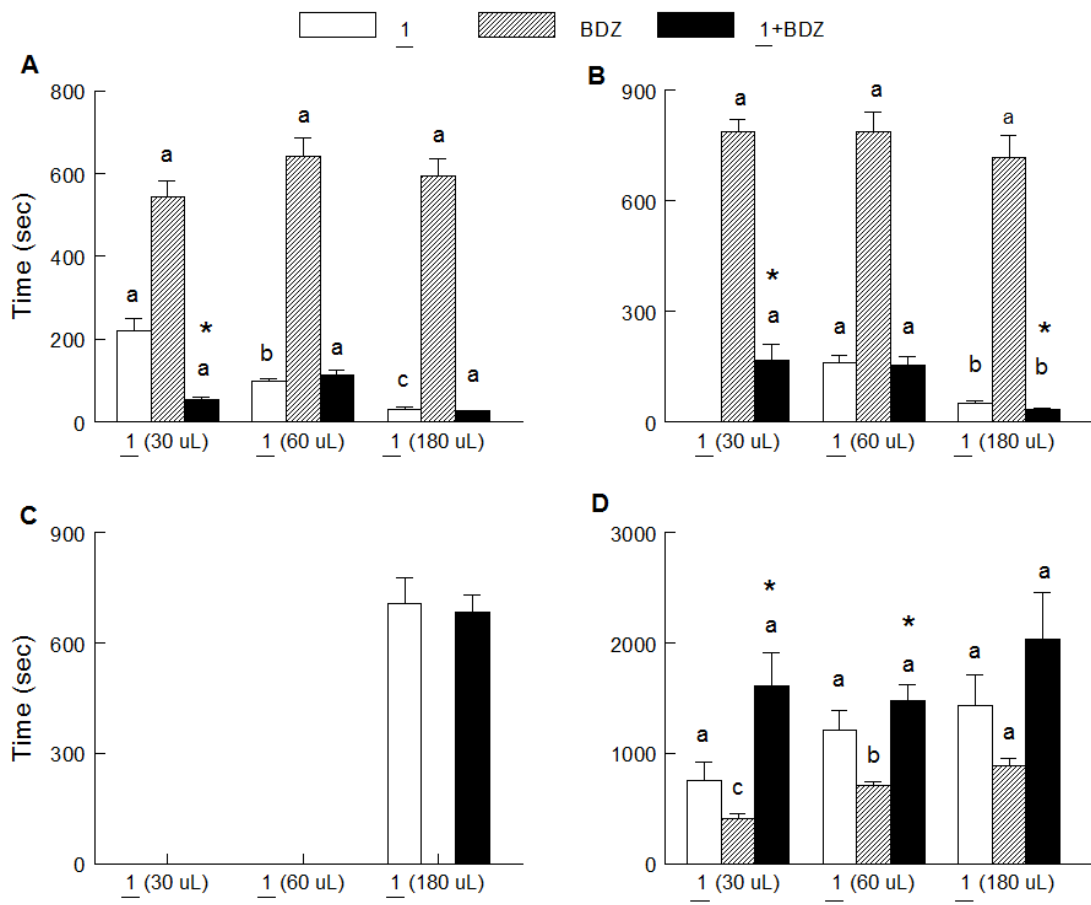


Figure 2

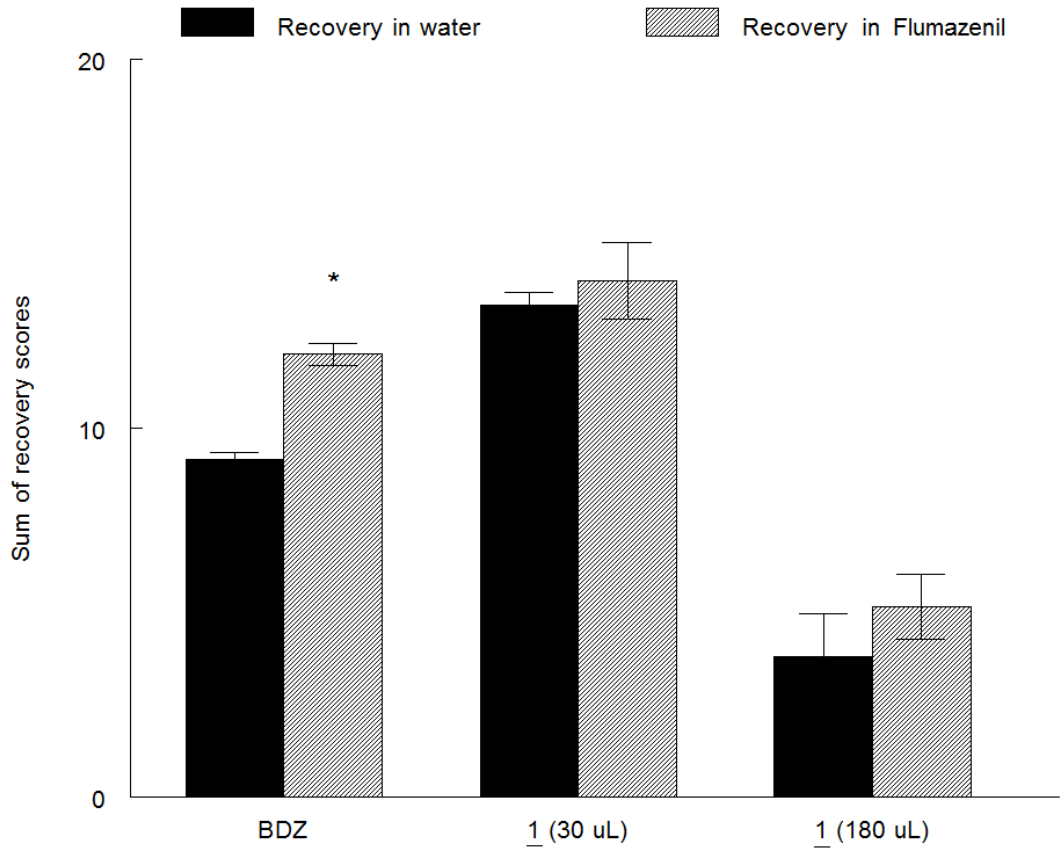


Figure 3

---



## **7 RESULTADOS ADICIONAIS**

### **7.1 Separação dos constituintes por método de cromatografia em coluna**

O monoterpênóide linalol obtido do primeiro fracionamento do OE teve um rendimento médio de 10,66 % em relação ao OE fracionado e 0,032 % em relação ao material vegetal fresco extraído. Já os rendimentos para o eucaliptol (1,8-cineol) foram de 0,44 % e 0,00132 % em relação ao OE fracionado e ao material vegetal fresco extraído, respectivamente.

### **7.2 Atividade do eucaliptol na indução de anestesia em juvenis de jundiá**

Em relação à atividade anestésica do eucaliptol, este composto não induziu nenhum estágio de anestesia nos peixes testados. Deste modo, os resultados obtidos indicaram que a substância analisada não é a responsável pelas propriedades anestésicas do óleo essencial de *L. alba*.

### **7.3 Diferentes espaçamentos no cultivo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como fatores de variabilidade quali e quantitativa do óleo essencial**

O rendimento do óleo essencial obtido para o cultivo com espaçamento 1,0 x 0,8 m manteve-se elevado durante todos os períodos de análise (0,36, 0,44% e 0,40%) em relação aos outros espaçamentos, sendo que não houve grande variação na densidade dos óleos essenciais obtidos (Quadro 1). Ainda, em relação à composição química, pode-se verificar maior porcentagem do constituinte majoritário (linalol) nos óleos essenciais obtidos do cultivo 1,0 x 0,4 m, porém, o cultivo 1,0 x 0,8 m também demonstrou conter grande quantidade deste constituinte.

Quadro 1: Dados de rendimento e densidade dos óleos essenciais de *Lippia alba* em relação aos espaçamentos utilizados no cultivo:

<b>Data da coleta</b>	<b>Espaçamento (m)</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>	<b>Densidade média</b>	<b>% de Linalol</b>
29/04/09	1,0 x 1,0	0,25	0,83	36,0
	1,0 x 0,8	0,36	0,87	46,0
	1,0 x 0,6	0,36	0,85	46,0
	1,0 x 0,4	0,30	0,83	57,0
04/11/09	1,0 x 1,0	0,24	0,85	33,0
	1,0 x 0,8	0,44	0,88	40,0
	1,0 x 0,6	0,22	0,79	45,0
	1,0 x 0,4	0,26	0,82	44,0
08/02/10	1,0 x 1,0	0,39	0,82	53,9
	1,0 x 0,8	0,40	0,83	54,0
	1,0 x 0,6	0,35	0,80	59,6
	1,0 x 0,4	0,44	0,83	59,0

## 8 DISCUSSÃO GERAL

A investigação farmacológica de produtos naturais tem aumentado muito nos últimos anos e vem contribuindo para a compreensão de muitas doenças. Segundo Gomes et al. (2009), as plantas com atividade neurobiológica são fontes potenciais para a descoberta de novos fármacos. Neste sentido, vem se destacando em especial os compostos terpenóides (PASSOS et al., 2009), que são metabólitos secundários vegetais, encontrados também em óleos essenciais (OEs). Os terpenóides são originados a partir da condensação de um número variável de unidades de isopreno (5 átomos de carbono), destacando-se a presença de monoterpenóides (10 átomos de carbono) e sesquiterpenóides (15 átomos de carbono), nos OEs (SIMÕES et al., 2003).

*L. alba* está entre as plantas medicinais citadas por Gomes et al. (2009), que apresenta atividade sedativa pelo seu alto conteúdo de flavonóides. Porém, a relação desta atividade com estes compostos de natureza polifenólica não explica a atividade sedativa do seu OE, já que o mesmo é composto de substâncias terpenóides voláteis de baixo peso molecular (VIANA et al., 2000). Ainda, no estudo de Viana et al (2000) o linalol não foi citado, uma vez que este não era um dos componentes majoritários do OE testado.

Geralmente, as espécies do gênero *Lippia* demonstram uma variabilidade química na composição dos OEs, permitindo serem classificados em diferentes quimiotipos. Os compostos encontrados com maior frequência são os monoterpenóides limoneno, linalol,  $\beta$ -mirceno, carvona, citral e cânfora (HENNEBELLE et al., 2008). O composto majoritário do OE de *L. alba* utilizado no presente trabalho é o linalol. Apesar de os ensaios realizados neste trabalho demonstrarem que este composto não é o único ativo do OE de *L. alba*, este é o primeiro trabalho a relatar a atividade anestésica geral *in vivo* do linalol.

Além de o linalol estar presente no OE de *L. alba*, no gênero *Lippia* ele está presente também no OE de *L. multiflora*, *L. aristata*, *L. carviadora*, *L. chamedrifolia*, *L. citriadora*, *L. dulcis*, *L. fissicalyx*, *L. graveolens*, *L. grisebachiana*, *L. intergrifolia*, *L. javanica*, *L. nodiflora*, *L. origanoides*, *L. turbinata* e *L. wilmsii* (CRAVEIRO et al., 1981; PASCUAL et al., 2001a). Este composto ainda pode ser encontrado na composição de óleos essenciais de outras plantas medicinais bem conhecidas como

*Croton cajucara* (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007), *Aniba rosaeodora* (SIMIÉ et al., 2004), *Origanum microphyllum* (ALIGIANNIS et al., 2001), *Rosmarinus officinalis* (GACHKAR et al., 2007), *Cymbopogon citratus* (CHISOWA et al., 1998), entre outras.

Linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) é um álcool monoterpênico acíclico muito utilizado pela indústria farmacêutica na perfumaria (US 3.951.875) e também como repelente (US 2003/0138470 A1) e pesticida (US 006130253A; US 6849614; US 6663860). Ainda, este composto apresenta atividade hipotensora (MENEZES et al., 2010), anti-inflamatória (PEANA et al., 2002) e antimicrobiana, esta última ainda controversa (BARROS, 2008), com ação também em nível central como sedativa (BINET, 1972; BINET et al., 1972; BUCHBAUER et al., 1993; SUGAWARA et al., 1998; ELISABETSKY et al., 1995; KURODA et al., 2005; LINCK et al., 2009), anticonvulsivante (FURTADO et al., 2000) e antinociceptiva (PEANA et al., 2003, 2006).

A propriedade depressora central do linalol pode ser explicada, ao menos em parte, pelo seu efeito inibitório sobre a ligação do glutamato a receptores do córtex cerebral de ratos, sendo este composto um antagonista competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (ELISABETSKY; SILVA BRUM; SOUZA, 1999; SILVA BRUM et al., 2001a,b). Esse fato, juntamente com a inibição da síntese e liberação do mediador nociceptivo e inflamatório óxido nítrico (NO), explica a sua propriedade antinociceptiva (PEANA et al., 2006). Da mesma forma, o mecanismo de modulação da ativação do glutamato, descrita para o linalol, explica a atividade anticonvulsivante do composto (ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995; ELISABETSKY; SILVA BRUM; SOUZA, 1999).

Para monoterpênóides de OEs já foi relatada atividade anestésica (GHELARDINI et al., 2001; GALEOTTI et al., 2001). Apesar de o monoterpênóide linalol não estar incluso entre eles, há algumas evidências de que o linalol possua atividade anestésica, uma vez que o óleo essencial de *Lavandula angustifolia* e de *Lippia alba*, ricos em linalol, demonstraram possuir atividade depressora central (GHELARDINI et al., 1999; CUNHA et al., 2010).

No sentido de explicar o mecanismo de ação da atividade do linalol sobre o SNC, dados da literatura discutem o possível envolvimento dos sistemas glutamatérgico, opióide e nicotínico, considerando os resultados destes sistemas em

testes neurofarmacológicos (ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995; PEANA et al., 2004a ;RE et al., 2000). Também merece destaque o envolvimento do sistema nicotínico já descrito no mecanismo de ação de outros agentes anestésicos (NEHER et al, 1978 apud RE et al., 2000).

Diversas classes de produtos de origem natural, obtidos de plantas medicinais incluindo os terpenóides, já demonstraram influência sobre a função do complexo receptor GABAérgico ionotrópico. Esses receptores medeiam e permitem uma rápida neurotransmissão inibitória através de subunidades de proteínas, quando ativadas pelo GABA. Dentre os subtipos de complexo-receptor GABA, o subtipo GABA<sub>A</sub> é o mais estudado e parece ser a chave da propriedade farmacológica de diversas classes importantes de agentes terapêuticos, incluindo benzodiazepínicos, barbitúricos e anestésicos gerais (KORPI et al., 2002; JOHNSTON et al., 2006).

A composição da subunidade do complexo receptor GABA<sub>A</sub> parece influenciar no efeito de moduladores. Por exemplo, as propriedades terapêuticas ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa e relaxante muscular, resultam da ação dos benzodiazepínicos em diferentes subtipos do complexo receptor GABA<sub>A</sub>. Nesse sentido, o trabalho de Reynolds et al. (2003) explica que o efeito sedativo de agentes anestésicos é mediado pela subunidade  $\beta 2$  do complexo receptor GABA<sub>A</sub>, enquanto  $\beta 3$  está somente relacionada ao efeito anestésico.

Agentes que aumentam a ação do GABA no complexo receptor GABA<sub>A</sub> são conhecidos como moduladores positivos GABAérgicos (de primeira ordem). Porém, existem os moduladores positivos de segunda ordem, que apenas atuam quando associados a um modulador positivo de primeira ordem específico (JOHNSTON et al., 2006). Um exemplo deste fato descrito na literatura é o flavonóide apigenina e o galato de epigallocatequina, que aumentam a ação moduladora positiva do diazepam no complexo receptor GABA<sub>A</sub> (CAMPBELL et al., 2004).

Sabe-se que os OEs são misturas de constituintes odoríferos, e muitas vezes as suas propriedades farmacológicas resultam do efeito sinérgico entre os diferentes componentes, resultando também em múltiplos mecanismos de ação (HARRIS, 2002). Sinergismo é uma forma de interação entre dois ou mais compostos, resultando na potencialização das suas ações, sendo classificado neste caso como sinergismo positivo. No entanto, o sinergismo também pode ser negativo, mais conhecido como antagonismo. Como já descrito no manuscrito 3, existe(m) um ou mais compostos presentes no OE que atua em sinergismo com o linalol e por

mecanismo distinto. Enquanto que para o OE de *L. alba* foi detectado um mecanismo tipo benzodiazepínico, o linalol age por outro mecanismo, ainda não esclarecido. Esta inferência está de acordo com os dados da literatura (CLINE et al., 2008) que demonstra que a atividade ansiolítica do linalol não ocorre por modulação do complexo receptor GABA<sub>A</sub>.

A composição do OE de *L. alba*, determinada neste trabalho (manuscrito 2), mostra a presença de algumas substâncias com atividade em receptores GABAérgicos já determinada, como o borneol. Altas concentrações (>1,5mM) de (+)- e (-)-borneol ativam diretamente receptores GABA<sub>A</sub> e, apesar de apresentar uma fraca potência, a eficácia deste composto na modulação positiva de respostas mediadas pelo GABA é equivalente ao anestésico etomidato e muito maior que a do diazepam (GRANGER et al., 2005). Esta seria uma das possíveis substâncias que poderiam apresentar atividade sinérgica com o linalol.

Outro monoterpenóide muito encontrado em OEs é o 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol por ser o constituinte majoritário (aproximadamente 80%) do óleo de uma das espécies de eucalipto de uso medicinal (*Eucalyptus globulus*). O OE de *L. alba* é uma outra fonte deste composto, no qual a substância é encontrada numa proporção aproximada de 9%, sendo o segundo composto mais abundante do OE utilizado neste estudo. Esta proporção pode variar conforme o quimiotipo analisado. O 1,8-cineol isolado do OE de *L. alba* e testado na proporção em que é encontrado no mesmo, demonstrou não possuir nem atividade sedativa e nem atividade anestésica em *Rhamdia quelen*, apesar de demonstrar atividade anestésica local em fibras do nervo ciático de sapo (ZALACHORAS et al., 2010) e outras atividades centrais como, por exemplo, propriedade analgésica (SANTOS; RAO, 2000). O resultado do teste de atividade anestésica geral para o 1,8-cineol não descarta a possibilidade desta substância agir em sinergismo com o linalol e outros compostos.

Em complementação, um monoterpenóide constituinte de diversos OEs como  $\alpha$ -pineno também apresenta atividade anestésica local descrita na literatura (ZALACHORAS et al., 2010) e encontra-se presente em pequena proporção no OE de *L. alba* (0,13%).

Muitos estudos sobre *L. alba* abordam aspectos a respeito da composição química e atividades farmacológicas, deixando a desejar em relação à determinação de constituintes bioativos. Este aspecto é de extrema importância para o controle de

qualidade do material vegetal de utilização medicinal e permite a determinação de um marcador químico da planta para uma determinada atividade farmacológica, assim como o desenvolvimento de metodologias para o doseamento de substâncias ativas nela presentes. Foi com este objetivo que este trabalho visou o isolamento dos compostos majoritários presentes no OE de *L. alba*, linalol e eucaliptol.

A análise de substâncias ativas é muito complexa e, muitas vezes, se torna longa, uma vez que os compostos minoritários são, com frequência, os que apresentam melhores propriedades biológicas. Conseqüentemente, há ainda a necessidade do isolamento de outros constituintes presentes no OE de *L. alba*, especialmente daqueles que se apresentam em pequena proporção, para identificar outros possíveis constituintes ativos ou verificar um possível sinergismo entre eles.

Ainda, no sentido de padronização de metodologia, todo e qualquer trabalho envolvendo o estudo de mecanismo de ação deve começar através de uma curva dose-resposta. Portanto, visando determinar uma nova metodologia para observar o possível envolvimento do sistema GABAérgico no mecanismo de ação de agentes anestésicos em peixes, foi realizada a padronização dos ensaios (manuscrito 2), determinando a concentração dos fármacos padrões (diazepam e flumazenil). Para a realização de ensaios de potencialização de produtos naturais com o diazepam em *R. quelen*, a concentração ideal é 150  $\mu\text{M}$  de diazepam, variando as concentrações do composto natural em estudo. Para o teste do envolvimento do sistema GABAérgico no mecanismo de ação, determinou-se 5  $\mu\text{M}$  como a concentração ideal do antagonista flumazenil.

Para um produto ser utilizado e colocado no mercado, também são necessários estudos de toxicidade. Em relação ao OE de *L. alba* e ao linalol, são poucos os estudos de toxicidade realizados até o momento (PRASHAR; LOCKE; EVANS, 2004; RAVIZZA et al., 2008; MESA-ARANGO et al., 2009; DI SOTTO et al., 2010), incluindo trabalhos sobre citotoxicidade e genotoxicidade. Para *L. alba*, este foi o primeiro relato de caso da ocorrência de dermatite de contato em humanos, em conseqüência da exposição às suas folhas frescas. Conforme relatos da literatura, até o momento, uma das prováveis explicações para a ocorrência deste efeito adverso é a oxidação do constituinte majoritário de *L. alba*, o linalol, que se transforma em óxido de linalol, causando irritação cutânea ao entrar em contato direto com a pele (SKÖLD et al., 2002, 2004).

Por fim, o cultivo de plantas medicinais é um fator de grande relevância para a qualidade da matéria-prima obtida. Apesar de *L. alba* ser uma espécie bastante pesquisada, este também foi o primeiro trabalho realizado que visou determinar a influência de diferentes espaçamentos de cultivo no teor e na composição química do OE. Conforme os dados obtidos e descritos no item resultados adicionais, o cultivo de *L. alba* com espaçamento de 1 x 0,8 m proporciona um aumento do rendimento de OE, quando comparado aos demais cultivos, assim como uma grande proporção do constituinte majoritário (linalol), sendo este o espaçamento de escolha para a obtenção do material vegetal de qualidade para posteriores estudos.



## 9 CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que:

- O constituinte ativo majoritário do óleo essencial de *L. alba* com propriedade sedativa e anestésica é o linalol.
- O óleo essencial de *L. alba* interage com receptores GABA<sub>A</sub>, possuindo mecanismo tipo benzodiazepínico.
- O mecanismo de ação do linalol não está relacionado ao sistema GABAérgico via sítio benzodiazepínico.
- Um ou mais compostos presente(s) no óleo essencial atua(m) em sinergismo com o linalol e por mecanismo(s) distinto(s) deste.
- O 1,8-cineol não apresenta ação anestésica quando isolado do óleo essencial de *L. alba*.
- Para a otimização do aumento do rendimento do óleo essencial e de linalol nele presente, o espaçamento entre plantas mais adequado para o cultivo de *L. alba* é de 1,0 x 0,8 m.
- *L. alba* pode causar irritação cutânea por contato ocupacional.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p. 79-84, 2005.

AGUIAR, J.S. **Atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**. 2006. 81p. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-1050, 2007.

ALIGIANNIE, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, F.G. et al. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 819-821, 2006.

BARROS, F.M.C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**. 2008. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BARROS, F.M.C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BEZERRA, P. et al. Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas no nordeste- gênero *Lippia*. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 33. p. 1-14, 1980.

BINET, M.P. Action de quelques alcools terpéniques sur Le système nerveux des poissons. **Annales pharmaceutiques françaises**, v. 30, n. 10, p. 653-658, 1972.

BINET, L. et al. Recherches sur les propriétés pharmacodynamiques (action sedative et action spasmolytique) de quelques alcools terpéniques aliphatiques. **Annales pharmaceutiques françaises**, v. 30, n. 9, p. 611-616, 1972.

BRASILEIRO, B.G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.

BREHM-STECHER, B.F; JOHNSON, E.A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apritone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

BUCHBAUER, G. et al. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 660-664, 1993.

CAMPBELL, E.L. et al. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1631-1638, 2004.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 264-269, 1995.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos estruturais para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHISOWA, E.H. et al. Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 1, p. 29-30, 1998.

CLINE, M. et al. Investigation of the anxiolytic effects of linalool, a lavender extract, in the male Sprague-Dawley rat. **American Association of Nurse Anesthetists Journal**, v. 76, n. 1, p. 47-52, 2008.

CRAGG, G.M. et al. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAVEIRO, A.A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 598-601, 1981.

CUNHA, M.A. **Anestesia de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CUNHA, M.A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

DEL POZO, M.D. et al. Allergic contact dermatitis from *Verbena officinalis* L. **Contact Dermatitis**, v. 31, n. 3, p. 200-201, 1994.

DI-SOTTO, A. et al. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. **Environmental and molecular mutagenesis**, 00:000-000, 2010. DOI 10.1002/em.

DUARTE, M.C.T. et al. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p. 139-143, 2007.

ECOSMART TECHNOLOGIES. Bessette, Steven M. **Synergistic and residual pesticidal compositions containing plant essential oils**. Inst. A01 N 65/00. US n. 6849614 B1, 28 Jul 1999, 01 Fev 2005.

ELISABETSKY, E. et al. Sedative properties of linalool. **Fitoterapia**, v. 66, n. 5, p. 407-414, 1995.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D.O. Effects of linalool in glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 20, p. 461-5, 1995.

ELISABETSKY, E.; SILVA BRUM, L.F.; SOUZA, D.O. Anticonvulsivant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, v. 6, n. 2, p. 107-113, 1999.

FAÇANHA, M.F.; GOMES, L.C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

FARIAS, M.R. et al. Triterpenoid saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 927-933, 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira – 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FURTADO, E.C. et al. Efeito anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, variedade limoneno-citralífera. **Pesquisa Médica de Fortaleza**, v. 3, n. 1-4, p. 28-37, 2000.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GALEOTTI, N. et al. Local anaesthetic activity of (+)- and (-)- menthol. **Planta Medica**, v. 67, p. 174-176, 2001.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v.50, p. 477-480, 2004.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 700-703, 1999.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Medica**, v. 67, p. 564-566, 2001.

GOMES, E. C. **Ensaio preliminares e macha sistemática e fitoquímica para *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. Verbenaceae**. Curitiba: UFPR, 1990. 6 p.

GOMES, E.C.G. et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 2, p. 29-32, 1993.

GOMES, N.G.M, et al. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Progress in Neuro-Psichopharmacology and Biology Psychiatry**, v. 33, p. 1372-1389, 2009.

GONÇALVES, A.F.N. et al. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GORDON, L.A. Compositae dermatitis. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 123–130, 1999.

GRANGER, R. E. et al. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1101–1111, 2005.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. **The international Journal of aromatherapy**, v. 12, n. 4, p. 179-186, 2002.

HEINZMANN, B.M., BARROS, F.M.C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista do Centro de Ciências da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

HEMAISWARYA, S. et al. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

JOHNSTON, G.A.R. et al. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. **Advances in Pharmacology**, v. 54, p. 285-316, 2006.

KOO, B.S. et al. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 978-982, 2003.

KORPI, E.R., GRUNDER, G., LUDDENS, H. Drugs interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, 113-159, 2002.

KURODA, K. et al. Sedative effects of the jasmine tea odor and (R )-(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states. **European Journal Appl Physiology**, v. 95, p. 107–114, 2005.

LINCK, V.M. et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 303–307, 2009.

MATOS, F.J.A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal Essential Oil Research**, v. 8, n. 6, p. 695-698, 1996.

MATOS, F.J.A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae). Parte II - Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 77, n. 4, p. 137-141, 1996.

MENEZES, I.A. et al. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. [Z Naturforsch C](#), v. 65, n. 9-10, p.562-6, 2010.

MESA-ARANGO, A.C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MITCHELL, J.C.; DUPUIS, G. Allergic contact dermatitis from sesquiterpenoids of the Compositae family of plants. **British Journal of Dermatology**, v. 84, n. 2, p. 139-150, 1971.

MOREIRA, R.C.T. et al. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 205-211, 2002.

NEWMAN, D.J. et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, A.C. **Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas in natura**. 2000. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

OLIVEIRA, R.A.G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

PASSOS, C.S. et al. Terpenóides com atividade sobre o sistema nervoso central (SNC). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.

PANSERA, M.R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PASCUAL, M.E. et al. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001a.

PASCUAL, M.E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Il Fármaco**, v. 56, p. 501- 504, 2001b.

PEANA, A. T. et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, p. 721-726, 2002.

PEANA, A.T. et al. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, p. 37-41, 2003.

PEANA, A.T. et al. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. **European Journal of Pharmacology**, v. 485, p. 165-174, 2004.

PEANA, A.T. et al. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, p. 719-723, 2006.

PÉRTILE, R. **Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.** 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POTTER, P.C. et al. Immediate and delayed contact hypersensitivity to Verbena plants. **Contact Dermatitis**, v. 33, n. 5, pages 343–346, 1995.

PRASHAR, A.; LUCKE, I.C.; EVANS, C.S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 37, p. 221-229, 2004.



RAVIZZA, R. et al. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 20, p. 625-630, 2008.

RAO, G.P. et al. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill). **Indian Journal of Chemical Technology**, v.7, n.6, p.332-5, 2000.

RE, L. et al. Linalool modifies the nicotinic receptor–ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 2, p. 177-181, 2000.

REYNOLDS, D.S. et al. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA<sub>A</sub> receptor isoforms. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 24, p. 8608-8617, 2003.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for fish**. Institute of aquaculture, University of Stirling. Stirling, Scotland, 1984. 35p.

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240–244, 2000.

SCHMITZ, F.J et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 807-810, 1998.

SCHOETTGER, R.A.; JULIN, M. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. **Investment in Fish Control**, U.S. Dept. Int. 13, p. 1-15, 1967.

SENA FILHO, J.G. **Iridóides glicosilados das raízes de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): Obtenção, caracterização e bioatividade**. 2007. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

SHIMIZU, M. et al. Marked potentiation of activity of  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3198-3201, 2001.

SHIOTA, S. et al. Mechanisms of action of corilagin and tellimagrandin I that remarkably potentiate the activity of  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 1 p. 67-73, 2004.

SHISOWA, E.H. et al. Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 1, p. 29-30, 1998.

SILVA BRUM, L. F.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D. Effects of linalool on [3H] MK801 and [3H] muscimol binding in mouse cortical membranes. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 422-425, 2001a.

SILVA BRUM, L. F. et al. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochemical Research**, v. 26, p. 191-194, 2001b.

SIMIÉ, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 713-717, 2004.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SIMÕES, L.N.; GOMES, L.C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.

SKÖLD, M. et al. Studies on the autoxidation and sensitizing capacity of the fragrance chemical linalool, identifying a linalool hydroperoxide. **Contact Dermatitis**, v. 46, p. 267-272, 2002.

SKÖLD, M. et al. Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 1697-1705, 2004.

SMITH, E. et al. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 6, p. 538-542, 2005.

SOUSA, S.M. **Bandeamento cromossômico em *Lippia alba***. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography – a laboratory handbook**. 2ª ed (1969). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.

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

STERMITZ, F.R. et al. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1433-1437, 2000.

SUGAWARA, Y. et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, p. 293-299, 1998.

TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION. Kazutoshi Sakurai; Masataka Miyasaka; Yasutaka Mishima. **Fragrant composition having mosquito-repelling effect**. Inst. A01 N 25/00. US n. 2003/0138470 A1. 29 oct. 2002, 24 julho 2003.

TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TEGOS, G. et al. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3133-3141, 2002.

TVEDTEN, STEPHEN L. **Biological pesticide**. Inst. A61 K38/48. US n. 6663860 B1, 20 Aug 1999, 16 Dez 2003.

UNITED STATES PATENT. Auger, B. et al. **Perfume compositions**. Inst. A61 K 2/46. US n. 3.951.875, 20 dez. 1974, 20 abril 1976.

UNITED STATES PATENTS. Franklin, L.U. et al. **Terpene based pesticide treatments for killing terrestrial arthropods including, amongst others, lice, lice**

**eggs, mites and ants.** Inst. A01 N 27/00. US n. 006130253A, 23 aug 1999, 10 outubro 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Heinzmann, B.M. et al. **Composições para anestésiar peixes e método de anestesia de peixes.** Inst. A61 P 23/00. PI n.0706182-0 A2, 09 nov 2007.

VALE, T.G. **Estudo farmacológico comparativo de óleos essenciais de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.** 1999. 150p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Ceará.

VALE, T.G. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.167, p. 127-133, 1999.

VALE, T.G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709-714, 2002.

VIANA, G.S.B. et al. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1314-1317, 2000.

VIDAL, L.V.O. et al. Eugenol como anestésico para tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

ZÉTOLA, M. et al. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian *false Melissa*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207-215, 2002.

ZALACHORAS, I. et al. Assessing the local anesthetic effect of five essential oil constituents. **Planta Medica**, v. 76, n.15, p. 1647-1653, 2010.

ZHAO, W.H. et al. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2266-2268, 2002.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A – Trabalho apresentado em simpósio**

Eduarda Z. Gai, Clarissa G. Heldwein, Mariane G. Perin, Thaylise V. Parodi, Bernardo Baldisserotto, Berta M. Heinzmann. Avaliação da atividade do eucaliptol na indução de anestesia em juvenis de jundiá.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EUCALIPTOL NA INDUÇÃO DE ANESTESIA EM JUVENIS DE JUNDIÁ

Eduarda Z. Gai<sup>1</sup>, Clarissa G. Heldwein<sup>1</sup>, Mariane G. Perin<sup>1</sup>, Thaylise V. Parodi<sup>2</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>2</sup>, Berta M. Heinzmann<sup>1</sup>

1. Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, UFSM.
2. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM. e-mail: [cissag.hw@gmail.br](mailto:cissag.hw@gmail.br)

### Resumo:

Eucaliptol ou 1,8-cineol é um monoterpenóide muito encontrado em óleos essenciais. O óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), que é utilizado principalmente por apresentar propriedades antimicrobianas, antisépticas e expectorantes, possui alto teor deste composto (aproximadamente 80%). Outros óleos essenciais também são fontes de eucaliptol, tal como o óleo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertencente a família Verbenaceae, no qual esta substância é encontrada numa proporção aproximada de 9%, variando conforme o quimiotipo analisado. Uma vez que a atividade anestésica do óleo de *L. alba* em jundiás juvenis foi comprovada, o objetivo do trabalho foi verificar o possível envolvimento do eucaliptol, previamente isolado do óleo essencial das folhas frescas de *L. alba*, na indução anestésica observada para o óleo. Nos ensaios foram utilizados jundiás juvenis (*Rhamdia quelen*), com peso médio e tamanho de  $9,25 \pm 1,15$ . Os peixes (n=10) ficaram em jejum por um período de 24 horas e foram transferidos para um aquário de 1L contendo a substância isolada (17mg/L) solubilizada em etanol, para avaliar o tempo de indução ao estágio 4 de anestesia segundo Schoettger e Julin (1967). Após a indução, foi avaliado o tempo para recuperação. O teste foi realizado em triplicata e como controle foi utilizado o etanol na mesma concentração daquela utilizada para solubilizar o composto. O eucaliptol não induziu nenhum estágio de anestesia nos peixes. Deste modo, os resultados obtidos indicam que a substância analisada não é a responsável pelas propriedades anestésicas do óleo essencial de *L. alba*. Os trabalhos visando o isolamento dos componentes do óleo estão em andamento, a fim de caracterizar farmacologicamente o(s) composto(s) ativo(s) desta planta medicinal bastante promissora como anestésica.

Palavras-Chave: *Rhamdia quelen*, eucaliptol, 1,8-cineol, atividade anestésica, *Lippia alba*.