

FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI

.....

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO
BRUTO E FRAÇÕES DE *Qualea grandiflora* Mart.
(Vochysiaceae)**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi.

Campinas, 17 de agosto de 2004.


Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno
- Orientador -

.....

CAMPINAS

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO
BRUTO E FRAÇÕES DE *Qualea grandiflora* Mart.
(Vochysiaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em
Ciências na Área de Farmacologia.

Orientador

Prof. Dr. Ronilson A. Moreno

CAMPINAS

2004

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	G214a
V	EX
TOMBO BC	60672
PROC.	6.117-04
C	☐
D	☒
PREÇO	22.000
DATA	17-11-04
Nº CPD	

B.b 2d 330744

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G214a

Gaspi, Fernanda Oliveira de Gaspari de
Avaliação farmacológica do extrato bruto e frações de *Qualea grandiflora* Mart. (*Vochysiaceae*) / Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Ronilson Agnaldo Moreno
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anticonvulsivantes. 2. Plantas medicinais. I. Ronilson Agnaldo Moreno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Ronilson A. Moreno

Membros:

Prof. Dr. Ronilson A. Moreno

Prof. Dr. José Antonio Mendes

Prof. Dr. Edson Antunes

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/08/2004

Dedico a:

Renato Henrique de Gaspi e Renato de Gaspi, meus amados filho e marido, pela paciência e compreensão, muitas vezes cedendo do nosso tempo juntos, para que eu pudesse realizar este trabalho. E, também ao meu querido filhinho que está a caminho.

Aos meus pais Antonio Alcides de Gaspari e Célia Oliveira de Gaspari e à minha avó Albina Ripp de Oliveira, que cuidaram com muito amor do meu filho, permitindo assim o meu crescimento profissional.

.....

Agradeço ao Dr. Ronilson A. Moreno pelo importante e decisivo apoio no momento exato, estando sempre presente e dando o auxílio necessário para a execução deste trabalho.

Guardarei sempre em meu coração a amizade e o carinho que me ofereceu, e em minha mente todo o aprendizado conquistado na convivência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fortalecer e me encorajar nos momentos difíceis e críticos, através das pessoas certas que colocou em meu caminho e por permitir a execução deste trabalho.

Ao Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Mary Ann Foglio por me receberem no CPQBA-UNICAMP, disponibilizando seus laboratórios e recursos para o desenvolvimento prático deste trabalho e pelo aprendizado adquirido na convivência, com certeza a vossa colaboração foi imprescindível.

Aos professores Dr. Ismar Rodrigues e Dra. Miriam de Magalhães Oliveira Levada pelo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. José Antonio Mendes pelos preciosos conselhos, sempre dados com carinho que muitas vezes me ajudaram a continuar trilhando este caminho e pelo exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Antonio Amarante pela grande colaboração nos testes estatísticos realizados, que muito valorizaram este trabalho.

.....

Ao Vanderley C. Claro secretário do Curso de Pós Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela colaboração e atenção.

Aos meus irmãos Luís Roberto Oliveira de Gaspari e Daniel Oliveira de Gaspari que mesmo sem perceberem me ajudaram por existirem em minha vida.

Ao grande amigo Walter Oliveira Alves pela presença constante, por me ouvir e aconselhar com muito carinho e paciência.

Aos camundongos que mesmo contra a vontade cederam suas vidas a este trabalho.

.....

Nas águas revoltas do mar tanta vez agressivo da atualidade, navegamos...

Dias calmos, dias tempestuosos.

O que importa é a rota segura.

E desta nos louvamos todos, à frente do Divino Timoneiro.

As dificuldades são os degraus de ascensão.

Cultivemos serenidade e confiança.

Observai tudo e selecionai os ingredientes que vos pareçam necessários ao bem geral. Nem segregação sistemática na cultura acadêmica, nem reclusão absoluta nas afirmativas do sentimento.

DR. BEZERRA DE MENEZES (1831-1900)

SUMÁRIO

Resumo	18
Abstract	21
Introdução	23
Objetivos	30
Revisão da Literatura	31
Materiais e Métodos	37
1) Coleta do material vegetal	37
2) Preparação do material vegetal	39
3) Processamento Fitoquímico	39
3.1) Obtenção do extrato bruto de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	39
3.2) Obtenção das frações de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	41
3.3) Análise por cromatografia em camada delgada	43
3.4) Purificação das frações obtidas do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	44
4) Testes de Atividade Farmacológica	47
4.1) Animais	47
4.2) Preparação das Drogas	47
4.3) Teste de efeitos gerais – Triagem Farmacológica	48
4.4) Potenciação do sono induzido por barbitúrico	48

4.5) Teste de algesia induzida pelo calor	49
4.6) Rotarod - Teste da barra giratória	50
4.7) Atividade Anticonvulsivante	51
4.7.1) Teste do Pentilenotetrazol	51
4.7.2) Teste da Pilocarpina	52
4.8) Toxicidade aguda	53
5) Análise estatística	54
5.1) Determinação da dose letal 50%	54
Resultados	56
1) Processamento Fitoquímico	56
1.1) Rendimento do extrato bruto e frações obtidas das folhas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	57
1.2) Cromatografia de camada delgada do extrato bruto e frações de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	57
2) Testes de Atividade Farmacológica	60
2.1) Teste de efeitos gerais – Triagem Farmacológica	60
2.2) Potenciação do sono induzido por barbitúrico	64
2.3) Teste de algesia induzida pelo calor	66
2.4) Teste da barra giratória (Rotarod)	68

2.5) Atividade Anticonvulsivante	69
2.5.1) Teste do Pentilenotetrazol	69
2.5.2) Teste da Pilocarpina	78
2.6) Determinação da dose letal 50%	81
Discussão	82
Conclusões	86
Referências Bibliográficas	87

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD – Cromatografia de camada delgada

DL₅₀ – Dose letal 50

DP – Desvio padrão

EB – Extrato bruto

FA – Fração aquosa

FE – Fração éter etílico

FH – Fração hexano

GABA – Ácido gama-amino-n-butírico

i.p. – Intraperitoneal

L. – Carl Von Linnè

Mart. – Karl Friedrich Philipp von Martius

mins. - Minutos

PTZ – Pentilenotetrazol

R - Rendimento

SAS – Statistical Analysis System

segs. - Segundos

SNC – Sistema Nervoso Central

sp. – Espécie

spp. - Espécies

UV – Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeitos do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste triagem farmacológica	61
TABELA 2: Efeitos das frações FE e FH obtidas a partir do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste triagem farmacológica	63
TABELA 3: Efeito do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste potenciação do tempo de sono induzido por barbitúrico	64
TABELA 4: Efeito do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste algesia induzida pelo calor	66
TABELA 5: Efeito das frações FH e FE obtidas a partir do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste da barra giratória (ROTAROD)	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplar de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	38
FIGURA 2: Detalhe das flores e das folhas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	38
FIGURA 3: Detalhe do fruto de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	38
FIGURA 4: Fluxograma de obtenção do EB e Frações de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	42
FIGURA 5: Fluxograma de obtenção das frações purificadas a partir das frações FH e FE de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	46
FIGURA 6: Cromatografia de camada delgada do EB obtido a partir das folhas secas e moídas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	58
FIGURA 7: Cromatografia de camada delgada das Frações obtidas a partir do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	58

FIGURA 8: Cromatografia de camada delgada das Frações purificadas da FE de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	59
FIGURA 9: Cromatografia de camada delgada das Frações purificadas da FH de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	59
FIGURA 10: Efeito do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste potenciação do tempo de sono barbitúrico	65
FIGURA 11: Efeito do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste de algesia induzida pelo calor	67
FIGURA 12: Efeito do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo de latência	70
FIGURA 13: Efeito do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo para morte	71
FIGURA 14: Efeito das frações FH e FE obtidas a partir do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo de latência	72

FIGURA 15: Efeito das frações FH e FE obtidas a partir do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo para morte	73
FIGURA 16: Efeito das frações 2FH, 6FH e 10FH obtidas da purificação da fração FH no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo de latência	74
FIGURA 17: Efeito das frações 2FH, 6FH e 10FH obtidas da purificação da fração FH no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo para morte	75
FIGURA 18: Efeito das frações FCL, 1FE, 2FE, 3FE, 4FE obtidas da purificação da fração FE no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo de latência	76
FIGURA 19: Efeito das frações FCL, 1FE, 2FE, 3FE, 4FE obtidas da purificação da fração FE no teste da convulsão induzida pelo PTZ - tempo para morte	77
FIGURA 20: Efeito do EB e das frações FH e FE obtidas a partir do EB de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. no teste da convulsão induzida pela pilocarpina – tempo de latência	79

FIGURA 21: Efeito do EB e das frações FH e FE obtidas a partir do EB de <i>Qualea</i> <i>grandiflora</i> Mart. no teste da convulsão induzida pela pilocarpina – tempo para morte	80
---	----

RESUMO

A espécie *Qualea grandiflora* Mart. é amplamente encontrada pelo cerrado brasileiro, sendo considerada um símbolo desta região. A população local utiliza as suas folhas para combater diarreias com sangue, cólicas intestinais e amebas, mas não há estudos relacionados, e pouco se sabe sobre esta importante espécie.

O estudo investigou as atividades farmacológicas do extrato bruto hidroalcoólico (EB) e das frações obtidas das folhas da espécie empregando diferentes modelos experimentais em camundongos.

.....

Os animais tratados com o EB (500mg/Kg, i.p.) apresentaram: diminuição das respostas ao toque, ao aperto de cauda e do reflexo auricular, indicando atividade depressora do Sistema Nervoso Central, que também foi observada pelo aumento do tempo de sono barbitúrico; aumento significativo do tempo de permanência do animal na placa quente indicando que possui um potencial analgésico; aumento do tempo de latência para a primeira convulsão clônica, aumento do tempo para a morte e diminuição da severidade e do número das convulsões induzidas pelo PTZ. Todavia, o EB, nas doses de 500 e 1000mg/Kg, não antagonizou as convulsões induzidas pela pilocarpina.

A dose letal 50% (DL₅₀) do EB foi de 1.321mg/Kg, sendo que 1500mg/Kg produziu morte de todos os animais tratados.

As frações obtidas a partir do extrato bruto, denominadas fração éter (FE) e fração hexano (FH) não causaram distúrbio na coordenação motora dos animais na dose de 500mg/Kg, via i.p. . E, no teste da convulsão induzida pelo PTZ, a FE (300mg/Kg, via i.p.) foi mais ativa no aumento do tempo de latência para a convulsão e a FH (300mg/Kg, via i.p.) no aumento do tempo para morte e/ou evitar a morte.

A purificação da FE resultou em 5 novas frações, a fração denominada 2FE apresentou-se mais ativa na convulsão. A partir da purificação da FH obteve-se 3 novas frações, a chamada 2FH mostrou-se mais ativa na morte.

.....

Os resultados demonstraram que o extrato e as frações das folhas de *Qualea grandiflora* Mart. possuem atividades depressora do sistema nervoso central e analgésicas, apesar de não provocarem incoordenação motora na dose que apresentam estas atividades, além de possuírem um potencial anticonvulsivante.

Palavras-chave: *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), anticonvulsivantes, plantas medicinais.

ABSTRACT

This study investigates pharmacological activities of crude hydroalcoholic extract (EB) and fractions of *Qualea grandiflora* Mart., an important Brazilian Cerrado plant species, employing different experimental models in mice. The treatment with EB (500mg/Kg, ip) caused: signs of central nervous system depressant action in the hippocampal screening test which was confirmed in a potentiation of sodium pentobarbital sleeping time test by the

.....

increase in the sleep time; increased the latency time of permanence in hot plate that indicated analgesic effect; significantly delayed the onset of clonic PTZ convulsions and increased the time for death, suppressed tonic PTZ convulsion, beyond decreased the severity and the number of convulsions. The median lethal dose of EB is 1.321mg/Kg, whereas 1500mg/Kg produced death in all animals. The fractions those were obtained from EB, the ethyl ether fraction and hexane fraction, don't caused disturbance in motor coordination at the dose of 500mg/Kg, i.p., assessed by rotarod test. In the convulsions induced by PTZ, the ethyl ether fraction (300mg/Kg, i.p.) was the most active in the increase of the latency time for first convulsion and decrease of the severity and the number of convulsions, and the hexane fraction (300mg/Kg, i.p.) was the most active in the increase of the time for death and/or avoided the death. The fractions that resulted of the hexane fraction purification, the 2FH, was the most active in death and the fractions that resulted of the ethyl ether fraction purification, the 2FE, was the most active in delayed convulsions. However, the EB and fractions, at the doses of 500 e 1000mg/Kg, don't had activity in the convulsions induced by pilocarpine.

These results suggest that the extract of leaves of *Qualea grandiflora* Mart. has a central nervous system depressant action; an analgesic and anticonvulsant activities. Further studies are needed before any precise conclusions.

Key words: *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), anticonvulsants, medicinal plant.

.....

INTRODUÇÃO

A necessidade desempenhou ao longo da história a força motriz que impulsionou a humanidade à implementação de mudanças e de transformações. A dor fez com que o homem buscasse o analgésico; a doença desencadeou a busca do remédio, e a cura muitas vezes somente foi encontrada na natureza, na riqueza da flora medicinal, amplamente explorada pelo homem através do tempo. Portanto, é fácil inferir que o uso de plantas no combate às doenças seja tão antigo quanto a própria humanidade (OLIVEIRA e AKISUE, 1998).

.....

Até o século XIX, os medicamentos disponíveis eram quase que exclusivamente formulados à base de plantas medicinais. De início, o descobrimento das propriedades terapêuticas dos vegetais era meramente intuitiva ou, às vezes, pela observação dos animais, que buscavam nas ervas o alívio para suas afecções. Recentemente, foi que as plantas medicinais passaram a ser estudadas de forma criteriosa e sistemática, do ponto de vista científico com a finalidade de comprovar as suas ações farmacológicas, bem como, ter conhecimento dos efeitos indesejáveis (ALMEIDA et al., 2003).

Não se pode ignorar o valor dos conhecimentos passados de geração a geração sobre a flora medicinal, que resultam de larga experiência humana, de resultados excelentes em inúmeros problemas da saúde, dela nasceu o que hoje consideramos científico, acadêmico, principalmente nos dias de hoje, quando os laboratórios extraem dos vegetais incontáveis substâncias de ação rápida e eficaz.

Embora os produtos sintéticos desempenhem papel importante na terapêutica moderna, a síntese de algumas substâncias ainda não foi conseguida, fazendo com que elas continuem sendo obtidas de vegetais, o que aliado ao preço elevado da síntese de uma gama de substâncias, dificultam o acesso de grande parte da população a esses medicamentos, gerando problemas de saúde pública.

.....

Dessa forma o uso das substâncias medicamentosas naturais têm aumentado, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, a globalização tem levado a trocas interculturais e a difusão do uso de técnicas e produtos terapêuticos naturais. Este fenômeno requer particular atenção para evitar uso inapropriado e mal-entendimentos que poderiam ser prejudiciais aos indivíduos (WHO, 2004).

A partir desta consciência, as principais indústrias farmacêuticas estão investindo cada vez mais na pesquisa envolvendo as plantas medicinais, pois sabem que grande parte dos medicamentos existentes no mercado, originaram-se de produtos naturais, em especial de plantas, ou então estas fazem parte em algum momento da história farmacológica dessas drogas (FERREIRA, 2002), juntamente com o fato de que certas plantas são as melhores fontes de componentes para novos medicamentos ou talvez pudessem servir-lhes de protótipo (ROBBERS, 1997).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) têm divulgado a importância do uso de plantas medicinais como recurso terapêutico viável, e segundo dados desta mesma organização, cerca de 25% dos medicamentos utilizados na medicina moderna foram descobertos a partir de plantas usadas tradicionalmente pela população. Por outro lado, devido a muitos problemas de saúde ocasionados pelo uso incorreto de plantas medicinais, a OMS adota uma estratégia global para regulamentação dos medicamentos de uso popular tornando-os mais seguros e mais acessíveis à população (WHO, 2002).

.....

.....

Uma destas estratégias é a disponibilização de um guia de informações para o uso apropriado da medicina alternativa, que contribuirá para a proteção da saúde do paciente e seu bem-estar, fornecendo as informações necessárias para o uso correto e seguro das plantas (WHO, 2004).

Tudo isto torna a confirmar a necessidade e a importância da pesquisa para a comprovação das atividades farmacológicas das plantas medicinais utilizadas popularmente ou para a descoberta das suas propriedades curativas e toxicológicas. Neste sentido, o Brasil, com sua enorme biodiversidade, apresenta-se com um grande potencial para pesquisa e exploração na área de plantas medicinais (ALVES et al., 2000), podendo contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas (FERREIRA, 2002).

Por sua ampla extensão territorial e biodiversidade florística, o cerrado é uma das regiões que muito tem contribuído no fornecimento de plantas com grande potencial terapêutico. Segundo bioma brasileiro, ocupando 22% do país, é descrito por DINIZ e MORAIS (1997), como um tipo de savana consistindo de um mosaico de formações vegetais, sabe-se, hoje, que em geral o cerrado não é condicionado pela escassez de água, mas pela pobreza dos solos onde se encontra (FERRI, 1969; SIQUEIRA e PETERSON, 2003).

.....

.....

O cerrado tem uma fisionomia peculiar: sobre um tapete em que predominam as gramíneas e que reveste o solo de maneira mais ou menos completa, desenvolvem-se árvores e arbustos, ora isolados, ora em grupos, geralmente tortuosos, de cascas espessas com freqüentes sinais de queima, de folhas grandes, simples ou divididas, coriáceas, brilhantes ou revestidas de numerosos pêlos (FERRI, 1969; CORRÊA, 1926-1978). Possui uma riqueza de espécies de plantas, muitas das quais são usadas como medicamentos naturais para o tratamento de diversas doenças (ALVES et al., 2000).

A árvore *Qualea grandiflora* Mart., é considerada um símbolo do cerrado brasileiro (SILVA et al., 2002) pela sua ampla distribuição nesta região (MENDES, 1996), sendo conhecida popularmente como pau-terra-de-folha-larga, pau-terra-do-campo ou pau-terra-do-cerrado, é geralmente encontrada em terrenos altos, secos e bem drenados, ocorrendo tanto em formações primárias como secundárias e, geralmente em alta freqüência de indivíduos.

Pertencente à família Vochysiaceae, pode atingir de 7 a 12m de altura, com tronco de 30-40cm de diâmetro. Em termos de morfologia externa caracteriza-se por apresentar folhas simples, de disposição alterna, com estípulas pequenas ou não, rígidas, tormentosas na página inferior, de 10-14cm de comprimento. As flores são grandes e vistosas, amarelas ou

.....

.....

branco - amareladas, fortemente zigomorfas, cíclicas, diclamídeas, hermafroditas, com uma ou cinco pétalas. Possui pétala externa com uma grande espora. Androceu formado por um único e grande estame. Ovário súpero tricarpetal, trilocular, com vários óvulos. Seus frutos são secos, capsular loculicida, com sementes unilateralmente aladas (JOLY, 1998; FERRI, 1969).

Segundo CORREA (1981) esta e outras espécies do gênero *Qualea* fornecem madeira para canoas e carpintaria, suas cascas e seus frutos possuem taninos e fornecem matéria tintorial, especificamente a *Qualea grandiflora* Mart. fornece uma tinta amarela.

A espécie floresce durante os meses de novembro-janeiro, produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis. A maturação dos frutos ocorre nos meses de agosto-setembro, com a planta quase totalmente despida de sua folhagem (LORENZI, 2000).

Entre as pesquisas envolvendo *Q. grandiflora*, destacam-se poucos trabalhos relacionando a interação entre a planta e os herbívoros. DINIZ e MORAIS (1997), relatam que 58 espécies de lagartas foram encontradas em 3 espécies de *Qualea*, a *Q. multiflora* Mart, a *Q. grandiflora* Mart. e a *Q. parviflora* Mart. . Enquanto OLIVEIRA et al. (1987) observaram que espécies do gênero *Qualea* possuem nectarias extraflorais – órgãos secretores de néctar em seus ramos, próximo à inserção das folhas, onde são encontradas formigas de muitas

.....

.....

espécies, sendo freqüentemente encontradas na *Q. grandiflora* procurando ativamente pelo néctar extrafloral. Nestas plantas não são observados ataques por herbívoros, sugerindo que as formigas poderiam agir como efetivo agente anti-herbívoros da *Qualea* spp. na vegetação do Cerrado. DEL CLARO (1996) também observaram que as formigas limitam o dano nas folhas causado pelos herbívoros nas árvores de *Qualea grandiflora* Mart., o que não exclui a hipótese da presença de outras substâncias que afetam os herbívoros.

São escassos os trabalhos relacionados à atividade farmacológica da planta. RODRIGUES e CARVALHO (2001) relatam que a infusão ou decocção das folhas de *Q. grandiflora* Mart. são usadas popularmente para diarreia com sangue, cólica intestinal e contra ameba. Já, o extrato metanólico da sua raiz foi estudado e apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ALVES et al., 2000).

Todavia, não há estudos sobre os efeitos farmacológicos das suas folhas, portanto o presente trabalho teve por objetivo avaliar as atividades gerais do extrato bruto hidroalcoólico e frações desta importante espécie da flora brasileira em diferentes modelos experimentais.

OBJETIVOS

Tendo em vista a falta de estudos relacionados às propriedades medicinais das folhas da planta *Qualea grandiflora* Mart., os objetivos deste trabalho são:

- ⇒ Obter o extrato bruto a partir das folhas desta espécie.
- ⇒ Avaliar a(s) atividade(s) farmacológica(s) do extrato bruto nos modelos experimentais descritos.
- ⇒ Avaliar a toxicidade deste extrato.
- ⇒ Purificar o extrato bruto e descobrir a(s) fração(s) ativa (s) nestes modelos experimentais.

REVISÃO DA LITERATURA

Apesar da riqueza da flora brasileira, com cerca de 55.000 espécies e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe consenso sobre a insuficiência de estudos científicos sobre o assunto (FERREIRA, 2004), dados disponíveis revelam que apenas 17% das plantas existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (CRAGG e NEWMAN, 1999). Portanto, a natureza ainda fornece um vasto e promissor campo para a pesquisa sobre as plantas.

Este fato junto com o crescente aumento das vendas de medicamentos contendo exclusivamente princípios ativos de origem natural ou com princípios ativos naturais

.....

associados a princípios ativos de outra natureza, que chega a 15,6% do total de vendas de medicamentos (FERREIRA, 2004), estimulam várias empresas privadas e organizações governamentais a instituir projetos de pesquisa na área da descoberta de novas substâncias ativas de origem vegetal (CALIXTO, 2000).

Com este crescente interesse das grandes corporações farmacêuticas pelo potencial de mercado dos produtos naturais, é imprescindível dar maior atenção ao aprofundamento do conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos (FERREIRA, 2004).

A epilepsia é um dos maiores problemas de saúde pública, por ser uma das mais freqüentes desordens cerebrais na população geral, sendo que 80% das pessoas que sofrem deste mal, vivem em países em desenvolvimento (ONU, 2001) e por volta de 4% destes indivíduos são afetados por toda sua vida (BROWNE e HOLMES, 2001). Por isso, há uma busca de novas opções terapêuticas ou aprimoramento dos tratamentos já existentes para esse mal (BETTING et al., 2003), apesar dos avanços já realizados e da disponibilidade de uma ampla variedade de drogas indicadas para este fim, ainda não representam a “cura” para um grande número de pacientes, nem mesmo de um controle adequado das crises convulsivas em aproximadamente 10 a 30% dos pacientes, além do desconforto dos efeitos colaterais e/ou tóxicos que alguns pacientes experimentam e que, muitas vezes, levam ao abandono do tratamento (LÖSCHER e SCHMIDT, 2002; WHO, 2001b).

.....

Desta forma, novos conceitos e idéias para o desenvolvimento de fármacos antiepilépticos mais seguros e eficazes, e menos tóxicos são urgentemente necessários (LÖSCHER e LEPPIK, 2002), tais como a descoberta de compostos que não causem efeitos colaterais cognitivos e sedação, ou seja, com menor prejuízo à função cerebral normal (WHO, 2001a).

Neste sentido, a pesquisa das plantas medicinais oferece um vasto campo para a descoberta de espécies com atividade anticonvulsivante e também, no fornecimento de substâncias ativas. Por exemplo, a planta *Salvadora pérsica* L. que possui efeitos sedativo e anticonvulsivante avaliados por MONFORTE et al. (2002), a fração isolada das raízes de *Delphinium denudatum* com propriedades anticonvulsivantes (RAZA et al., 2001) e também com esta mesma propriedade o composto timoquinona, extraído das sementes da planta *Nigella sativa* (HOSSEINZADEH e PARVARDEH, 2004), bem como muitas outras espécies que poderiam ser citadas.

A epilepsia caracteriza-se pela recorrência de ataques causados por descargas neuronais cerebrais de atividade elétrica excessiva numa parte do cérebro ou em seu todo (ONU, 2001), é uma desordem crônica e freqüentemente progressiva caracterizada por ocorrências periódicas e imprevisíveis dos ataques epilépticos (LÖSCHER, 1998), esta é a definição mais aceita, embora, não exista uma definição satisfatória de epilepsia pela ampla gama de

.....

.....

sintomas complexos, de várias etiologias, caracterizando uma situação crônica com crises epiléticas recorrentes não provocadas, na ausência de afecções tóxico-metabólicas ou febris remediáveis (COSTA, 2002).

Já que, as epilepsias são distúrbios da excitabilidade neuronal, a alteração na função sináptica poderia levar a uma crise convulsiva. A redução da atividade sináptica inibidora, mediada pelo neurotransmissor GABA, ou a potencialização da atividade sináptica excitadora, mediada pelo neurotransmissor glutamato, poderiam deflagrar uma crise (HARDMAN e LIMBIRD, 2001). O tratamento da epilepsia baseia-se principalmente nestes dois mecanismos, os fármacos agem aumentando a atividade inibitória mediada por GABA, ou reduzindo a excitabilidade dependente de glutamato. Podendo agir também pela alteração da neurotransmissão serotoninérgica, pela modulação dos canais de sódio ou pelo o bloqueio dos canais de cálcio (DE LORENZO, 1988; MOSHÉ, 2000).

O GABA é o principal aminoácido neurotransmissor inibitório do SNC, que ao se ligar ao receptor promove a abertura do canal de íon cloreto. Os barbitúricos e os benzodiazepínicos estimulam esta ação de GABA por se ligarem de forma alostérica, permitindo um aumento da entrada de cloro e, com isso, baixam a excitabilidade neuronal (PAGE et al., 1999).

.....

.....

O fenobarbital, administrado aos camundongos como controle positivo, é um barbitúrico anticonvulsivante que inibe as convulsões clônicas induzidas pelo PTZ. Inicialmente, quando foi descoberto nos primeiros anos do século XX, foi utilizado como barbitúrico hipnótico, porém não era muito efetivo, observando isto, em 1912, o psiquiatra Dr. Hauptmann decidiu administrar este fármaco a seus pacientes epiléticos, obtendo bons resultados. Dessa forma, o fenobarbital foi o primeiro agente anticonvulsivante orgânico eficaz descoberto (HARDMAN e LIMBIRD, 2001).

A atividade antiepilética específica do barbitúrico fenobarbital é limitar a expansão das descargas anômalas do cérebro, cujo mecanismo de ação é pela inibição sináptica por potencializar GABA nos receptores GABA_A (HARDMAN e LIMBIRD, 2001), sendo que as doses necessárias para a sua ação antiepilética são menores do que as que causam pronunciada depressão do SNC (MYCEK et al., 1998-2001).

Classicamente, testes de primeira linha no estudo de novos fármacos antiepiléticos utilizam métodos de indução aguda de crises epiléticas, como o teste do pentilenotetrazol (PTZ). A administração sub-cutânea desta substância é universalmente utilizada durante o “screening” pré-clínico para o desenvolvimento de fármacos anticonvulsivantes capazes de tratar ataques convulsivos generalizados primários (ataques mioclônicos e clônicos), as convulsões são primeiramente clônicas e depois formam um padrão epilético tônico-clônico (LÖSCHER e SCHMIDT, 1988).

.....

O PTZ é um fármaco estimulante do SNC que atua sobre os neurônios reduzindo as vias inibitórias que utilizam GABA, pelo bloqueio do canal de cloreto dos receptores GABA_A (GIORGI et al., 1996) e, pela ativação do receptor NMDA, aumento da ligação específica do glutamato no córtex (BALTER-SERI et al., 1999), induzindo convulsões comparáveis à epilepsia, visto que as descargas centrais ficam fora de controle. Após o 1º ataque ocorre a depressão ou morte do animal por parada respiratória (HARDMAN e LIMBIRD, 2001), podendo ter outros ataques antes da morte ou recuperar-se.

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico extraído de uma planta brasileira, o *Pilocarpus jaborandi*, inicialmente utilizada na investigação experimental de mecanismos colinérgicos agudos envolvidos na geração de crises convulsivas (OLNEY et al., 1983).

A epilepsia induzida pela pilocarpina causa crises motoras límbicas e estados de mal epiléptico que duram por muitas horas (fase aguda), em seguida ocorre um período silencioso caracterizado por normalização do eletroencefalograma por 3 a 15 dias, e uma fase crônica caracterizada por recorrência espontânea dos ataques (TURSKI, 2000). Este modelo constitui-se numa ferramenta importante para o estudo das epilepsias humanas do lobo temporal, já que replica suas características fenomenológicas (CAVALHEIRO, 1995; LEITE et al., 2002).

.....

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Coleta do material vegetal

As folhas de *Qualea grandiflora* Mart. foram coletadas das suas árvores em ambiente de Cerrado, na Reserva Ecológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo em Janeiro de 2001, sendo que a espécie foi devidamente identificada pelos botânicos Prof^a Dr^a M. Carmo E. do Amaral e Prof. Dr. Volker Bittrich do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Uma exsicata da espécie foi depositada no herbário do mesmo departamento sob o registro UEC-264. As figuras 1, 2 e 3 ilustram um exemplar da espécie e suas principais características.

.....



FIGURA 1: Exemplar de *Qualea grandiflora* Mart.



FIGURA 2: Detalhe das flores e das folhas de
Qualea grandiflora Mart.



FIGURA 3: Detalhe do fruto de
Qualea grandiflora Mart.

2) Preparação do Material Vegetal

Após a coleta, o material foi seco em estufa com circulação de ar da marca Fabbe, modelo 170, à temperatura de 45° C por 24hs.

As folhas secas foram moídas em moinho de facas (Metalúrgica Roma®, modelo MR-30), resultando em um pó fino de coloração esverdeada.

3) Processamento Fitoquímico

3.1) Obtenção do extrato bruto de *Qualea grandiflora* Mart.

A partir de 500g de folhas frescas foram obtidos 200g do pó das folhas secas, que foi submetido à maceração dinâmica em 1 litro de solução hidroalcoólica 70% por 4 horas, à temperatura ambiente, sendo em seguida filtrado a vácuo.

Ao resíduo do filtrado foi acrescentado 1 litro do mesmo líquido extrator sendo agitado e filtrado por mais dois novos períodos.

Os filtrados resultantes dos três períodos de extração foram reunidos e evaporados sob vácuo a uma temperatura de 40°C em rotaevaporador da marca Fisatom, modelo 802, até a remoção do etanol, sendo o volume restante submetido à liofilização (Liofilizador modelo Virtis BT8XL), resultando em 46g de um pó de cor marrom que foi denominado extrato bruto hidroalcoólico (EB) (Figura 4). O EB foi analisado por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) conforme descrito no item 3.3 (Figura 6, p.57).

3.2) Obtenção das frações de *Qualea grandiflora* Mart.

O EB (8g) foi colocado em um erlenmeyer juntamente com 300ml de hexano (Merck®) e 300ml de água destilada que foram agitados vigorosamente por 1 hora em mesa agitadora ou agitador de bandeja tipo baiana. Posteriormente, o volume foi transferido para um funil de separação, sendo as fases aquosa e orgânica separadas. Este processo foi realizado por mais dois novos períodos.

Após estes três períodos, a fase aquosa foi submetida a uma nova extração sendo utilizada como fase orgânica 300ml de éter etílico (Nuclear), passando pelo mesmo processo de separação citado acima. Destes procedimentos resultaram as frações: Hexano (FH)= 1,28g, Éter etílico (FE) = 2,54g, e Aquosa (FA) = 3,86g (Total = 7,68g) (Figura 4). Todas as frações foram analisadas por CCD conforme descrito no item 3.3. (Figura 7, p.57).

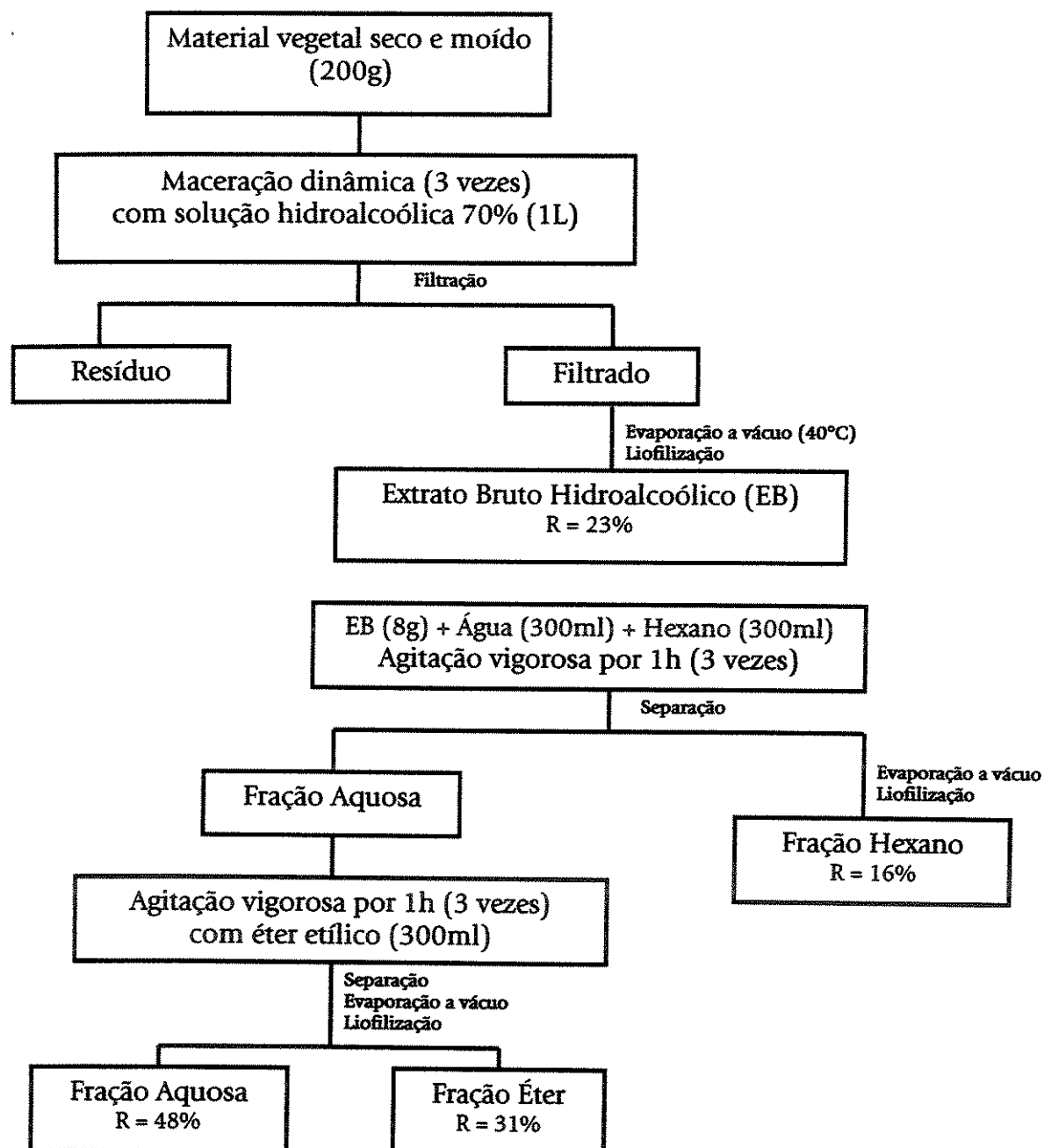


FIGURA 4: Fluxograma de obtenção do EB e frações de *Qualea grandiflora* Mart.

3.3) Análise por cromatografia em camada delgada

Para a análise cromatográfica uma alíquota do extrato bruto ou das frações foi diluída em metanol (Merck®), e aplicada em cromatoplasas de sílica gel 60 F₂₅₄ (MERCK 1.05554), sendo posteriormente eluída com uma solução de Clorofórmio (Merck®): metanol (Merck®) (90:10) em cubas de vidro previamente saturadas. Após o desenvolvimento, o cromatograma foi visualizado em câmara com luz ultravioleta a 254 e 366nm e em seguida revelado com solução de anisaldeído (ácido acético glacial (Merck®): ácido sulfúrico (Chemco): anisaldeído 50:1: 0,5 (v/v)). Para a visualização do cromatograma a placa foi aquecida em estufa a 100°C por 5 minutos.

A fração hexano - FH (2,45g) foi submetida ao mesmo fracionamento, utilizando a mesma fase móvel e a mesma sequência de polaridade do procedimento acima, sendo o volume de 1600ml. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 da Merck, 70-230 mesh, sendo 39g para o preparo da amostra e 85g para o preparo do funil (Figura 5).

O processo resultou em 3 frações: 2FH = 1,14g, 6FH = 0,20g e 10FH = 0,85g (Total = 2,31g), que foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos para a fração éter. A figura 9 (p.58) mostra a CCD das frações.

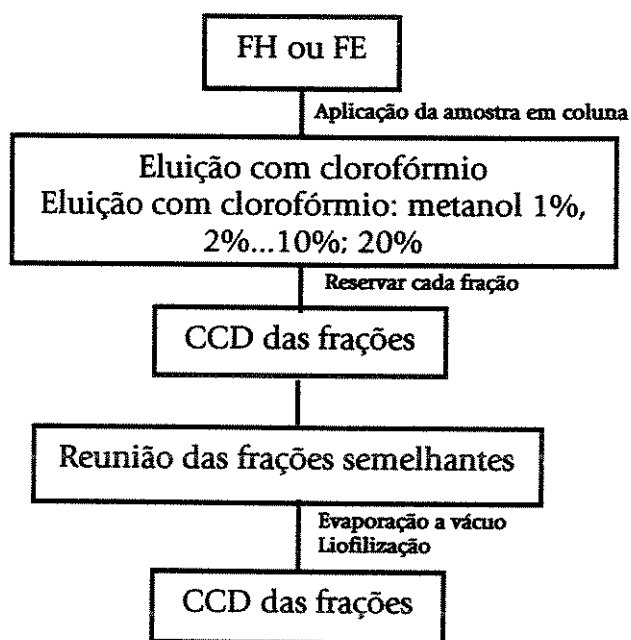


FIGURA 5: Fluxograma de obtenção das frações purificadas a partir das frações FH e FE de *Qualea grandiflora* Mart.

4) Testes de Atividade Farmacológica

4.1) Animais

Foram utilizados para os experimentos, camundongos "*Swiss*" machos, pesando entre 25 e 30g, adquiridos do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP, mantidos em câmaras com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos de claro-escuro de 12 horas e com água e ração "*ad libitum*", sendo que passaram por um período mínimo de sete dias de adaptação ao Biotério antes de serem utilizados nos experimentos. Para a utilização desses animais nos experimentos foram seguidas as normas éticas de cuidados com os animais preconizadas pela COMMISSION ON LIFE SCIENCES (1996) e CIOMS (1985).

4.2) Preparação das drogas

As drogas usadas nos experimentos foram dissolvidas em solução salina 0,9%, sendo preparadas sempre no momento do experimento e administradas nos animais logo em seguida. O volume administrado foi de 0,1ml/10g do peso do animal. Os animais controles receberam o mesmo volume do veículo (solução salina 0,9%).

4.3) Teste de efeitos gerais – Triagem Farmacológica

Grupos de cinco camundongos foram tratados, via i.p., com solução salina 0,9% ou com extrato bruto hidroalcoólico nas doses de 300, 500, 1000 e 1500mg/Kg, e observados em deambulação livre sobre uma superfície plana por um período de 5 horas, e após 24 e 48 horas, sendo anotadas as reações dos animais (MALONE, 1977; KANJANAPOTHI et al., 2004).

O mesmo procedimento foi realizado com as frações hexano e éter, ambas administradas nas doses de 300 e 500mg/Kg.

4.4) Potenciação do sono induzido por barbitúrico

Para avaliação da atividade depressora do SNC, foram utilizados grupos de 5 camundongos tratados, via i.p., com solução salina 0,9% (grupo controle) ou com extrato bruto hidroalcoólico nas doses de 500 e 1000mg/Kg.

Após trinta minutos, todos os animais foram tratados com pentobarbital sódico via i.p. (40mg/Kg). A partir daí foram medidos o tempo de indução, intervalo de tempo entre a administração do anestésico, a perda do reflexo postural, e o tempo de duração do sono, período compreendido entre a indução do sono e a recuperação espontânea do reflexo postural (CARLINI e BURGOS, 1979).

4.5) Teste de algesia induzida por calor

Foram utilizados grupos de cinco camundongos tratados pela via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle) ou com o extrato bruto hidroalcoólico (500 ou 1000mg/Kg), 1 hora antes de serem submetidos ao estímulo algico em placa quente com temperatura controlada de $56,5^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. O período de latência até apresentarem o reflexo doloroso (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras) foi observado e anotado para cada animal que foi submetido a este estímulo só uma vez.

Depois da reação ou ausência de resposta após 30 segundos, o camundongo foi imediatamente retirado da placa aquecida (MAZELLA et al., 1991; MALMBERG e BANNON, 1999).

4.7) Atividade Anticonvulsivante

Todos os experimentos foram conduzidos no período do verão, devido às variações sazonais sofridas pelos animais, apesar das condições laboratoriais controladas, com marcante perda da atividade anticonvulsivante no final do inverno e início da primavera (LÖSCHER e FIEDLER, 2000).

4.7.1) Teste do Pentilenotetrazol (PTZ)

As convulsões clônico-tônicas foram induzidas pela administração via subcutânea de 85 mg/Kg de pentilenotetrazol (PTZ), 30 minutos após o tratamento dos grupos, via i.p., com 500 mg/Kg ou 1000 mg/Kg do extrato bruto ou com 300mg/Kg das frações hexano ou éter, ou com solução salina (grupo controle negativo) ou com 5 mg/Kg de fenobarbital (controle positivo).

Os animais foram observados em caixas individuais, por um período de 1 hora, onde os parâmetros avaliados foram, o tempo para a primeira convulsão (latência), número e tipo de convulsões (tônicas e/ou clônicas) e morte. Se nenhum desses episódios ocorrer até o tempo limite de 1 hora, o animal foi considerado protegido (SWINYARD, 1969; SWINYARD et al., 1989; KRALL et al., 1978; WANG et al., 2000).

.....

4.7.2) Teste da Pilocarpina

Foram administrados 300mg/Kg de pilocarpina, via subcutânea, para induzir a convulsão após 30 minutos da administração intraperitoneal do extrato bruto (500 mg/Kg ou 1000 mg/Kg) ou da solução salina (grupo controle) (EL-ETRI, 1993).

Os animais foram observados em caixas individuais por um período de 1 hora, e foram avaliados os mesmos parâmetros descritos para o teste do PTZ. Os animais que sobreviveram, foram mantidos sob observação por um período de 15 dias.

4.8) Toxicidade aguda

O extrato bruto foi administrado aos camundongos em doses crescentes (300, 500, 1000 e 1500mg/Kg) pela via intraperitoneal.

Após a administração dos extratos, os animais de todos os grupos foram observados por 4 horas e diariamente por um período de 14 dias, quanto a alteração de peso corporal, pelo e mucosas, presença de diarreia e convulsões, estados de depressão e excitação, estereotipia, entre outros. A mortalidade para cada uma das doses foi anotada e valor da DL₅₀ foi determinado (LITCHFIELD e WILCOXON, 1949; KANJANAPOTHI et al., 2004).

5) Análise estatística

Os resultados foram expressos como as médias dos tempos das reações observadas do grupo controle comparado com o grupo tratado com o extrato ou frações.

Os resultados obtidos do teste potenciação do tempo de sono barbitúrico foram avaliados estatisticamente usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan, já os testes anticonvulsivantes foram avaliados estatisticamente usando o teste Log-rank, utilizado para comparar as curvas de sobrevivência até um determinado evento. No presente caso, as curvas analisadas foram do tempo até a morte do animal ou até a convulsão (tempo de latência).

5.1) Determinação da dose letal 50%

Grupos de cinco animais foram tratados pela via intraperitoneal com doses crescentes do EB (300, 500, 1000 e 1500mg/Kg) ou com a solução salina e foram observados.

Para certas doses do EB a morte ocorreu, essa dose indica a tolerância de cada animal ao EB, ou seja, ultrapassando-se a tolerância individual o animal morre. Para doses abaixo da tolerância individual o animal permanece vivo. O parâmetro de interesse, DL_{50} , é a mediana da distribuição dos valores da tolerância, ou a dose na qual 50% dos animais morrem.

BERKSON (1951) chamou a atenção para o fato de que a distribuição logística comparada à distribuição normal, também funciona bem como distribuição da tolerância, gerando essencialmente os mesmos resultados.

Os valores encontrados para a DL_{50} , bem como para o intervalo de confiança (95%) foram calculados utilizando o sistema SAS® (*Statistical Analysis System*).

RESULTADOS

1) Processamento Fitoquímico

O processamento fitoquímico foi direcionado conforme os resultados dos testes farmacológicos. Após ter sido observado que o extrato bruto apresentou atividades no teste de efeitos gerais (triagem farmacológica), o mesmo foi submetido a fracionamento conforme o grau de polaridade das suas substâncias, resultando nas frações FH (apolar), FE (média polaridade) e FA (polar). Estas frações foram avaliadas no teste de efeitos gerais e apenas a FA não apresentou qualquer atividade, sendo assim, a FH e a FE foram submetidas à purificação em cromatografia de coluna.

1.1) Rendimento do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Qualea grandiflora* Mart.

O rendimento do extrato bruto foi de 23% e as frações resultantes de seu fracionamento obtiveram um rendimento total de 96%, sendo que FH = 16%, FE = 32% e FA = 48%.

As frações purificadas da FE renderam 72%, sendo que FCl. = 21,3%, 1FE = 13%, 2FE = 9,8%, 3FE = 7,2% e 4FE = 20,7%. Já, as purificadas da FH obtiveram um rendimento de 94,8%, sendo que 2FH = 49,4%, 6FH = 8,6% e 10FH = 36,8%.

1.2) Cromatografia de camada delgada do extrato bruto e frações de *Qualea grandiflora* Mart.

O extrato bruto e as frações foram analisados por CCD para a visualização dos componentes da mistura. Foram testados vários sistemas de solventes para separação ideal dos compostos presentes no extrato e frações, sendo que o que apresentou melhor separação foi a solução Clorofórmio: Metanol 10%. Após o desenvolvimento do cromatograma as manchas foram visualizadas utilizando o revelador anisaldeído (Figuras 6, 7, 8 e 9).



Figura 6: Cromatografia de camada delgada do EB obtido a partir das folhas secas e moídas de *Qualea grandiflora* Mart.

Fase estacionária: sílica gel 60 F₂₅₄.

Eluente: Clorofórmio:Metanol (90:10).

Revelador: Anisaldeído.

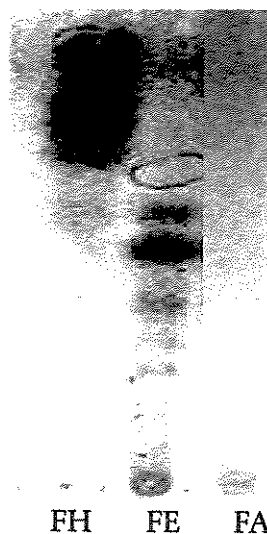


Figura 7: Cromatografia de camada delgada das Frações obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart.

Fase estacionária: sílica gel 60 F₂₅₄.

Eluente: Clorofórmio:Metanol (90:10).

Revelador: Anisaldeído.

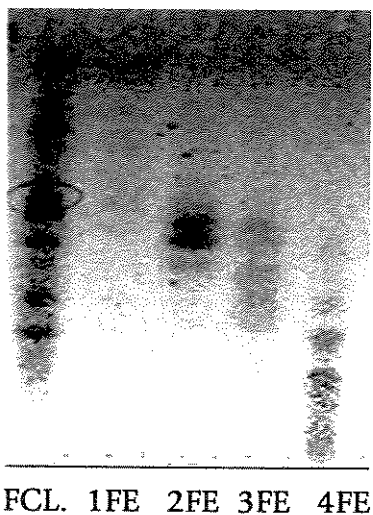


Figura 8: Cromatografia de camada delgada das Frações purificadas da FE de *Qualea grandiflora* Mart.
Fase estacionária: sílica gel 60 F₂₅₄.
Eluente: Clorofórmio:Metanol (90:10).
Revelador: Anisaldeído.



Figura 9: Cromatografia de camada delgada das Frações purificadas da FH de *Qualea grandiflora* Mart.
Fase estacionária: sílica gel 60 F₂₅₄.
Eluente: Clorofórmio:Metanol (90:10).
Revelador: Anisaldeído.

2) Testes de Atividade Farmacológica

2.1) Teste de efeitos gerais – Triagem Farmacológica

Os animais que receberam o extrato bruto na dose de 500mg/Kg apresentaram diminuição da resposta ao toque e ao aperto da cauda, diminuição da atividade exploratória e piloereção. Na dose de 1000mg/Kg, eles apresentaram todos os sinais mencionados, além de diminuição do reflexo auricular. E, na dose de 1500mg/Kg os camundongos apresentaram diminuição da força para agarrar, contorção abdominal, além dos sinais mencionados anteriormente. Tremores e lacrimação não foram observados (Tabela 1).

TABELA 1: Efeitos do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste triagem farmacológica.

Tempo após a administração do EB nas doses de 300, 500, 1000 e 1500mg/Kg via i.p. que ocorreram os sinais diferentes aos do grupo controle e o número de camundongos que apresentaram estes sinais.

SINAIS	EB (mg/Kg)			
	300	500	1000	1500
* Resposta ao toque (√)	-	30' (5/5)	30' (5/5)	30' (5/5)
* Resposta ao aperto de cauda (√)	-	30' (3/5)	30' (4/5)	30' (5/5)
* Força p/agarrar (√)	-	-	-	30' (4/5)
* Atividade exploratória (√)	-	30' (4/5)	30' (4/5)	30' (5/5)
* Piloereção	-	1 h (5/5)	30' (5/5)	30' (5/5)
* Reflexo auricular (√)	-	-	1 h (4/5)	30' (5/5)
* Contorção abdominal	-	-	-	1 h (4/5)
* Tremores	-	-	-	-
* Lacrimação	-	-	-	-

(√) Indica diminuição do sinal.

Os camundongos que receberam a fração éter etílico na dose de 300mg/Kg apresentaram diminuição das respostas ao toque e ao aperto de cauda, piloereção e diminuição do reflexo auricular e da atividade exploratória. Já, na dose de 500mg/Kg, os animais apresentaram, além dos sinais mencionados, edema e contorção abdominal, lacrimação e agressividade. É interessante ser notado que a piloereção persiste até a morte de todos os animais após 24 horas da administração.

A administração da fração hexano (300mg/Kg, via i.p.) não provocou qualquer sintoma diferente dos animais do grupo controle. Na dose de 500mg/Kg, via i.p., os animais apresentaram diminuição da resposta ao toque (Tabela 2).

TABELA 2: Efeitos das frações FE e FH obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste triagem farmacológica.

Tempo após a administração das frações nas doses de 300 e 500mg/Kg via i.p. que ocorreram os sinais diferentes aos do grupo controle e o número de camundongos que apresentaram estes sinais.

SINAIS	FRAÇÃO ÉTER (mg/Kg)		FRAÇÃO HEXANO (mg/Kg)	
	300	500	300	500
* Resposta ao toque (∇)	30' (5/5)	30' (5/5)	-	30' (5/5)
* Resposta ao aperto de cauda (∇)	30' (2/5)	30' (3/5)	-	-
* Força p/agarrar (∇)	-	-	-	-
* Atividade exploratória (∇)	1 h (4/5)	30' (4/5)	-	-
* Piloereção	30' (4/5)	30' (5/5)	-	-
* Reflexo auricular (∇)	1 h (5/5)	30' (5/5)	-	-
* Edema e contorção abdominal	-	30' (3/5)	-	-
* Tremores	-	-	-	-
* Lacrimação	-	30' (3/5)	-	-

(∇) Indica diminuição do sinal.

2.2) Potenciação do sono induzido por barbitúrico

O pré-tratamento com o extrato bruto potenciou o tempo de sono induzido pelo pentobarbital. O extrato na dose de 500mg/Kg aumentou o tempo de sono de 39,6 minutos ($\pm 15,6$) para 77,6 minutos ($\pm 29,8$) ($p < 0,05$). Na dose de 1000mg/Kg o resultado não foi significativo (Tabela 3 e Figura 10).

TABELA 3: Efeito do EB de *Qualea grandiflora* Mart. administrado via i.p. nas doses de 500 e 1000mg/Kg, no teste potenciação do sono induzido por barbitúrico.

GRUPO	TEMPO DE SONO (Média $\pm$ EP)
CONTROLE	39,6 $\pm$ 6,9
EB 500mg/kg	77,6 $\pm$ 13,3 *
EB 1000mg/Kg	56,5 $\pm$ 10,8

(*) Dose efetiva – $p < 0,05$ (ANOVA, teste de Duncan).

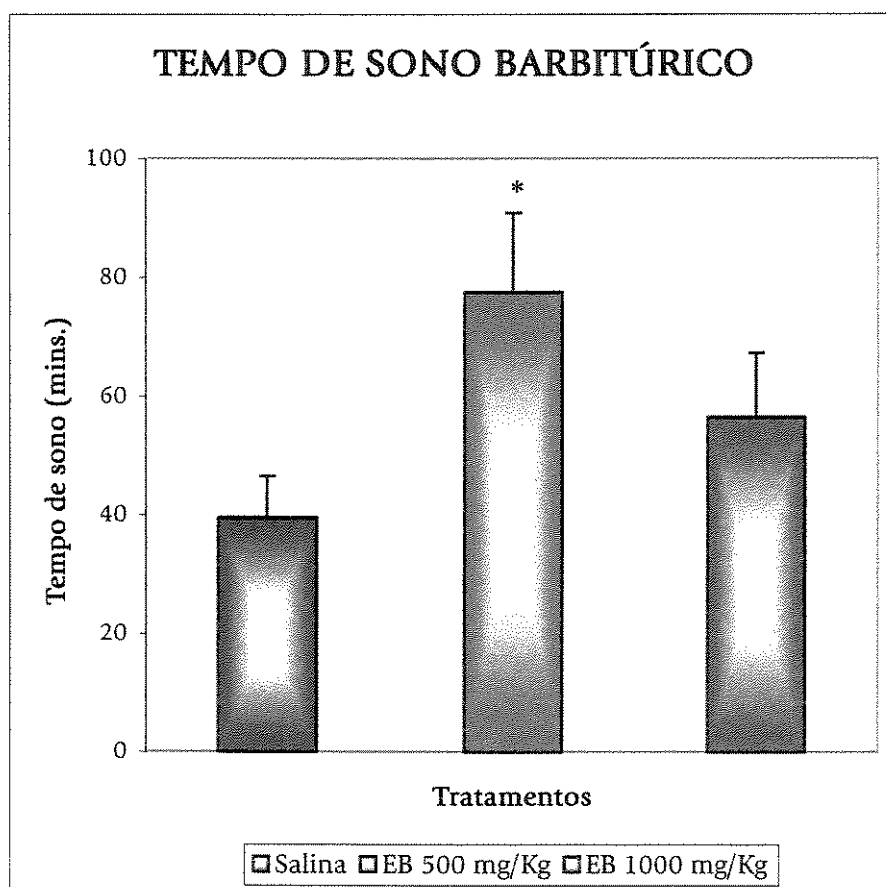


FIGURA 10: Efeito do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste potenciação do tempo de sono induzido por barbitúrico. Tempo de sono (Média $\pm$ EP) do grupo controle comparado ao do EB administrado via i.p. nas doses de 500 e 1000mg/Kg. (*) Dose efetiva – $p < 0,05$ (ANOVA, teste de Duncan).

2.3) Teste de algesia induzida por calor

Na dose de 500mg/Kg o EB aumentou o tempo de latência 120% e na dose de 1000mg/Kg aumentou 251,7% em relação ao grupo controle (Figura 11).

TABELA 4: Efeito do EB de *Qualea grandiflora* Mart. administrado via i.p. nas doses de 500 e 1000mg/Kg, no teste algesia induzida pelo calor.

GRUPO	LATÊNCIA P/ REFLEXO (Média ± EP)
CONTROLE	5,8 ± 0,4
EB 500mg/kg	12,8 ± 0,8 *
EB 1000mg/Kg	20,4 ± 0,5 *

(*) Doses efetivas – $p < 0,05$ (ANOVA, teste de Duncan).

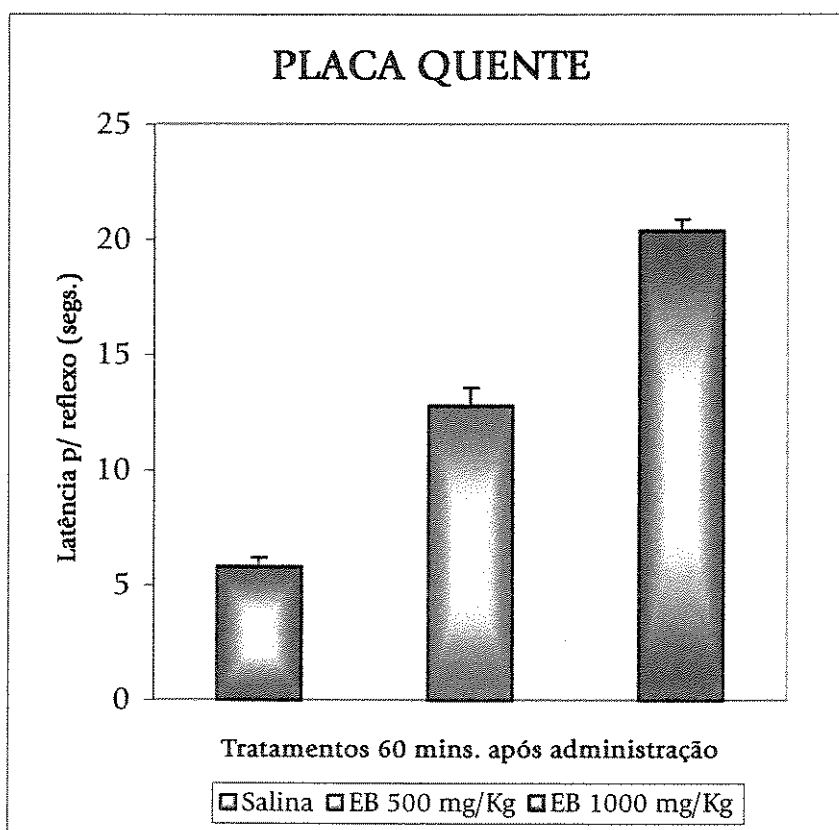


FIGURA 11: Efeito do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste algesia induzida pelo calor.

Tempo de latência (Média ± EP) para o reflexo do grupo controle comparado ao do EB(500 e 1000mg/Kg), 60 minutos após a administração via i.p.

2.4) Teste da Barra Giratória (Rotarod)

As frações hexano e éter na dose de 500mg/Kg não causaram distúrbio na coordenação motora dos animais (Tabela 4).

TABELA 5: Efeito das frações FH e FE obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da barra giratória (ROTAROD).

Tempo após administração (mins.)	TEMPO DE QUEDA (secs.)		
	Salina	Fração Hexano	Fração Éter
30	68 ± 6,7 *	68 ± 3,7 *	67 ± 2,9 *

(*) média ± Erro Padrão

2.5) Atividade Anticonvulsivante

2.5.1) Teste do Pentilenotetrazol (PTZ)

O extrato bruto na dose de 500mg/Kg aumentou o tempo de latência para a convulsão e para a morte e/ou evitou a morte dos animais (Figuras 12 e 13). Na dose de 1000mg/Kg não se verificou variação significativa comparado com a dose de 500mg/Kg.

Após o fracionamento deste extrato foi observado que a fração éter é ativa no tempo de latência para a convulsão (Figura 14), enquanto a fração hexano é ativa em inibir ou aumentar o tempo para a morte (Figura 15). Ambas na dose de 300mg/Kg.

Na purificação da fração hexano, a mais ativa no tempo para a morte foi a fração 2FH, sendo que nenhuma das frações apresentou atividade significativa na convulsão (Figuras 16 e 17).

Das frações obtidas da purificação da fração éter, nenhuma foi efetiva no tempo para a morte, já no tempo de latência para a convulsão a mais ativa foi a 2FE (Figuras 18 e 19).

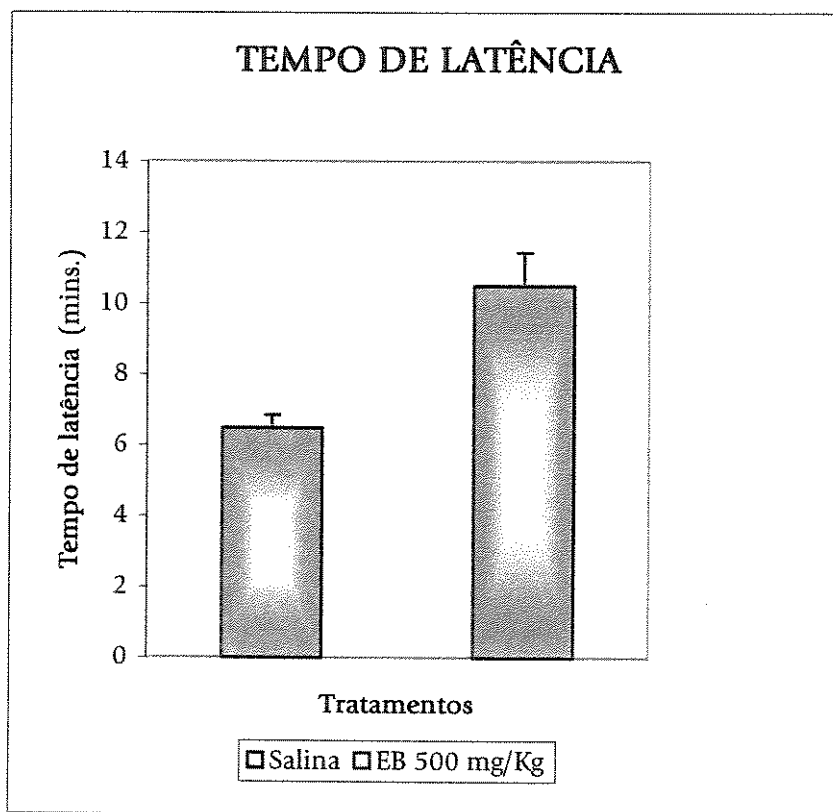


FIGURA 12: Efeito do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

EB - administrado via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Média $\pm$ EP do tempo de latência para a primeira convulsão.

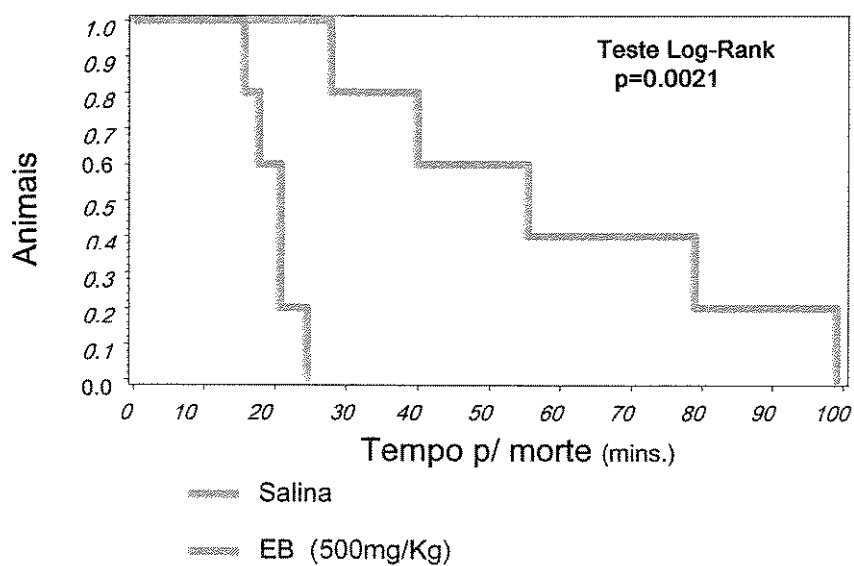


FIGURA 13: Efeito do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

EB - administrado via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Tempo para morte para cada animal.

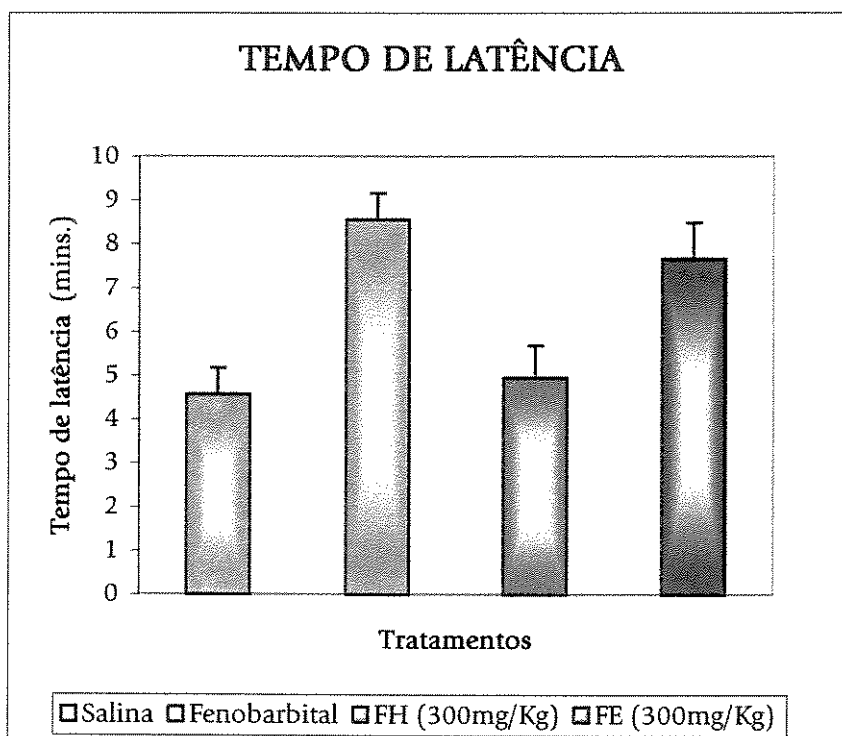


FIGURA 14: Efeito das frações FH e FE obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

FH e FE - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Média $\pm$ EP do tempo de latência para a primeira convulsão.

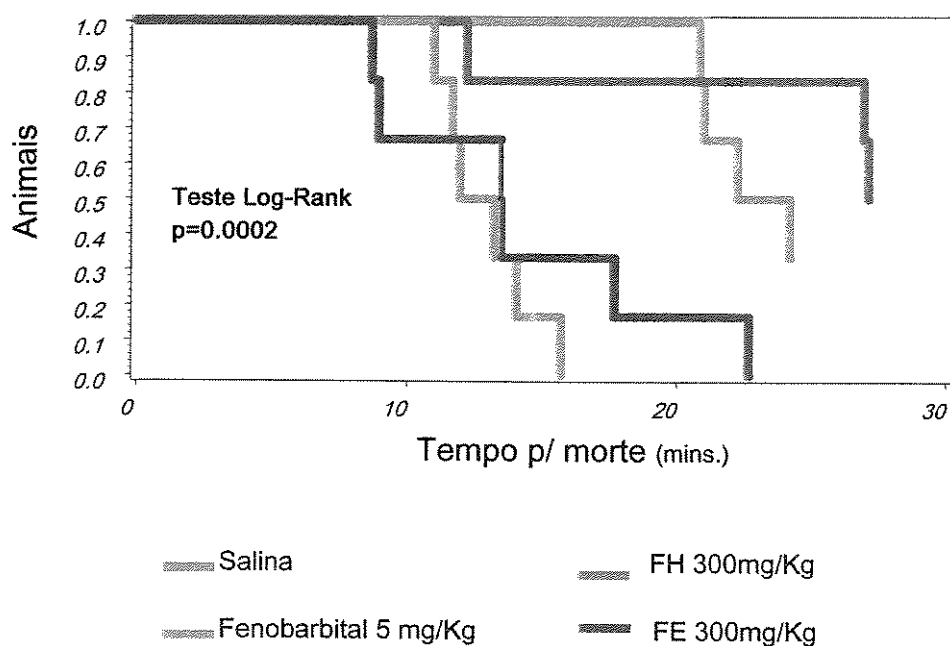


FIGURA 15: Efeito das frações FH e FE obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

FH e FE - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Tempo para morte para cada animal.

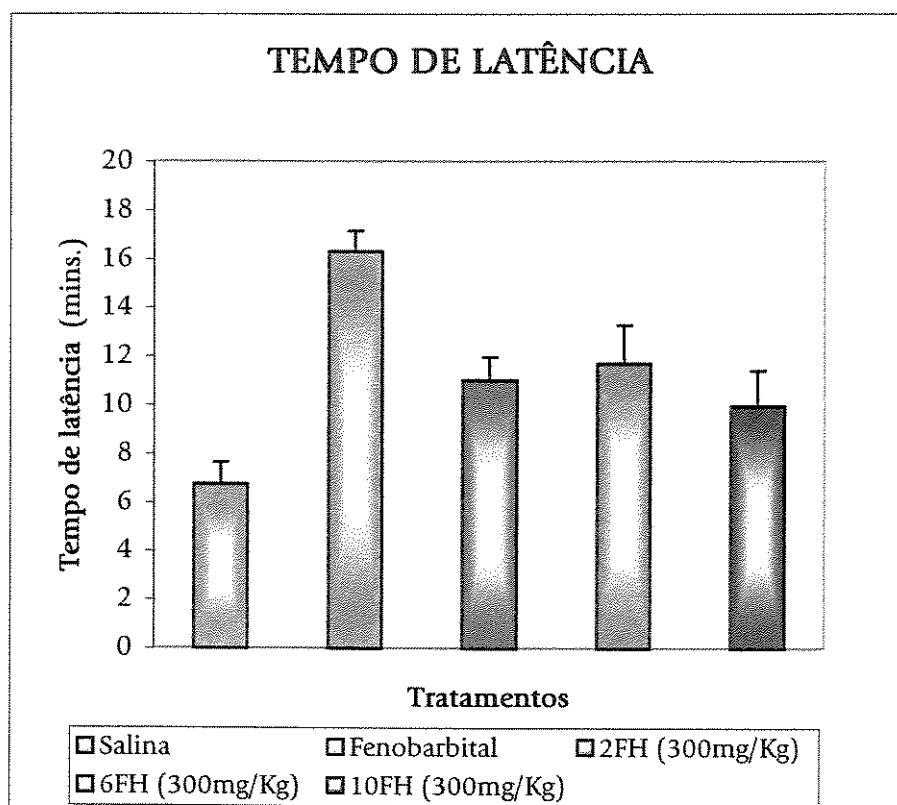


FIGURA 16: Efeito das frações 2FH, 6FH e 10FH obtidas da purificação da fração FH no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

2FH, 6FH e 10FH - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Média $\pm$ EP do tempo de latência para a primeira convulsão.

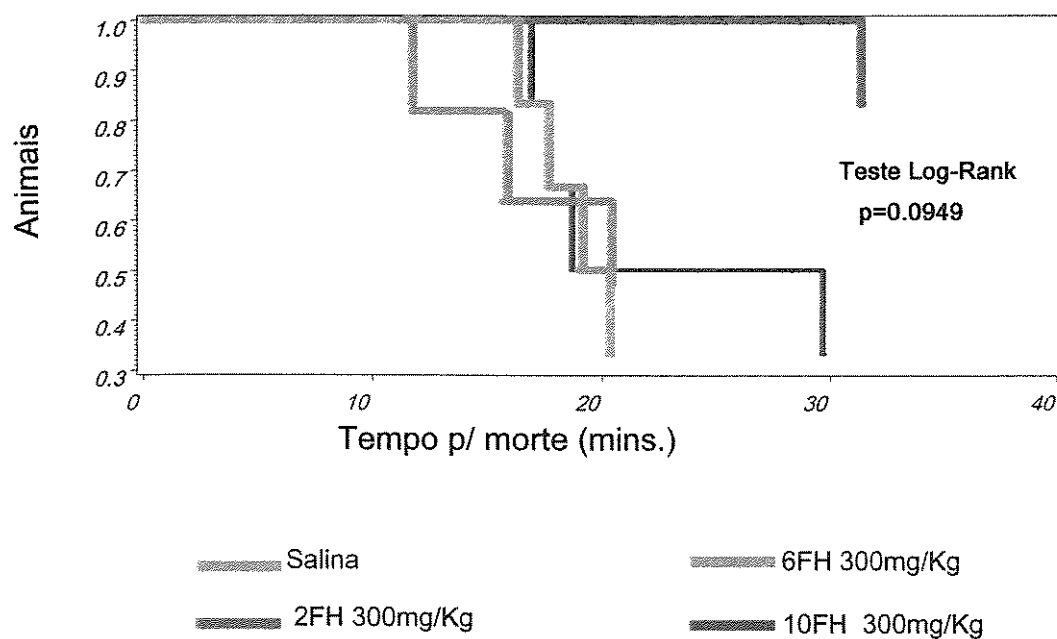


FIGURA 17: Efeito das frações 2FH, 6FH e 10FH obtidas da purificação da fração FH no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

2FH, 6FH e 10FH - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Tempo para morte para cada animal.

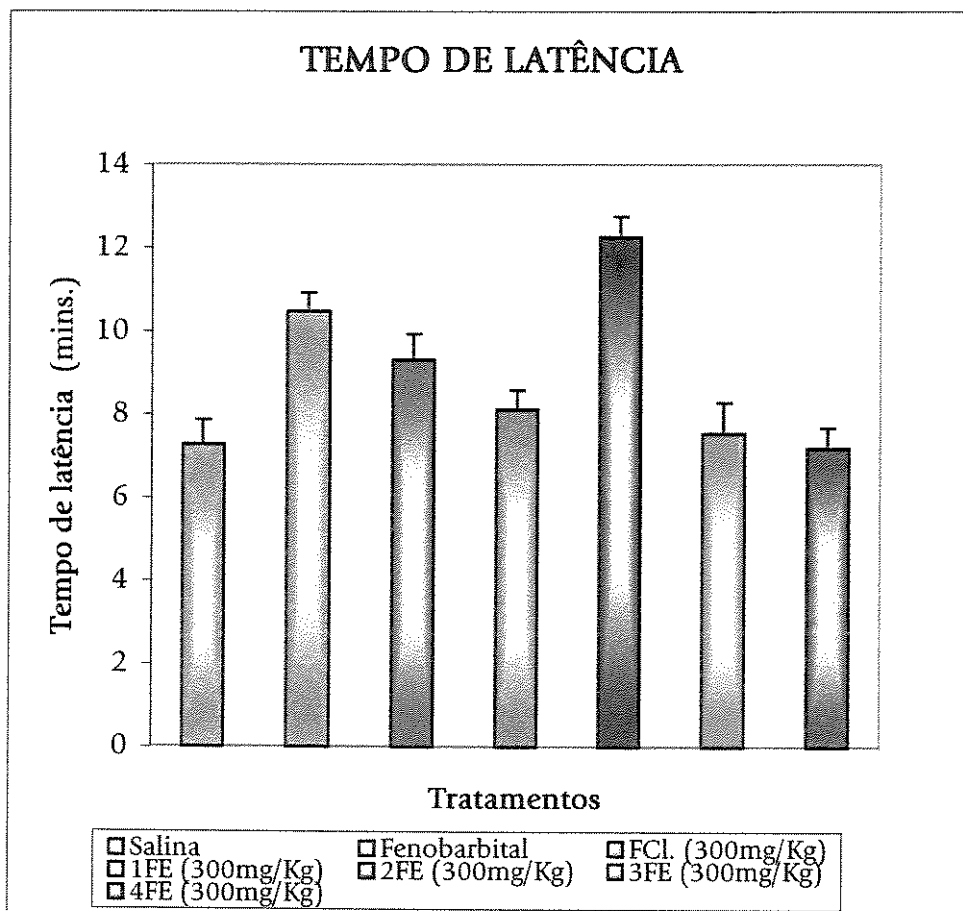


FIGURA 18: Efeito das frações FCl., 1FE, 2FE, 3FE, 4FE obtidas da purificação da fração FE no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

FCl., 1FE, 2FE, 3FE, 4FE - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Média $\pm$ EP do tempo de latência para a primeira convulsão.

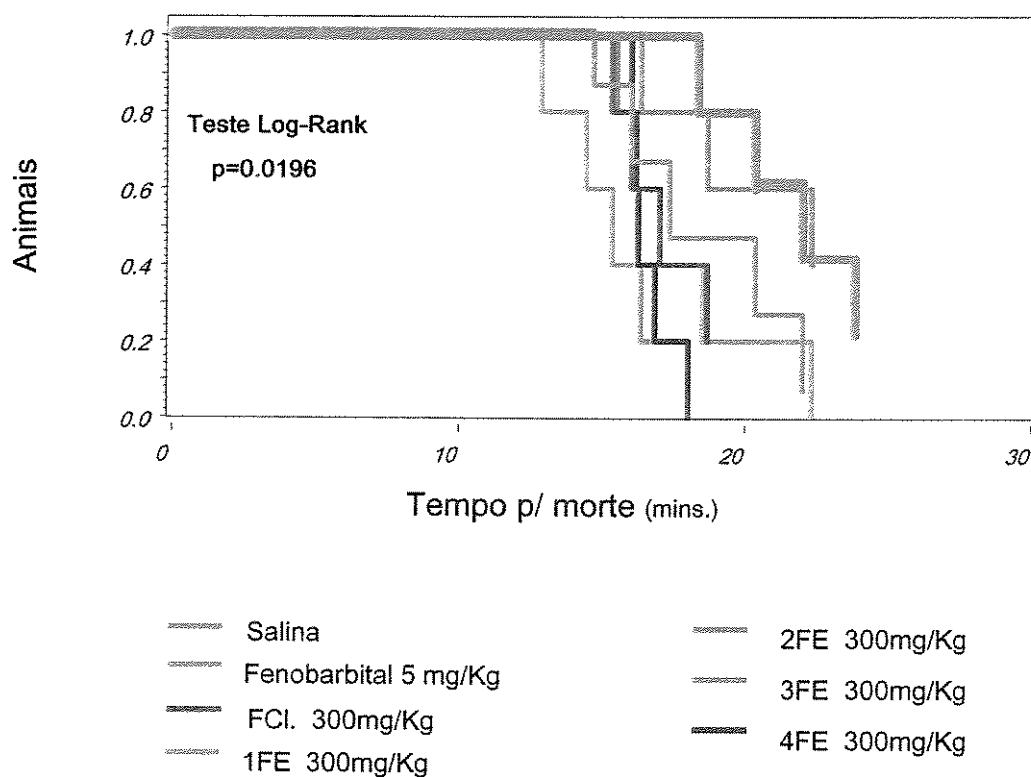


FIGURA 19: Efeito das frações FCL, 1FE, 2FE, 3FE, 4FE obtidas da purificação da fração FE no teste da convulsão induzida pelo PTZ.

FCL, 1FE, 2FE, 3FE, 4FE - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Tempo para morte para cada animal.

2.5.2) Teste da Pilocarpina

No teste da convulsão induzida pela pilocarpina tanto o EB (500mg/Kg e 1000mg/Kg) quanto as frações (300mg/Kg), não apresentaram atividade para evitar e/ou prolongar o tempo para convulsão e/ou morte (Figuras 20 e 21) .

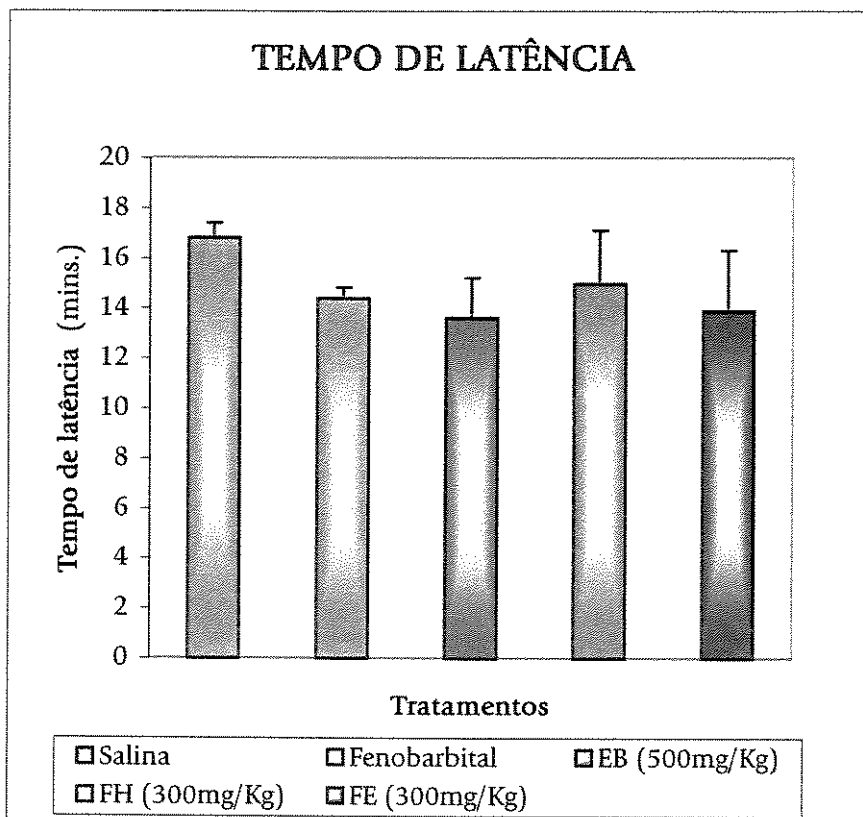


FIGURA 20: Efeito do EB e das frações FH e FE obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da convulsão induzida pela pilocarpina.

EB, FE e FH - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Média $\pm$ EP do tempo de latência para a primeira convulsão.

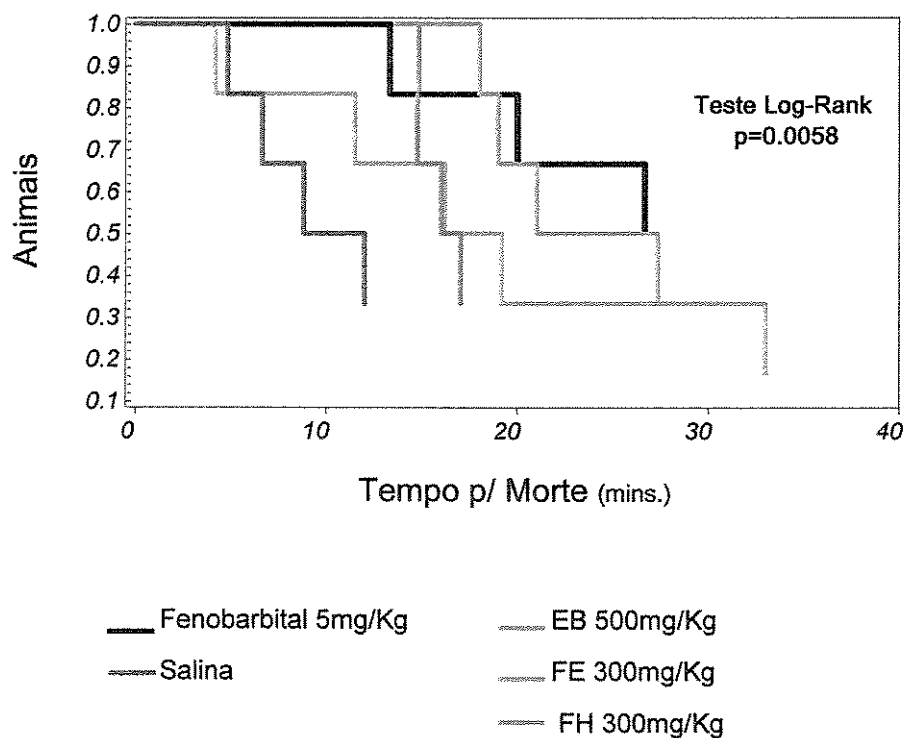


FIGURA 21: Efeito do EB e das frações FH e FE obtidas a partir do EB de *Qualea grandiflora* Mart. no teste da convulsão induzida pela pilocarpina.

EB, FE e FH - administradas via i.p. trinta minutos antes da injeção via s.c. de PTZ.

Tempo para morte para cada animal.

2.6) Determinação da dose letal 50%

No presente caso, considerando as doses 0, 300, 500, 1000 e 1500 mg/Kg e os números de animais mortos com cada dose utilizada, os valores encontrados para a DL_{50} , bem como o intervalo de confiança (95%), foram: $DL_{50} = 1321\text{mg/Kg}$ (20; 83599).

DISCUSSÃO

As folhas da árvore *Qualea grandiflora* Mart. foram coletadas em seu habitat natural, em ambiente de cerrado, para a obtenção do extrato bruto e frações com o objetivo de avaliar as suas propriedades farmacológicas, visto que há poucas informações sobre esta espécie; e baseado no fato de que as plantas do Cerrado, devido as condições climáticas e do solo, necessitam se adaptar ao meio e acabam por desenvolver promissores princípios ativos que podem aliviar muitos males.

O extrato bruto (EB) desta planta foi obtido por maceração dinâmica em solução hidroalcoólica 70% para que praticamente todos os seus compostos químicos fossem arrastados para o solvente, já que a composição química desta espécie é desconhecida.

.....

Os efeitos do EB e suas frações foram estudados em modelos experimentais, sendo primeiramente, submetidos à análise de atividade geral (Triagem Farmacológica).

Nesta análise foram observados sinais que indicam depressão do sistema nervoso central tais como, diminuição das respostas ao toque, ao aperto de cauda e da atividade exploratória; e leve sedação, os animais se tornaram calmos e relaxados. Este efeito depressor do SNC também foi observado no teste potenciação do tempo de sono barbitúrico, pois o EB aumentou significativamente o tempo de sono induzido pelo pentobarbital. Este aumento do tempo de sono barbitúrico é classicamente relatado como sendo típico de drogas depressoras do SNC (WILLIANSO et al., 1996). Apesar de que, este teste não é específico porque há compostos que interferem com a biotransformação do pentobarbital pelo complexo citocromo P450 podendo apresentar os mesmos efeitos de drogas depressoras do SNC (GOLOUBKOVA et al., 1998). Todavia, os camundongos tratados com o EB foram parcialmente protegidos das convulsões induzidas pelo PTZ, podendo indicar um efeito mais específico devido à ação no sistema GABA (LÖSCHER, 1998).

Os animais também apresentaram piloereção marcante que permaneceu mesmo após 24hs., o que indica estimulação do sistema nervoso autônomo simpático, ou seja, estimulação colinérgica periférica (WILLIANSO et al., 1996). Podendo ser sugerido um aumento da atividade colinérgica muscarínica, devido à ação do EB no teste de convulsão

.....

.....

induzida pelo PTZ que segundo HARDMAN e LIMBIRD (2001), o aumento do tempo de latência para a convulsão e diminuição da intensidade das convulsões produzidas, além da ação no tempo de morte neste modelo experimental são característicos de compostos com esta atividade estimulante colinérgica.

Para a análise da atividade anticonvulsivante foi escolhido o teste do PTZ porque é uma das primeiras análises a ser aceita convencionalmente para procedimento de “screening” de substâncias anticonvulsivantes, mais especificamente de substâncias químicas que alteram o limiar do ataque (SWINYARD e KUPFERBERG, 1988; LÖSCHER e SCHMIDT, 1988).

As substâncias envolvidas com a atividade na convulsão e na morte induzidas pelo PTZ, provavelmente, não são as mesmas, visto que, após o fracionamento do EB, a FE foi ativa na convulsão e a FH na morte. Adicionalmente, ambas não provocam incoordenação motora na dose que apresentaram atividade anticonvulsivante, indicando que não são neurotóxicas nesta dose.

O PTZ sendo um antagonista não-competitivo dos receptores GABA, os compostos existentes nas folhas da planta *Qualea grandiflora* Mart. responsáveis pela atividade anticonvulsivante, provavelmente estão envolvidos com o sistema gabaérgico. Possivelmente, o aumento da disponibilidade de GABA na fenda sináptica, em virtude do

.....

.....

bloqueio da recaptação e estimulação da liberação deste neurotransmissor, tenha revertido parcialmente o antagonismo nestes receptores pelo PTZ (COSTA, 2002).

No modelo de convulsão induzida pela pilocarpina, o EB e as frações FH e FE não apresentaram atividade, sugerindo que esta planta não age nas convulsões do lobo temporal.

Análises preliminares por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas indicaram a presença das substâncias α e β -amirina no extrato da *Qualea grandiflora* Mart. Estas substâncias estão presentes no extrato da planta *Lavandula stoechas* L. que prolongou o tempo de latência para a convulsão e o tempo para a morte e/ou evitou a morte induzidas pelo PTZ, além de prolongar o tempo de sono barbitúrico (GILANI, et al., 2000). Portanto, apresentou atividade anticonvulsivante similar à planta estudada neste trabalho, o que sugere que estas substâncias podem estar envolvidas com esta atividade.

As folhas da planta *Qualea grandiflora* Mart. possuem potencial anticonvulsivante contra as convulsões induzidas pelo PTZ. Os mecanismos de ação e os compostos envolvidos nestes efeitos farmacológicos necessitam ser elucidados em outros estudos.

CONCLUSÕES

- * O extrato bruto e as frações apresentaram atividade depressora do SNC, apesar das frações não causarem incoordenação motora na dose que foram ativas.
- * A atividade analgésica do extrato bruto foi observada no modelo de algesia induzida pelo calor.
- * Os resultados sugerem a presença de compostos anticonvulsivantes nas frações 2FE e 2FH obtidas do extrato bruto hidroalcoólico de *Q. grandiflora* Mart. que necessitam de maiores investigações para isolamento dos compostos ativos e elucidação do mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKISUE, G.; OLIVEIRA, F. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 178p.

ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; LEITE, J.R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, 2(1): 3-5, 2003. Disponível em: <http://bilbo.edu.uy/~slf/index.html>. Acesso em: 23/12/2003.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA Jr.; A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95(3): 367-373, 2000.

BALTER-SERI, J.; YUHAS, Y.; NOFECH-MOZES, Y; KAMINSKY, E.; ASHKENAZI, S.
Role of nitric oxide in the enhancement of pentylentetrazole-induced seizures caused by
Shigella dysenteriae . **Infection and Immunity**, 67 (12): 6364-6368, 1999.

BERKSON, J. Why I prefer logits to probits. **Biometrics** 7:327,339, 1951.

BETTING, L.E.; KOBAYASHI, E.; MONTENEGRO, M.A.; MIN, L.L.; CENDES, F.;
GUERREIRO, M.M.; GUERREIRO, C.A.M. Treatment of epilepsy: consensus of the
Brazilian specialists. **Arq Neuro-Psiquiatr**, 61(4), 2003.

BROWNE, T.R., HOLMES, G.L. Epilepsy. **New Engl J Med**, 344: 1145–1151, 2001.

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

CARLINI, E.A., BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia
laboratorial e comparação entre o diazepam e clorobenzapam. **Rev Assoc Bras
Psiquiatr S Paulo**, 1:25-31, 1979.

CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. **Italian Journal of Neurological Science**, 16: 33-37, 1995.

CIOMS. **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Genebra, 1985.

COMMISSION ON LIFE SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academy Press , 1996, 140p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ed. Imprensa Nacional, 1926-1978. 6v.

CORREA, D.B. et. al. C-methyl phenolics from *Qualea* species. **Phytochemistry**, 20: 305-307, 1981.

COSTA, A.L.C. **Epilepsia e Gravidez** – Frequência de crises epiléticas na gestação e puerpério. Campinas, 2002. (Dissertação – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Médicas).

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Câncer Investigation**, 17(2): 153-163, 1999.

DEL-CLARO, K. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, 12:887-892, 1996.

DeLORENZO, R.J. Mechanisms of action of anticonvulsant drugs. **Epilepsia**, 29 (2):35-47, 1988.

DINIZ, I.R., MORAIS, H.C. Lepidopteran caterpillar fauna of cerrado host plants. **Biodiversity & Conservation**, 6: 817-836, 1997.

DUHAM, N.W.; MYIA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Amer Pharm Assoc**, 46: 208-209, 1957.

EL-ETRI, M.M.; ENNIS, M.; JIANG, M.; SHIMPLEY, M.T. Pilocarpine induced convulsions in rats: evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinergic seizure development. **Experimental Neurobiology**, 121: 24-39, 1993.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. 2002. Disponível em: <http://www.abc.org.br/~sferreira>. Acesso em: 25/06/2004.

FERRI, M.G. **Plantas do Brasil: Espécies do Cerrado**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 1969. 239p.

GILANI, A.H.; AZIZ, N.; KHAN, M.A.; SHAHEEN, F.; JABEEN, Q.; SIDDIQUI, B.S.; HERZIG, J.W. Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 71: 161-167, 2000.

GIORGI, O.; CARBONI, G.; FRAU,V.; ORLANDI, M.; VALENTINI, V.; FELDMAN, A.;
CORDA, M.G. Anticonvulsant effect of felbamate in the pentilenetetrazole kindling model
of epilepsy in rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 354:173-178, 1996.

GOLOUBKOVA, T.D.; HECKLER, E.; RATES, S.M.K.; HENRIQUES, J.A.P.; HENRIQUES,
A.T. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction
from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital.
Journal of Ethnopharmacology, 60:41-148, 1998.

HARDMAN, J. G.(Ed.); LIMBIRD, L.E. (Ed.). **Goodman & Gilman's: the
pharmacological basis of therapeutics.** 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148p.

HOSSEINZADEH, H.; PARVARDEH, S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the
major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. **Phytomedicine**, 11 (1): 56-64, 2004.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**, 12.ed., São Paulo: Companhia
Editora Nacional, 1998. 777p.

KANJANAPOTHI D.; PANTHONG A.; LETTPRASERTSUKE N.; TAESOTIKUL T.; RUJJANAWATE C.; KAEWPINIT D.; et al. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). **J Ethnopharmacol**, 90(2-3):359-65, 2004.

KRALL, R.L.; PENRY, J.K.; WHITE, B.G.; KUPFERBERG, H.J.; SWINYARD, E.A. Antiepileptic drug development: anticonvulsants drug screening. **Epilepsia**, 19: 409-428, 1978.

LEITE, J.P.; GARCIA-CAIRASCO, E.A.; CAVALHEIRO, E.A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research**, 50: 93-103, 2002.

LICHFIELD Jr., J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose effect experiments. **J Pharmacol Exp Ther**, 96:99-113, 1949.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 3.ed., v. 1, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 352p.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, 2: 145-181, 1988.

.....

LÖSCHER, W. Review: New visions in the pharmacology of anticonvulsant. **European Journal Pharmacology**, 342: 1-13, 1998.

LÖSCHER, W.; FIEDLER, M. The role of technical, biological, and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsants drugs. VII. Seasonal influences on anticonvulsants drug actions in mouse models of generalized seizures. **Epilepsy Research**, 38: 231-248, 2000.

LÖSCHER, W.; LEPIK, I.E. Critical re-evaluation of previous preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, 50 (1):17-20, 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, 50 (1):3-16, 2002.

MALMBERG, A.B.; BANNON, A.W. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. **Current Protocols in Neuroscience** 8.9.1-8.9.15, 1999.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**, Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 24-53.

MAZELLA, A.G.; OLIVEIRA, A. A. M.; SILVA, F.B.; CALDEIRA, T.T.O.; SERTIE, J.A.A. Atividade antiinflamatória tópica de *Cordia verbenacea* e sua toxicidade. In: VI Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 1991, Caxambu, MG. **Anais da VI reunião da FeSBE**, 1991. Resumo 06.33, p.284.

MENDES, J.A. **Distribuição espacial, fenologia e compartimentação mineral de três espécies de Qualea (Vochysiaceae) na Reserva Biológica de Moji-Guaçu-SP**. Rio Claro, 1996 (Tese – Doutorado – Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP – Instituto de Biociências).

MONFORTE, M.T.; TROVATO A.; ROSSITO A.; FORESTIERI A.M.; D'AQUINO, A.; MICELI, N.; GALATI, E.M. Anticonvulsant and sedative effects of *Salvadora pérsica* L. extracts. **Phytotherapy Research**, 16 (4): 395-7, 2002.

MOSHÉ, S.L. Mechanisms of action of anticonvulsant agents. **Neurology** 55(1): S32-S40, 2000.

MYCEK, M.J.; HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. **Farmacologia Ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998-2001. 478p.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**, 2.ed., SP:Atheneu, 1998, 178p.

OLIVEIRA, P.S. et al. Ant foraging on extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential antiherbivore agents. **Oecologia** 74(2): 228-230, 1987.

OLNEY, J.W.; de GUBAREFF, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**: 301(10): 520-522 1983.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - Organização Mundial da Saúde (ONU): **Relatório Sobre a Saúde Mental no Mundo IV** (World Health Report – WHO) - Genève Swiss, 2001. Disponível em: www.psiqweb.med.br/acad/oms1.html. Acesso em: 25/06/2004.

PAGE, C.P.; CURTIS, M. J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. B. **Farmacologia Integrada**. Sao Paulo: Manole, 1999. 606p.

RAZA, M.; SHAHEEN, F.; CHOUDHARY, M.I.; SURIA, A.; RAHMAN, A.U.; SOMBATI DELORENZO, R.J. Anticonvulsant activities of the FS-1 subfraction isolated from roots of *Delphinium denudatum*. **Phytotherapy Research**, 15 (5): 426-30, 2001.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372p.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia** 25 (1): 102-123, 2001.

SILVA, L.O.; COSTA, D.A.; SANTO FILHO, KE; FERREIRA, HD; BRANDÃO, D. Levantamento florístico e fitossociológico em duas áreas de cerrado. **Acta Botânica Brasilica** 16(1): 43-53 2002.

SIQUEIRA, M.F.; PETERSON, A.T. Consequences of global climate change for geographic distributions of cerrado tree species. **Biota Neotropica** 3 (2), 2003.

SWINYARD, E.A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods. **Epilepsia** 10: 107-119, 1969.

SWINYARD, E.A.; KUPFERBERG, H.J. Antiepileptic drugs: detection, quantification and evaluation. **Federation Proceedings** 44 (10): 2629-2633, 1988.

SWINYARD, E.A.; WOODHEAD, J.H.; WHITE, H.S.; FRANKLIN, M.R. Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. In: **Antiepileptic drugs**. 3.ed. edited by R. Levy, R. Mattson, B. Meldrum, J.K. Dreifuss. New York: Raven Press Ltda., 1989. p.85-102.

TURSKI, W.A. Pilocarpine-induced seizures in rodents 17 years on. **Pol J Pharmacol** 52(1):63-5, 2000.

WANG, H.; LIAO, J.; CHEN, C. Anticonvulsant effect of water extract of *Scutellariae radix* in mice. **Journal of ethnopharmacology** 73:185-190, 2000.

WILLIANSON, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. **Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. Chichester: John Wiley & Sons., 1996. 228p. v.1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Epilepsy: scientific and medical advances.** Geneva: WHO, 2001a (Fact sheet 167). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/fact sheet>. Acesso em: 25/06/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epilepsy: historical overview.** Geneva: WHO, 2001b (Fact sheet 168). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/fact sheet>. Acesso em: 25/06/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO launches the first global strategy or traditional and alternative medicine.** Geneva: WHO, 2002 (Press Release WHO, 38). Disponível em: <http://www.who.int/inf/en/pr-2002-38.html>. Acesso em: 25/06/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **New WHO guidelines to promote proper use in alternative medicines.** Geneva: WHO, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/releases>. Acesso em: 25/06/2004.
