

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ELISABETH MARIA ROCHA DE ALBUQUERQUE LUCIO**  
ENGENHEIRA QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO  
DE ALCALÓIDE SECUNDÁRIO DE  
*Pilocarpus microphyllus* STAPF.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de Doutor  
em Ciências - Área de Farmacologia.

**Piracicaba - SP  
1999**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

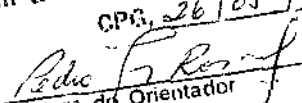
**ELISABETH MARIA ROCHA DE ALBUQUERQUE LUCIO**  
ENGENHEIRA QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO  
DE ALCALÓIDE SECUNDÁRIO DE  
*Pilocarpus microphyllus* STAPP.**

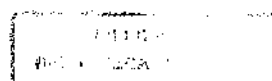
Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de Doutor  
em Ciências - Área de Farmacologia.

Orientador Prof. Dr. Pedro L. Rosalen  
FOP – UNICAMP.

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83  
CPG, 26/05/99

  
Assinatura do Orientador

**Piracicaba - SP  
1999**



9913806

UNIDADE	BC
Nº DE REGISTRO	
Nº DE REGISTRO	38089
DATA DE REGISTRO	29/99
Nº DE REGISTRO	R411, CO
DATA DE REGISTRO	20/07/99
Nº DE REGISTRO	

CM-00125674-0

### Ficha Catalográfica

L963e Lucio, Elisabeth Maria Rocha de Albuquerque.  
 Estudo químico e farmacológico de alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. / Elisabeth Maria Rocha de Albuquerque Lucio. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.  
 143p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Pedro L. Rosalen.  
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Espectroscopia de infravermelho. 2. Ressonância magnética nuclear. 3. Toxicologia. 4. Farmacologia. I. Rosalen, Pedro L. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

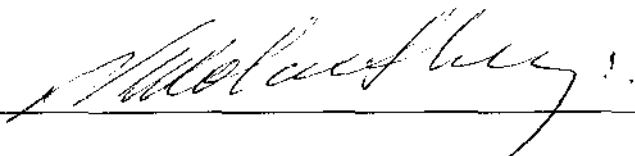


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 11 de Fevereiro de 1999, considerou a candidata ELISABETH MARIA ROCHA DE ALBUQUERQUE LUCIO aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN 

2. Prof. Dr. NIKOLAI SHARAPIN 

3. Prof. Dr. LEANDRO MACHADO ROCHA 

4. Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO 

5. Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE 

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **PAULO** e **LUCI**  
meu eterno agradecimento pela confiança e por minha formação.

Aos meus irmãos, **ANTÔNIO** (*in memoriam*), **LÚCIA**,  
**PAULO JOSÉ** e **PATRÍCIA**, pelo muito que têm feito  
por mim.

Aos meus filhos **BRUNO** e **NATALIE**, mais uma  
vez pelo sacrifício exigido e pela felicidade de  
estarem galgando seus próprios caminhos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **PEDRO L. ROSALEN**  
pelos ensinamentos e pela orientação  
segura e amiga.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **NIKOLAI SHARAPIN**,  
por me ensinar a amar a fitoquímica,  
e pela confiança na realização deste  
trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS , por meio do Reitor: HERMANO DE MEDEIROS FERREIRA TAVARES;

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA (FOP – UNICAMP), por meio do Diretor: ANTÔNIO WILSON SALLUM;

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP, por meio de seu Chefe de Departamento: MARIA CRISTINA VOLPATO;

À Coordenação Geral dos Cursos de Pós – Graduação da FOP, por meio de sua coordenadora ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY;

Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) pela bolsa concedida;

Aos DOCENTES DO CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - UNICAMP, pela convivência, incentivo e amizade;

Ao Prof. Dr. THALES ROCHA DE M. FILHO, pela amizade e confiança na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. FRANCISCO C. GROppo, pela convivência e amizade;

Ao Prof. Dr. JOÃO JOSÉ LEONEL, pela confiança e incentivo;

As amigas MÍRIAM ELIZABETH, ELISABETE MÍRIAM, MARIA DAS GRAÇAS, pelo estímulo e companheirismo durante o curso;

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia da FOP - UNICAMP ADEMIR MARIANO E JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, pela atenção dispensada;

À MARIA ELISA DOS SANTOS, secretária da Área de Farmacologia, pela amizade, competência e dedicação em todos os momentos;

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. ALBA DE SOUZA BRITO, pela possibilidade de utilização das dependências do Laboratório de Fisiologia da UNICAMP, na elaboração do teste de Malone e DL<sub>50</sub> do presente trabalho;



## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA, pelo auxílio na realização da parte farmacológica deste trabalho;

Aos Farmacêuticos JULIANO DE SOUZA GRACIOSO E ELIETE JANAÍNA BUENO BIGHETTO, pela colaboração no desenvolvimento da parte farmacológica deste trabalho;

As Bibliotecas da UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – FOP E INSTITUTO DE QUÍMICA, pelo levantamento da literatura presente neste trabalho;

Ao Farmacêutico CARLOS ANDRÉ D. FERNANDES, pelo auxílio na realização do processo de extração, pela amizade e companheirismo;

À UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE – UFF, pelo apoio fornecido ao longo desta jornada;

Ao INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, por meio da Diretora: LEONOR REISE DE ALMEIDA;

Ao Departamento de Química Geral e Inorgânica da UFF, por meio do seu Chefe PAULO ROBERTO MATHIAS pela amizade, apoio e confiança na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. LEANDRO MACHADO ROCHA, pelo auxílio na parte de identificação química deste trabalho;

Ao Dr. AILTON JOSÉ REBELO, Gerente do Departamento de Desenvolvimento e Controle de Qualidade do Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. pelo apoio financeiro e incentivo;

À PHYTOSUL PRODUTOS NATURAIS Ltda, por meio dos Srs. MARCELLO BURCHIANTI E FRANCISCO J. FALCÃO DE ANDRADE pelo apoio financeiro e incentivo;

À ERIC ALBUQUERQUE PENA, pelo carinho e pela ajuda;

Ao meu irmão PAULO JOSÉ ROCHA DE ALBUQUERQUE, pelo carinho, pela ajuda e companheirismo constante;

## AGRADECIMENTOS

À CARMEM LÚCIA S. R. ROCHA DE ALBUQUERQUE, pela correção inicial do texto.

## SUMÁRIO

	p.
<b>LISTAS</b> .....	
Lista de Tabelas e Figuras .....	1
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	5
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>SUMMARY</b> .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1. História e Etimologia do Jaborandi.....	13
2.1.1. Classificação Botânica do Jaborandi.....	15
2.1.2. Importância Econômica.....	18
2.1.2.1. Matéria – Prima.....	18
2.1.2.2. Relação da Região de Ocorrência das Folhas de Jaborandi.....	19
2.2. A Química do Jaborandi.....	23
2.2.1. Isolamento da Pilocarpina.....	25
2.2.2. Isomerismo da Pilocarpina e Isopilocarpina.....	26
2.2.3. Propriedades Físicas e Físico-Químicas.....	29
2.2.4. Reações Coloridas e de Precipitação.....	29
2.2.5. Alcalóides Secundários.....	30
2.2.5.1. Propriedades Físicas e Físico-Químicas.....	32
2.2.5.2. Estereoquímica.....	32
2.2.6. Processos Industriais para Obtenção e Determinação da Pilocarpina.....	34

	p.
2.2.6.1. Processos de Extração.....	34
2.2.6.2. Processo de Purificação.....	35
2.2.6.3. Determinação de Alcalóides Totais.....	36
2.2.6.4. Determinação de Cloridrato e Nitrato de Pilocarpina.....	37
<b>2.3. Farmacologia dos Alcalóides do <i>Pilocarpus</i>.....</b>	<b>39</b>
2.3.1. Introdução do Jaborandi na Terapêutica – Histórico.....	39
2.3.2. Relação Estrutura/Atividade.....	41
2.3.3. Propriedades Farmacológicas.....	44
2.3.3.1. Músculo Liso.....	44
2.3.3.2. Sistema Ocular.....	44
2.3.3.3. Glândulas Exócrinas.....	47
2.3.3.4. Sistema Cardiovascular.....	48
2.3.3.5. Sistema Nervoso Central.....	48
2.3.4. Toxicologia.....	49
2.3.5. Preparações.....	50
2.3.6. Usos Terapêuticos.....	50
<b>3. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1. Matéria – Prima Vegetal – Folhas de Jaborandi.....	55
4.2. Teste em Cromatografia de Camada Delgada .....	59
4.3. Processo de Extração e Purificação do Alcalóide Secundário.....	59
4.4. Obtenção do Cloridrato do Alcalóide Secundário.....	60
4.5. Identificação Química do Cloridrato do Alcalóide Secundário.....	63
4.6. Animais.....	64

	p.
4.7. Determinação da Dose Letal (DL <sub>50</sub> ).....	65
4.8. Determinação do Peso Corporal.....	66
4.9. Avaliação ou “Screening” Hipocrático.....	66
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
5.1. Identificação Química do Alcalóide Secundário.....	69
5.1. 1.Determinação de Alcalóides Totais (A.T.).....	69
5.1.2. Faixa de Fusão.(P.F.) .....	73
5.1.3. Infravermelho (I.V.).....	73
5.1.4. Ressonância Magnética Nuclear (R.M.N.).....	77
5.2. Dose Letal (DL <sub>50</sub> ) e Efeitos Farmacológicos do Padrão de Cloridrato de Pilocarpina e Alcalóide Secundário.....	85
5.2.1. Dose Letal (DL <sub>50</sub> ).....	85
5.2.2. Determinação do Peso Corporal .....	86
5.2.3. Avaliação ou “Screening” Hipocrático.....	88
<b>6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>99</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>113</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>116</b>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	p.
Figura 1: Regiões de ocorrência das folhas de jaborandi.....	22
Figura 2: Alcalóides imidazólicos isolados da espécie de <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf.....	24
Figura 3: Reação de degradação da pilocarpina. I. pilocarpina, II. isopilocarpina, III. ac. pilocárpico IV. ac. Isopilo- cárpico. Reações de E = epimerização; e H = hidrólise.....	28
Figura 4: Relação espacial entre a Acetilcolina e Pilocarpina.....	43
Figura 5: Câmara anterior do olho, mostrando a via para secreção e drenagem do humor aquoso.....	46
Figura 6. Fluxograma da determinação de alcalóides totais.....	58
Figura 7. Fluxograma do processo de extração, purificação e obtenção do alcalóide secundário.....	62
Tabela 1. Alcalóides totais e relação entre os teores de pilocarpina e alcalóide secundário (C.C.D.) de folhas provenientes de diversas regiões de ocorrência.....	70
Figura 8: Cromatografia em camada delgada. A e B- amostra do extrato de <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf. (duplicata) provenientes das folhas procedentes da Represa da Boa Esperança; P- padrão de cloridrato pilocarpina.....	72
Tabela 2: Resultado das comparações das faixas de fusão em °C entre os dados da literatura e os obtidos para o alcalóide secundário extraído e o padrão de cloridrato de pilocar- pina.....	73

Tabela 3. Comparação entre as frequências ( $\text{cm}^{-1}$ ) do padrão de cloridrato de pilocarpina, pilosina (lit.) e o alcalóide secundário extraído.....	74
Figura 9: Espectro de I.V. do padrão de cloridrato de pilocarpina.....	75
Figura 10. Espectro de I.V. da pilosina (Voigtländer & Rosenberg, 1959; Tedeschi et al., 1974.....	75
Figura 11: Espectro de I.V. do alcalóide secundário extraído.....	76
Tabela 4: Resultado das comparações da ressonância magnética nuclear protônica ( $^1\text{H}$ ) e carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) entre os dados da literatura para o padrão de cloridrato pilocarpina, a epiisopilosina e o alcalóide secundário extraído.....	77
Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ) do padrão de cloridrato de pilocarpina.....	80
Figura 13: Espectro de ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ) do alcalóide secundário extraído.....	81
Figura 14: Espectro de ressonância magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ ) do padrão de cloridrato de pilocarpina.....	82
Figura 15: Espectro de ressonância magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ ) do alcalóide secundário.....	83
Figura 16: Espectro de ressonância magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ ) do alcalóide secundário (DEPT).....	84
Tabela 5. Valores de Dose letal 50% ( $\text{DL}_{50}$ ), expressos em mg/kg de peso corporal, via intraperitonal, erro padrão (ep), equação da reta e o intervalo de confiança (95%) do padrão de cloridrato de pilocarpina e o alcalóide secundário extraído.....	85

Tabela 6. Ganho de peso médio (g) (desvio padrão) dos grupos experimentais que receberam o padrão de cloridrato de pilocarpina e A.S. extraído, após 14 dias de experimento.....	87
Tabela 7. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – atividade geral.....	92
Tabela 8. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular.....	93
Tabela 9. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screenig” – atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular.....	94
Tabela 10. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – reflexos.....	95
Tabela 11. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – SNC.....	96
Tabela 12. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – SNA.....	97



Tabela 13. Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e o alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening”- SNA.....	98
Anexo 1. Folhas secas de <i>Pilocarpus microphyllus</i> Satpf.....	113
Anexo 2. Tabelas do número de animais mortos em função das doses utilizadas para cada um dos grupos contendo cloridrato de pilocarpina e o alcalóide secundário no estudo da Dose Letal 50% (via intraperitoneal).....	114
Anexo 3. Tabela do teste de toxicidade em camundongos (“screening” Hipocrático).....	115

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA = análise de variância

Apud = em

A.S. = alcalóide secundário

A.T. = alcalóide total

C.C.D. = cromatografia em camada delgada

cm = centímetro

C = O = carbonila

<sup>13</sup>C = carbono-13

C.L.A.E. = cromatografia líquida de alta eficiência

DL<sub>50</sub> = dose letal em 50% da população

DMSO = dimetil sulfóxido

et al. = e outros (abreviatura de “et alii”)

exp. = experimental

EUR. PH. = European Pharmacopoeia

F. BRAS. = Farmacopéia Brasileira

fam. = família

g = grama

<sup>1</sup>H = próton

HPLC = “high-performance liquid chromatographic”

I.R. = infravermelho

i.p. = intraperitoneal

J = constante de acoplamento

JMP versão 3.1 = Jump versão 3.1 para Windows

lit. = literatura

ml = mililitro

min = minuto

mg = miligrama

mg/kg = miligrama por kilograma

ml/kg = mililitro por kilograma

mmHg = milímetros de mercúrio

N = normalidade

nm = nanometro

op. cit. = obra citada ( abreviatura de “opus citatum”)

P.F. = ponto de fusão

R.M.N. = ressonância magnética nuclear

RP-18 = fase reversa octadecil

Ref. = referência

RF = fator de referência

sp = espécie

s.p.f. = "specific pathogen free" = livre de patógenos específicos

s.c. = subcutânea

USP = The United States Pharmacopoeia

U.V. = ultra-violeta

μl = microlitro

μg/kg = micrograma por kilograma

δ = deslocamento químico

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e determinar a estrutura química do alcalóide secundário de maior concentração encontrado no *Pilocarpus microphyllus* Stapf (jaborandi) e seus efeitos farmacológicos. As folhas de jaborandi foram coletadas de 7 regiões dos Estados Brasileiros Maranhão (MA) e Piauí (PI) (Nordeste), onde o teor de pilocarpina é baixo e o de alcalóide secundário é alto. Os alcalóides dessas folhas foram extraídos segundo descrito por Lucio et al., 1997. A estrutura do cloridrato de alcalóide secundário - AS puro foi determinada por faixa de fusão, espectrometria no infravermelho e R.M.N. protônica e carbono-13. O alcalóide secundário foi submetido a testes farmacológicos utilizando camundongos (*Mus musculus* SPF) para determinação da DL<sub>50</sub> calculados pelo método Litchfield & Wilcoxon (1949), determinação do peso corporal dos animais sobreviventes da DL<sub>50</sub> e a avaliação ou "screening" Hipocrático. As melhores folhas de jaborandi com mais alta porcentagem de A.S. foram encontradas na Represa da Boa Esperança [entre Uruçuí (PI) e Benedito Leite (MA)], a qual mostrou baixa porcentagem de pilocarpina e alta porcentagem de alcalóides secundários pela determinação de alcalóides totais (% A.T. = 0,61; Pilocarpina/AS = 20/80). A faixa de fusão para o AS base (184<sup>o</sup> C – 186<sup>o</sup> C). As frequências de absorção obtidos no espectro de IV para o AS apresentaram uma banda de estiramento OH (3117 cm<sup>-1</sup>) e o valor da frequência obtido para C=O foi 1750 cm<sup>-1</sup>. Os valores de RMN de <sup>1</sup>H e carbono-13 para o AS apresentaram 16 sinais de carbono e deslocamento químico para os grupos CHOH (δ 5,20) e anel fenil (δ 7,36). Esses dados levam a sugerir a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para o AS. O espectro de (<sup>1</sup>H) RMN do AS mostrou semelhança com o espectro da epiisopilosina encontrado na literatura. O valor de DL<sub>50</sub> para o cloridrato de pilocarpina foi de 253,2 mg/kg, e para o cloridrato de AS foi de 540,9 mg/kg. Todos os animais que sobreviveram a determinação da DL<sub>50</sub> ganharam em peso no período de 14 dias de observação, e nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos que receberam o cloridrato de pilocarpina e o AS. Na avaliação ou "screening" Hipocrático o AS demonstrou ser um estimulante periférico do sistema nervoso parassimpático, semelhante a pilocarpina, porém somente em altas doses. Provavelmente isto pode estar relacionado com o tamanho do grupo substituinte do AS que talvez cause um impedimento estérico na ligação droga-receptor. *Concluimos que o AS das folhas do jaborandi provenientes da Represa da Boa Esperança [entre Uruçuí (PI) e Benedito Leite (MA)] é a epiisopilosina a qual apresentou menor toxicidade que a pilocarpina.*

**.PALAVRAS-CHAVE:** *Pilocarpus microphyllus* Stapf., jaborandi, cloridrato de pilocarpina, epiisopilosina, toxicologia, efeitos farmacológicos, infravermelho, R.M.N. <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

## SUMMARY

Chemical and Pharmacological study of the secondary alkaloid of *Pilocarpus microphyllus* Stapf.

The aim of this study was to identify and determine the chemical structure of the secondary alkaloid in the highest product found in the *Pilocarpus microphyllus* Stapf (jaborandi) and its pharmacological effects. The leaves of jaborandi were collected from 7 regions of the Brazilian states of Maranhão (MA) and Piauí (PI) (Northwest) where the level of pilocarpine is low and the level of the second alkaloid is high. The alkaloids were extracted as described by Lucio et al., 1997. The structure of the purified-secondary-hydrochloride alkaloid (SA) was determined by fusion range, infrared absorption spectra (IR) and nuclear magnetic resonance NMR proton and carbon-13. The SA was submitted to pharmacological test by using mice (*Mus musculus*, SPF) to determine: DL<sub>50</sub> by Litchfield & Wilcoxon (1949) methods, gain of body weight of the surviving animals from DL<sub>50</sub> and hippocratic screen. The best leaves of jaborandi with the highest percentage of SA were found in Represa da Boa Esperança [between Uruçuí (PI) and Benedito Leite (MA)], which showed low percentage of pilocarpine and high percentage of SA by determination of total alkaloids (TA) (%TA= 0,61%; Pilocarpine/SA= 20/80). The fusion range for the SA base was 184 - 186 °C. The frequencies of absorption found in the spectra of IR to the SA showed an assignment of stretching of OH (3117 cm<sup>-1</sup>), and the value of the frequency for C=O was 1750 cm<sup>-1</sup>. The NMR values of <sup>1</sup>H and carbon-13 for the SA presented 16 signs of carbon and the chemical shift for groups CHOH (δ 5,20), and ring fenil (δ 7,36). These data suggest that the molecular formula for the SA is C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Moreover, the spectra of (<sup>1</sup>H) NMR of the SA showed similarity to the epiisopilosine spectra found in the literature. The value of DL<sub>50</sub> for the hydrochloride pilocarpine was 253,2mg/kg and for the secondary hydrochloride alkaloid was 540,9 mg/kg. All the animals that survived from DL<sub>50</sub> determination gained weight during fourteen days of observations and no difference was found between the pilocarpine and SA groups. In the hippocratic screen, the SA group showed effects as peripheral-stimulant of the parasympathetic nervous system, such as pilocarpine but only in high doses. Probably this could be related to the size of the replacing group of the SA, which probably causes a sterically hinder on the drug-receptor connection. *Concluding that the SA leaves of the jaborandi from Represa da Boa Esperança [between Uruçuí (PI) and Benedito Leite (MA)] is epiisopilosine, and showed lower toxicity when compared with pilocarpine.*

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pilocarpus* (fam. Rutaceae) compreende 13 espécies neotropicais, espalhadas na região situada entre os trópicos de Câncer e Capricórnio. No Brasil são encontradas 9 espécies, que recebem a designação geral de "jaborandi", utilizado em medicina popular para tratamento de várias doenças (COSTA<sup>13</sup>, 1967). A pilocarpina é o alcalóide principal de várias espécies do gênero, entre elas a *Pilocarpus microphyllus*, a *Pilocarpus jaborandi*, a *P. trachylopus* e a *P. pennatifolius* (BENIGNI et al.<sup>18</sup>, 1964).

A principal fonte de pilocarpina é a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf. A pilocarpina é quimicamente o 3 – etil - dihidro - 4- [1- metilimidazol-5-il]- metil - 2- 3(H)- furanona.

A pilocarpina é clinicamente utilizada para relaxamento intestinal após laparotomia (TSURUMI et al.<sup>161</sup>, 1979) e em xerostomia pós-radiação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Em 1994 a U.S. Food and Drug Administration (F.D.A.) aprovou-a para este uso (GREENSPAN & DANIELS<sup>54</sup>, 1987; WYNN<sup>180</sup>, 1996; TAYLOR & HASHIMI<sup>157</sup>, 1996; LOCKHART et al.<sup>79</sup>, 1996; GARG & MALO<sup>47</sup>, 1997; GUCHELAAR et al.<sup>56</sup>, 1997; PINHEIRO<sup>115</sup>, 1997) e seu maior emprego terapêutico é no tratamento do glaucoma de ângulo aberto e secundário (MONTEIRO et al.<sup>95</sup>, 1982; OLIVALVES et al.<sup>108</sup>, 1989; PUUSTJARVI & REPO<sup>130</sup>, 1992; OLIVEIRA & BETINJANE<sup>109</sup>, 1992; NYMAN<sup>106</sup>, 1993; ZADOK et al.<sup>182</sup>, 1994; TANIGUCHI & KITAZAWA<sup>156</sup>, 1994; ROBIN<sup>137</sup>, 1996).

A fração alcaloídica de *P. microphyllus* contém vários alcalóides secundários, como: isopilocarpina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978; MAAT & BEYERMAN<sup>85</sup>, 1983).

A pilocarpina é um estimulante periférico do sistema parassimpático, possuindo diversas ações características aos análogos e derivados da colina e sua ação é antagonizada pela atropina (ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982).

O isômero de pilocarpina, a isopilocarpina, é inativo como miótico e farmacologicamente menos ativa que a pilocarpina. Outros alcalóides secundários, presentes nas folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. em menores quantidades, possuem atividades colinérgicas qualitativa e quantitativamente inferiores quando comparados com análogos sintéticos (ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982).

A pilocarpina é produzida no país em escala industrial, e toda a matéria-prima para extração de pilocarpina provém de plantas nativas dos Estados do Maranhão, Piauí, Pará e Tocantins. Todo material proveniente dessas áreas foi identificado botanicamente como *Pilocarpus microphyllus* Stapf; entretanto, a composição química e o teor de alcalóides apresentou variações significativas.

Os estudos químicos que elucidaram as estruturas dos alcalóides secundários do jaborandi se basearam em folhas provenientes do litoral do Estado do Maranhão, tendo sido realizados na primeira metade deste século. Porém, o jaborandi procedente de outras áreas de ocorrência, como: Barra do Corda, Grajaú, Butiricupú e Arame, todas procedentes do Estado do Maranhão, descobertas mais tarde em função do interesse industrial, não foi investigado quimicamente, visto que nos dias de hoje a produção de pilocarpina constitui virtual monopólio de uma empresa de capital transnacional, que não se interessa pelo desenvolvimento de estudos relacionados aos alcalóides secundários da planta.

Entretanto, o padrão cromatográfico de extratos obtidos do material proveniente destas áreas difere substancialmente do obtido nas folhas

procedentes do litoral do Estado do Maranhão. Em algumas dessas áreas o teor<sup>1</sup> de pilocarpina é extremamente baixo, aumentando a proporção dos alcalóides secundários e estes aspectos têm atraído a atenção do nosso grupo de pesquisa.

Devido ao conhecimento limitado da química dos alcalóides secundários e à inexistência de padrões comerciais dos mesmos, este trabalho tem por objetivo geral: *identificar e determinar a estrutura química do alcalóide secundário de maior rendimento encontrado no Pilocarpus microphyllus Stapf., procedentes de diversas regiões de ocorrência, e verificar o seu efeito farmacológico.*

---

<sup>1</sup> Pesquisa realizada pela autora, em trabalho no laboratório de fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP, 1990-1995)





## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão é composta de três partes, primeiramente aborda os aspectos históricos e etimológicos do jaborandi, a classificação botânica e a sua importância econômica; secundariamente, apresenta uma revisão da química dos alcalóides de *Pilocarpus microphyllus* Stapf., e finalmente revisa os aspectos farmacológicos destes alcalóides.

### 2.1. História e Etimologia do Jaborandi

Existe uma grande dúvida no que diz respeito ao estudo da origem do nome jaborandi. Muitos estudiosos se empenharam em encontrar o sentido verdadeiro desta palavra; entre eles se destaca o trabalho de **HOLMSTEDT**<sup>60</sup> em 1979, que elaborou uma pesquisa completa sobre a origem do nome e sobre o histórico das espécies de *Pilocarpus* conhecidas por jaborandi. Segundo esse trabalho, Sampaio (1918) sugeriu uma explicação para a origem do nome jaborandi como sendo derivado de *ya-mbo-r-endi*, significando "que faz babar". **CORRÊA**<sup>33</sup>, em 1984, refere-se a *ia-mbor-endi*, como jaborandi legítimo, sem dar-lhe, no entanto, a tradução para o português. Há ainda a tentativa de explicar a palavra jaborandi como *ia-guar-endy* (baba de jaguar). No entanto, de acordo com Afrânio do Amaral, que muitos anos esteve em contato com os índios que falam a língua *Neegatú*, o fitônimo *iaborandy* não deve ser confundido com o zoônimo *iaguarundy/jaguarundi*. Segundo esse pesquisador, o significado do termo *ja* (*ja* ou *ia*) como uma partícula pronomial indicando o sujeito *-bu/bo* (*mbo*), um prefixo verbal indicando transitividade (*-r*) como letra eufônica e *andi* (*endy*), significa salivação. Em resumo: "que faz babar" ou "que faz salivar", o

que muito bem traduz esta propriedade característica da planta (ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

As primeiras referências na literatura a respeito do jaborandi datam dos séculos XVI e XVII. Nos século XVI estão as citações do português Gabriel Soares de Sousa e no século XVII, as do médico holandês Guilherme Piso e do alemão George Marcgrave (PINHEIRO<sup>115</sup>, 1997).

O colonizador português Soares de Souza, enviado ao Brasil na segunda metade do século XVI, permaneceu como senhor de engenho na Bahia durante 17 anos, relata numa publicação o valor do jaborandi na cura de úlcera da boca (PINHEIRO<sup>115</sup>, 1997).

Guilherme Piso, médico residente que integrou a missão científica trazida ao Brasil por volta de 1637 pelo, Príncipe Maurício de Nassau, descreveu, nos oito anos que aqui permaneceu, diversas plantas medicinais utilizadas pelos índios e, entre elas, o fumo, a ipecacuanha e o jaborandi. Escreveu um trabalho intitulado “Do jaborandi suas Propriedades e Usos” onde descreveu duas espécies vegetais que eram conhecidas pelos índios como *iaborandi*. Nesse trabalho ele relata como um índio foi curado de envenenamento por meio da transpiração e micção induzidas pela ingestão de uma bebida preparada à base de raízes frescas e maceradas de jaborandi. Além disso, muitas vezes menciona o jaborandi no tratamento de oftalmites, espasmos, doenças catarrais e envenenamento ( ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

O alemão Marcgrave é citado como outro estudioso ligado à história do jaborandi. Foi convidado a juntar-se à missão científica holandesa no Brasil, em 1648. Passou 6 anos estudando especialmente a região costeira compreendida entre o Rio Grande do Norte e Pernambuco (ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

No trabalho de Marcgrave estão ilustradas algumas espécies de jaborandi, indicando o uso de suas raízes maceradas em água para a cura de gonorréia e cálculos urinários (PINHEIRO<sup>115</sup>, 1997).

### 2.1.1. Classificação Botânica do Jaborandi

Jaborandi é o nome popular que designa diversas espécies do gênero *Pilocarpus*, da família das Rutáceas, que compreende treze espécies: *Pilocarpus microphyllus*, *Pilocarpus trachylophus*, *Pilocarpus pennatifolius*, *Pilocarpus jaborandi*, *Pilocarpus spicatus*, *Pilocarpus pauciflorus*, *Pilocarpus racemosus*, *Pilocarpus giganteus*, *Pilocarpus grandiflorus*, *Pilocarpus goudotianus*, *Pilocarpus peruvianus*, *Pilocarpus riedelianus* e *Pilocarpus demerarae* (KAASTRA<sup>67</sup>, 1982). As principais espécies officinais e as mais procuradas pela indústria química, em virtude da maior riqueza de alcalóides, que hoje apresentam valor econômico, são o jaborandi do Maranhão, que provém do *Pilocarpus microphyllus* Stapf., cuja ocorrência se limita aos Estados do Maranhão e áreas adjacentes dos Estados do Pará, Tocantins, Piauí, e o jaborandi do Rio ou do Paraguai, que provém do *Pilocarpus pennatifolius* Lem, tendo origem na flora do sul do Brasil e Paraguai (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

Nem todas as espécies até então conhecidas foram estudadas quimicamente, apenas algumas delas foram submetidas à investigação química, devido ao seu valor econômico já mencionado anteriormente.

São arbustos ou árvores pequenas de 1,5 a 3 metros, com variações nos tipos de folhas ramificadas (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

***Pilocarpus trachylophus* Holmes** (jaborandi do Ceará): esta espécie foi exportada para a Europa em 1894. Dela Paul e Cownley isolaram 0,02% de nitrato de um alcalóide cristalino. Petit também obteve 0,1% deste nitrato

cristalino. Porém não se sabe se a base era pilocarpina. As folhas são bem menores que a do *P. jaborandi*; oblongas ou elípticas, ambas as superfícies apresentam pêlo, especialmente abundante na superfície (BENIGNI et al.<sup>18</sup>, 1964; MORTON<sup>97</sup>, 1979).

*Pilocarpus spicatus* Saint Hillaire, subespécie aracatensis (jaborandi do Aracati): foi exportado para a Inglaterra em 1895 e, segundo Paul e Cownley (1896), suas folhas continham 0,16% de alcalóides. Não foi relatado, nessa espécie, o isolamento de pilocarpina (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

*P. microphyllus* Stapf. (jaborandi do Maranhão) foi exportado pela primeira vez para Liverpool em 1893. Apresenta folhas imparipinuladas, ligeiramente pubescentes, com quatro a cinco pares de folíolos, às vezes reduzidos ao terminal. Os folíolos de reduzidas dimensões (1,5 a 5 cm de comprimento por 1 a 3 cm de largura) justificam a denominação de jaborandi de folhas pequenas. Cor verde pálida, acinzentada ou amarelada; por transparência notam-se pontuações claras correspondentes às bolsas secretoras de essência. Cheiro levemente aromático, revelado depois de esmagamento entre os dedos. Sabor amargo, aromático, mas depois de mastigado ocorre salivação abundante (COSTA<sup>34</sup>, 1967) (Anexo 1). Além de pilocarpina e isopilosina, foi isolado inicialmente por PYMAN<sup>131</sup> (1912) a pilosina que VÖIGTLANDER & ROSENBERG<sup>171</sup> (1959) chamaram de isopilosina.

*Pilocarpus jaborandi* Holmes (jaborandi de Pernambuco): foi estudado por TEDESCHI et al.<sup>158</sup> (1973) que registraram o isolamento dos alcalóides secundários: pilosina, isopilosina e epiisopilosina de suas folhas; essa espécie possui também pilocarpina. Possui folhas simples ou imparipinuladas, com 1 a 4 pares de folíolos. Pubescentes nas nervuras salientes. Difere do *P. microphyllus* Stapf. pelos folíolos maiores, 9 a 16cm de comprimento por 2,5 a 6 cm de largura. Enervação análoga à do *P. microphyllus* Stapf. Por transparência notam-

se pontuações claras que correspondem às glândulas secretoras de essência (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

*Pilocarpus racemosus* Vahl. (jaborandi do Guadalupe): Rocher isolou, em 1898, 0,6% de pilocarpina das folhas desta planta (KAASTRA<sup>67</sup>, 1982).

*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire (jaborandi do Paraguai): foi exportada para a Europa por Balansa que, juntamente com o botânico paraguaio Parodi, observaram a utilização médica no Paraguai (KAASTRA<sup>67</sup>, 1982). Foi cultivada na Sicília e nela foi encontrada a pilocarpina, porém em baixo teor (IMBESI<sup>61</sup>, 1944). Também apresenta folhas imparipinuladas de pecíolos grandes, nodosos nas articulações, folíolos grandes (7 a 12 cm de comprimento por 2 a 5 cm de largura) (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

*Pilocarpus organensis* Rizzini: foi descrita em 1974. KAASTRA<sup>67</sup> (1982) afirma ser a mesma espécie descrita como *Pilocarpus pauciflorus* Saint Hillaire. Desse material foi isolado um alcalóide, diferente estruturalmente dos outros, até então isolados do *Pilocarpus*. Esse alcalóide possui núcleo indólico ao invés de imidazólico e foi denominado O-metil-bufotenina (MAAT & BEYERMAN<sup>85</sup>, 1983).

*Pilocarpus giganteus* Engler: é mencionado por Draggendorff (1898); em que, segundo ele, é duvidosa a presença de pilocarpina (ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

## 2.1.2. Importância Econômica

### 2.1.2.1. Matéria – Prima

O Brasil é o único produtor de pilocarpina do mundo. Produz e exporta anualmente cerca de 10 toneladas de sais de pilocarpina, dados fornecidos pelo DECEX<sup>1</sup> (1994).

A produção de pilocarpina baseia-se no extrativismo. Segundo informações não-oficiais, o Estado do Maranhão teria capacidade de fornecer anualmente cerca de 3000 toneladas de folhas secas de *P. microphyllus*.

As folhas de *P. microphyllus* eram até o final da década de 1960 tradicionalmente exploradas na área compreendida entre o litoral do Estado do Maranhão, Rio Parnaíba e seu afluente, Rio Longá, Rio Itapecurú e Rio das Preguiças. Na mencionada área de exploração estão situadas as cidades de Chapadinha e Luzilândia, que desempenhavam o papel logístico, servindo de entreposto para pequenos fornecedores.

As folhas coletadas na região, secas e embaladas em sacos de juta, eram remetidas para a cidade de Parnaíba. Nesta cidade as folhas eram prensadas em fardos de aproximadamente 200 kg e remetidos por via fluvial até o porto de Tutóia, ou por via ferroviária até o porto de Fortaleza e, em seguida, embarcadas via marítima para a Europa (SHARAPIN<sup>2</sup>, 1968).

O perfil analítico das folhas era: alcalóides totais 0,7 a 1,0 %. Relação pilocarpina / alcalóides secundários 90 : 10 (SHARAPIN<sup>3</sup>, 1968).

A exploração das folhas, na época, era realizada de modo absurdo. Os galhos eram podados a facção, levando à completa destruição da planta, ou

---

<sup>1</sup> Ministério da Indústria, Comércio e Turismo, Secretária do Comércio Exterior- Departamento de Comércio Exterior, 1994.

<sup>2</sup> Nikolai SHARAPIN. [Comunicação pessoal, 1968]

<sup>3</sup> vide, nota 3

tornando necessário vários anos para a sua recuperação. Nos anos 1969/1970 a produção tornou-se irrisória, tanto em quantidade como em qualidade.

No início da década de 1970 foram implantadas duas importantes indústrias para a produção de pilocarpina. A primeira foi implantada em São Luís - MA pelo grupo MERCK e a segunda foi implantada na Parnaíba pelo grupo KLABIN - PLANTEX.

Junto à cidade de Barra do Corda (MA), foram encontradas matas contendo grande quantidade de jaborandi. O perfil analítico das folhas desta região era de: Alcalóides totais 0,8 a 2,0 %; relação pilocarpina / alcalóides secundários 70 : 30.

As folhas logo após colhidas devem ser totalmente secas. Caso contrário ocorre o aparecimento de fermentações que causam perda total ou parcial dos alcalóides. A secagem normalmente é feita durante o dia, com as folhas espalhadas em lonas sob a ação do sol. À noite, a folha é recolhida em barracas de lona (PHYTOSUL<sup>5</sup>, 1990).

Sabe-se que entre a retirada da folha do pé de jaborandi, o procedimento de secagem, armazenagem e início do processo industrial existe uma perda de até 50 % dos alcalóides e pilocarpina. É muito importante aprimorar o manejo da folha com a finalidade de reduzir os valores da perda para níveis mínimos. A economia gerada no processamento da folha, facilmente compensaria o custo de pesquisa, já que a matéria-prima representa 76 % do custo do produto terminado (PHYTOSUL<sup>6</sup>, 1990).

#### **2.1.2.2. Relação da Região de Ocorrência das Folhas de Jaborandi.**

As folhas de jaborandi, além da pilocarpina, contêm outros alcalóides em

---

<sup>5</sup> PHYTOSUL Produtos Naturais Ltda, Águas de São Pedro, SP (Comunicação pessoal, 1990)

<sup>6</sup> vide, nota 5



número e concentração variáveis, denominados alcalóides secundários (VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978; MAAT & BEYERMAN<sup>85</sup>, 1983). A soma da pilocarpina e alcalóides secundários é denominada alcalóides totais. Os teores de alcalóides totais variam entre 0,6 a 1,8 %, sendo que 60 - 90 % dessa quantidade é constituída pela pilocarpina (BENIGNI et al.<sup>18</sup>, 1964).

As folhas encontradas em certas áreas apresentam uma relação abaixo de 60 % entre alcalóides totais e pilocarpina. Folhas deste tipo refletem uma série de inconvenientes durante a fabricação. Portanto, não é qualquer tipo de jaborandi que é adequado para a extração de pilocarpina. É indispensável ter um laboratório de controle químico de qualidade, com estrutura atualizada e atuante, orientando de maneira racional a coleta de folhas e a compra de matéria-prima, evitando, assim, a coleta e aquisição de folhas de jaborandi de qualidade inadequada e, conseqüentemente, eliminando prejuízos ecológicos e financeiro às empresas (PHYTOSUL<sup>6</sup>, 1990; SOURCETECH<sup>7</sup>, 1992).

A região do Maranhão, que compreende os municípios de Chapadinha, Brejo, Coelho Neto, Rosário e a própria ilha de S. Luís e os municípios de Matias Olímpio e Luzilândia, no Piauí, fornecem um jaborandi cujo teor em alcalóides totais alcança no máximo 0,8-0,9 %, sendo o teor de pilocarpina em torno de 90 %. Essa região está sendo explorada há mais de 100 anos (PHYTOSUL<sup>8</sup>, 1990; SOURCETECH<sup>9</sup>, 1992). A exploração predatória e os desmatamentos reduziram a importância dessa região como fornecedora de jaborandi. Entretanto, ainda fornece uma folha considerada de qualidade pela baixa presença de alcalóides secundários.

No final dos anos 60 uma nova região fornecedora foi descoberta - compreende os municípios de Barra do Corda, Grajaú e áreas vizinhas a

---

<sup>6</sup> vide, nota 5

<sup>7</sup> SOURCETECH Química Ltda., Pindamonhangaba, SP. [Comunicação pessoal, 1992]

<sup>8</sup> vide, nota 5

<sup>9</sup> vide, nota 8

Na região do rio Turu ocorre um jaborandi que praticamente não produz pilocarpina. O mesmo fenômeno é observado em algumas regiões do estado do Pará. Uma nova região produtora foi descoberta recentemente no Tocantins. Segundo consta, o teor de pilocarpina apresenta-se superior àqueles encontrados nas folhas obtidas na região de Barra do Corda (**PHYTOSUL<sup>13</sup>, 1990**).

Considerando que a coleta é feita na estação seca, de junho a dezembro, as chuvas do período seguinte permitem que as folhas brotem novamente. A derrubada das plantas obriga os coletores a tirar folhas de plantas jovens, o que, a médio prazo, tem provocado a diminuição do teor de pilocarpina (**PHYTOSUL<sup>14</sup>1990**). Assim, considerando os teores médios de alcalóides totais por safra, a zona litorânea baixou de 0,6%-0,7% para 0,4%-0,5% e na região de Barra do Corda, de 1,1% para 0,8% (**PHYTOSUL<sup>15</sup>, 1990**) (Figura 1).

---

<sup>12</sup> vide, nota 5

<sup>13</sup> vide, nota 5

<sup>14</sup> vide, nota 5



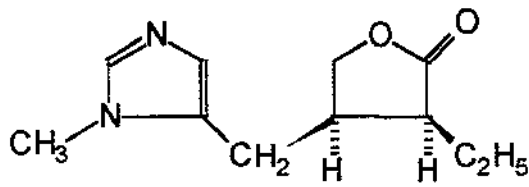
Figura 1. Regiões de ocorrência das folhas de jaborandi.

## 2.2. A Química do Jaborandi

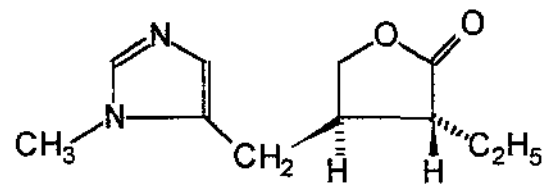
A maioria das espécies de *Pilocarpus* até agora estudadas tem apresentado alcalóides do tipo imidazólico, assim chamados por apresentarem o núcleo do imidazol em sua estrutura, núcleo este proveniente biossinteticamente do aminoácido histidina (MAAT & BEYERMAN<sup>85</sup>, 1983). Além do núcleo imidazólico, os alcalóides das espécies de *Pilocarpus* apresentam também um anel lactônico de cinco membros. Dentre esses alcalóides já conhecidos está a pilocarpina (Figura 2) que é o alcalóide mais importante do ponto de vista terapêutico (ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982), tendo por isso despertado grande interesse entre químicos e farmacologistas.

A pilocarpina e a isopilocarpina possuem fórmula molecular  $C_{11}H_{16}O_2N_2$ . Em sua molécula, a pilocarpina apresenta dois centros assimétricos, possibilitando a existência de quatro isômeros com a mesma estrutura plana. No entanto, até o momento são conhecidos apenas dois, a pilocarpina e isopilocarpina (STERNITZKE et al.<sup>154</sup>, 1992). Foram identificados em plantas desse gênero os alcalóides: pilosina, isopilosina e epiisopilosina, diferentes entre si apenas na configuração relativa de seus centros assimétricos. Suas moléculas apresentam três centros assimétricos, sendo possível, com a mesma estrutura molecular, a existência de oito isômeros (Figura 2) (BATTERSBY & OPENSHAW<sup>15</sup>, 1953).

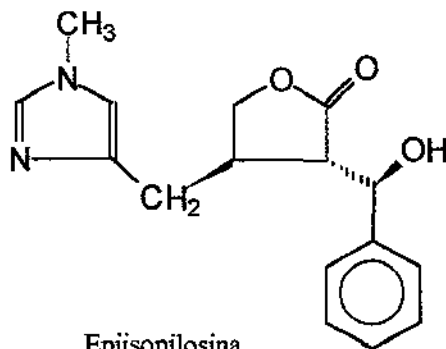
Posteriormente foi isolado outro alcalóide de *Pilocarpus*, a epiisopiloturina, que difere da epiisopilosina apenas pela posição do grupo N-metil, tendo ambas a mesma estereoquímica. Até o presente momento apenas os quatro alcalóides citados acima são conhecidos (VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978).



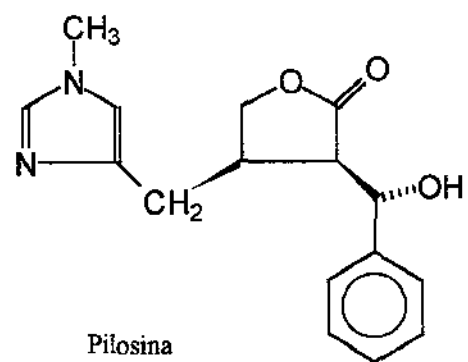
Pilocarpina



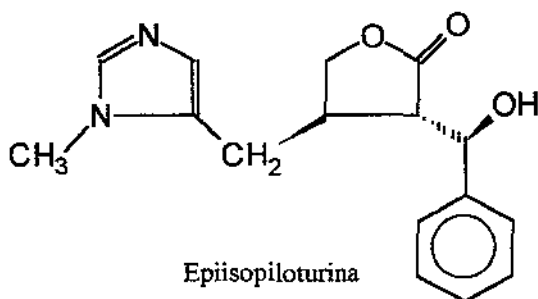
Isopilocarpina



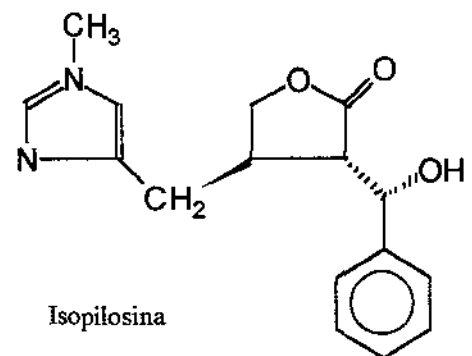
Epiisopilosina



Pilosina



Epiisopiloturina



Isopilosina

Figura 2. Alcalóides imidazólicos aislados de *Pilocarpus microphyllus* Stapf.

### 2.2.1. Isolamento da Pilocarpina

**HARDY**<sup>58</sup> (1875) isolou das folhas de uma planta do gênero *Pilocarpus* uma substância que combinava com ácido clorídrico para dar um cloridrato cristalino, solúvel em água, álcool absoluto e éter, que denominou de pilocarpina.

Na mesma época, **GERRARD**<sup>48,49,50,51</sup> (1875, 1876, 1877), trabalhando separadamente, isolou a pilocarpina, porém como nitrato, que se apresentava na forma de cristais incolores cujas soluções tinham ações farmacológicas sobre o olho, análogas às preparações de jaborandi.

O alcalóide também foi obtido a partir das folhas esmagadas, extraídas com álcool a 84%, sob a forma de nitrato (**CHEMNITIUS**<sup>28</sup>, 1928).

**PREOBRASHENSKI & KABATSCHNIK**<sup>124</sup> (1933), **PREOBRASHENSKI et al.**<sup>125</sup> (1936) e **POLJAKOWA et al.**<sup>121</sup> (1936) isolaram alcalóides das folhas de jaborandi, obtendo também, por síntese, a pilocarpina, isopilocarpina e a pilocarpidina.

Algumas modificações e aperfeiçoamento do processo de isolamento da pilocarpina foram descritos a partir de 1953 (**MAAT & BEYERMAN**<sup>85</sup>, 1983). Essas modificações no processo envolvem a adição de uma solução aquosa de um ácido nas folhas e extração com diclorometano (**VOIGTLÄNDER et al.**<sup>172</sup>, 1978). Esse processo foi utilizado por várias empresas até pouco tempo. Atualmente as modificações do processo de isolamento da pilocarpina envolvem extração com solução de sulfato de alumínio 5% (**SHARAPIN**<sup>146</sup>, 1996) e com solução aquosa de ácido sulfúrico 2% (**LUCIO et al.**<sup>83,84</sup>, 1997, 1998).

## 2.2.2. Isomerismo da Pilocarpina e Isopilocarpina

Em 1880, **HARNACK & MEYER**<sup>59</sup> observaram que a pilocarpina sofria uma mudança, quando aquecida isoladamente ou com ácido clorídrico e que o produto era idêntico à base que já se tinha isolado do jaborandi, nomeado "jaborina". Esses pesquisadores concluíram que o produto isolado era um isômero da pilocarpina e ocorre naturalmente nas folhas.

**JOWETT**<sup>63,64,65</sup> (1900, 1901) através de pesquisa, mostrou que a diferença entre a pilocarpina e a isopilocarpina estava na estrutura estérica e que a pilocarpina sofria oxidação com permanganato. A partir desse dado, foi possível propor a fórmula da pilocarpina e mostrar que a diferença entre pilocarpina e isopilocarpina era causada pela N-metilação em diferentes sítios no anel imidazólico, ou seja, um isomerismo estrutural (**PINNER & KOHLHAMMER**<sup>116,117,118</sup>, 1900, 1901; **PINNER & SCHWARZ**<sup>119,120</sup>, 1902). A reversibilidade ocorre quando a isopilocarpina é aquecida por 3 horas com uma solução alcóolica de potássio. Nesse processo, uma pequena quantidade de pilocarpina pode ser isolada do produto (**JOWETT**<sup>66</sup>, 1905).

**PREOBRASHENSKI et al.**<sup>125</sup> (1936) concluíram com base nas diferenças de estabilidade e rotação ótica, que a pilocarpina possui configuração "cis" e a isopilocarpina "trans", o que foi mais tarde confirmado por **ZAVYALOV**<sup>183</sup> (1952), com base nas reações químicas do anel butirolactona, que contém os dois centros quirais.

A decomposição da pilocarpina em solução aquosa, ocorrida principalmente em formulações farmacêuticas, foi inicialmente estudada por **BAESCHLIN et al.**<sup>9</sup> (1969). Em meio aquoso, a pilocarpina sofre duas importantes reações em solução, epimerização para isopilocarpina e hidrólise para ácido pilocárpico. Na **The United States Pharmacopoeia**<sup>165</sup> (USP) (1995) não há um limite oficial para controle de qualidade no que diz respeito à

concentração permitida para dosagens de isopilocarpina e ácido pilocárpico, em soluções oftálmicas de cloridrato de pilocarpina.

Os produtos de decomposição da pilocarpina, ocorridos por isomerização, foram comprovados pelas técnicas: cromatografia de camada delgada (BAESCHLIN et al.<sup>9</sup>, 1969), espectroscopia infravermelho (WASHBURN<sup>174</sup>, 1953; RYAN<sup>138</sup>, 1976), ressonância magnética nuclear (R.M.N) em água deuterada (BAESCHLIN et al.<sup>9</sup>, 1969; NEVILLE et al.<sup>102,103</sup>, 1976, 1977; MITRA et al.<sup>93</sup>, 1980, ABOUL-ENEIN & BORNE<sup>3</sup>, 1980; MAAT et al.<sup>86</sup>, 1984), cromatografia gasosa (LINK & BERNAUER<sup>76</sup>, 1972), eletroforese capilar (BAEYENS et al.<sup>10</sup>, 1993), espectrofotometria e polarimetria (SHUPE<sup>147</sup>, 1941; WEBB et al.<sup>175</sup>, 1952; THIES & SÖRGENFREY<sup>160</sup>, 1958; LEVINE & HORROCKS<sup>75</sup>, 1960; MURRAY<sup>101</sup>, 1970; CHUNG et al.<sup>29</sup>, 1970; DUNN et al.<sup>38</sup>, 1981; SCOTT et al.<sup>145</sup>, 1981).

Com a introdução do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi possível analisar a pilocarpina, a isopilocarpina e seus produtos de degradação, tanto nas formas de dosagens farmacêuticas como nos fluidos biológicos. Vários métodos de CLAE têm sido publicados, visando à separação da pilocarpina, isopilocarpina e seus produtos de degradação (Figura 3) (WEBER<sup>176</sup>, 1976; KHALIL<sup>68</sup>, 1977; NOORDAM et al.<sup>104</sup>, 1978; KNECZKE<sup>70</sup>, 1980; O'DONNELL et al.<sup>107</sup>, 1980; MITRA et al.<sup>93</sup>, 1980; NOORDAM et al.<sup>105</sup>, 1981; DUNN et al.<sup>38</sup>, 1981; KENNEDY & McNAMARA<sup>69</sup>, 1981; DRAKE et al.<sup>36</sup>, 1982; BUNDGAARD & HANSEN<sup>24</sup>, 1982; SZEPESI et al.<sup>155</sup>, 1983; DUNN & THOMPSON<sup>39</sup>, 1983; VAN ACKEREN et al.<sup>168</sup>, 1984; RENDI et al.<sup>134</sup>, 1984; WOOD & ROBINSON<sup>179</sup>, 1984; POPL et al.<sup>122</sup>, 1985; BALANSARD et al.<sup>11</sup>, 1986; VESPALEC et al.<sup>169</sup>, 1988; SIDHU et al.<sup>149</sup>, 1987; DURIF et al.<sup>40,41</sup>, 1988; STERNITZKE et al.<sup>154</sup>, 1992; LUCIO et al.<sup>82</sup>, 1995).



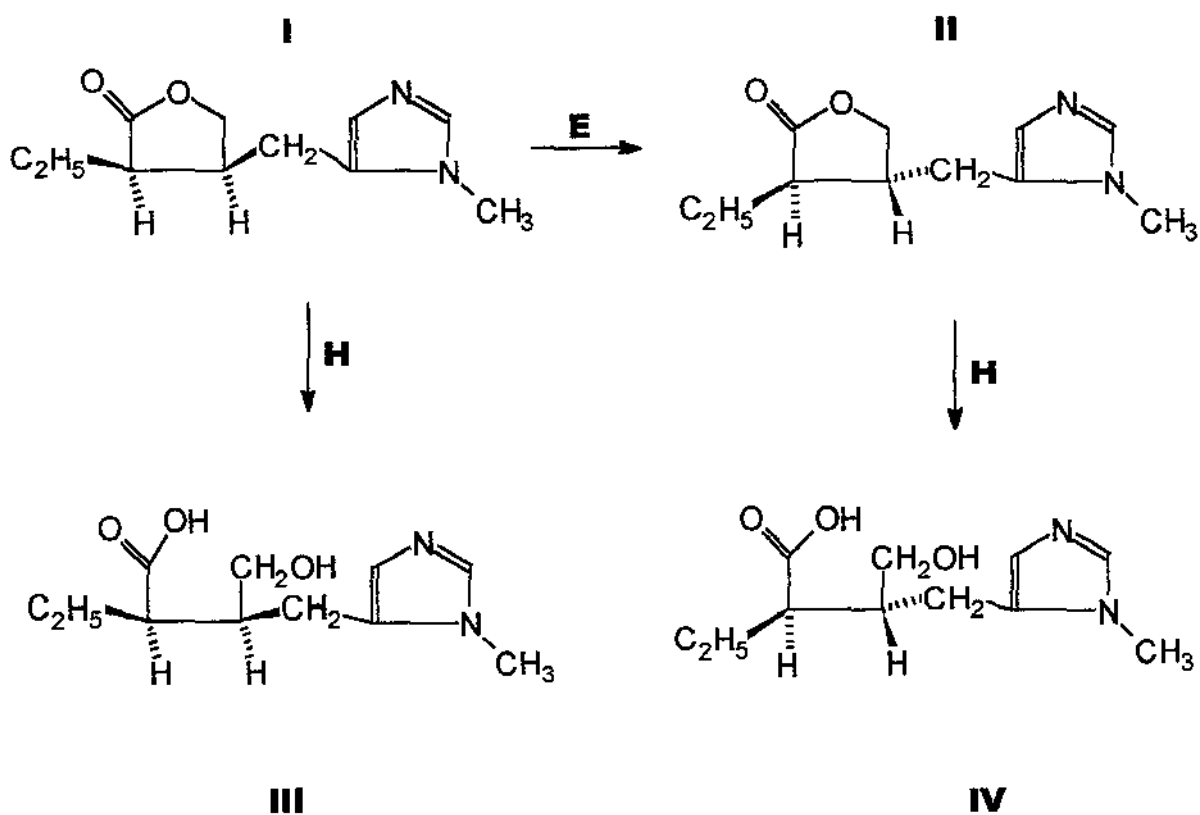


Figura 3. Reação de degradação. I. pilocarpina, II. isopilocarpina, III. ácido pilocárpico, IV. ácido isopilocárpico. E = epimerização; H = hidrólise.

### 2.2. 3. Propriedades Físicas e Físico-Químicas

A pilocarpina e isopilocarpina são obtidas como óleos viscosos; entretanto, ambas cristalizam-se em baixa temperatura, sendo sólidos higroscópicos (PINNEN & SCHWARZ<sup>119,120</sup>, 1902). A pilocarpina é solúvel em água, álcool, e clorofórmio (JOWETT<sup>63</sup>, 1900; HARDY<sup>58</sup>, 1875), bastante solúvel em benzeno (PETIT & POLONOVSKI<sup>113</sup>, 1897), pouco solúvel em éter ou éter de petróleo (JOWETT<sup>63</sup>, 1900). A isopilocarpina é muito similar à pilocarpina em sua solubilidade (JOWETT<sup>63</sup>, 1900).

Ambos os alcalóides são opticamente ativos, e suas rotações específicas são diminuídas pela adição de álcali. Devido à abertura do anel lactônico, a rotação da pilocarpina também diminui em solução aquosa. Todos os sais dos alcalóides são dextrorotatórios. Tanto a pilocarpina como a isopilocarpina comportam-se como bases monoácidas, e têm sido descritos vários sais cristalinos dos dois alcalóides (NEVILLE et al.<sup>103</sup>, 1976; RYAN<sup>138</sup>, 1976).

### 2.2.4. Reações Coloridas e de Precipitação

A pilocarpina precipita com o ácido silicotúngstico e com o reagente de Dragendorff. Muitas das reações de precipitação foram adaptadas para detectar alcalóides em micro escala (BATTERSBY & OPENSHAW<sup>15</sup>, 1953).

Vários métodos têm sido descritos para determinar a pilocarpina, muitos envolvem a titulação da base isolada com ácido padrão, usando como indicadores azul de bromofenol, vermelho de metila e alaranjado de metila. A recuperação da base de seus sais pode ser obtida por cromatografia em alumina. A determinação do teor do sal de pilocarpina tem sido empregada tanto usando indicadores, tais como fenolftaleína, timolftaleína ou azul de Poirrier, quanto

conductimetricamente. Para determinar o cloridrato, tem sido usado o método de Volhard. O método mais específico para determinação envolve a abertura do grupo lactona pelo tratamento do alcalóide com álcali quente, seguido de titulação do excesso de álcali (**EUROPEAN PHARMACOPOEIA**<sup>42</sup> (**EUR.PH.**), 1981; **USP**<sup>165</sup>, 1995; **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**<sup>43,44</sup> (**F.BRAS.**), 1988, 1996).

### 2.2.5. Alcalóides Secundários

Os alcalóides secundários são definidos pela C.C.D, comparando-se as zonas do cromatograma com os respectivos valores de  $R_F$  (fator de referência) com as manchas do padrão de cloridrato de pilocarpina e o nitrato de isopilocarpina. As manchas do cromatograma abaixo ou acima dos valores de  $R_F$  dos padrões de cloridrato de pilocarpina e nitrato de isopilocarpina são definidas como alcalóides secundários e esses valores variam de acordo com a fase móvel utilizada no desenvolvimento do cromatograma (**BASSET et al.**<sup>14</sup>, 1981; **COLLINS**<sup>31</sup>, 1993). Até o momento foram descritos na literatura a pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (**PYMAN**<sup>131</sup>, 1912; **LÉGER & ROQUES**<sup>72,73</sup>, 1912, 1913; **VOIGTLÄNDER & ROSENBERG**<sup>171</sup>, 1959; **LINK & BERNAUER**<sup>76</sup>, 1972; **LÖWE & POOK**<sup>81</sup>, 1973; **VOIGTLÄNDER et al.**<sup>172</sup>, 1978).

Existem poucos dados disponíveis na literatura sobre a química dos alcalóides secundários. O primeiro alcalóide secundário identificado do *Pilocarpus microphyllus* Stapf. foi a pilosina **PYMAN**<sup>131</sup> (1912) e inicialmente foi denominada de “carpilina” (**LÉGER & ROQUES**<sup>72,73</sup>, 1912, 1913). O rendimento da extração da pilosina corresponde a um conteúdo de somente 0,007% das folhas, tendo sido observado que nenhum outro alcalóide estava presente nas folhas em quantidade superior a 0,003 % (**PYMAN**<sup>131</sup>, 1912).

Porém, esse mesmo alcalóide recebeu o nome de isopilosina por **VOIGTLÄNDER & ROSENBERG**<sup>171</sup> (1959), esses mesmos autores isolaram da mesma planta um outro alcalóide e o chamaram de pilosina. **LINK & BERNAUER**<sup>76</sup> (1972) realizaram a síntese de (+)-isopilosina e da (+)-pilocarpina e obtiveram a (-)-epiisopilosina como um segundo produto. A partir de um éster imidazólico foi obtido um aldeído, em seguida foi feita uma condensação de Stobbe com éster succínico obtendo-se um sal ácido/éster. A seguir, foi feita uma redução com borohidreto de lítio obtendo-se a pilosinina, junto com a 2,3- dihidropilosinina. A hidrogenação catalítica com platina produz uma mistura 1:1 de (+) - isopilosina e (-) - epiisopilosina.

**LÖWE & POOK**<sup>81</sup> (1973) repetiram o mesmo processo de isolamento da pilosina descrita por **VOIGTLÄNDER & ROSENBERG**<sup>171</sup> (1959) e concluíram que era uma mistura 1:1 de pilosina e isopilosina. As duas bases foram isoladas por cristalização, após remoção da pilocarpina e isopilocarpina. A pilosina foi obtida como salicilato, e a isopilosina foi isolada das águas-mães de salicilato de pilosina. Nesse mesmo processo, esses mesmos autores isolaram a epiisopilosina na forma de base, e os dados foram confirmados por comparação com os espectros de ressonância magnética nuclear protônica (<sup>1</sup>H) de pilosina e isopilosina (**LÖWE & POOK**<sup>81</sup>, 1973).

Existiam dúvidas quanto às configurações absolutas de (+) - isopilosina e (-) - epiisopilosina e da (+)- pilosina, que são relatadas no trabalho de **LINK et al.**<sup>77</sup> (1974); mais tarde os autores propuseram, para a pilosina, estruturas epímeras do átomo do carbono fenil carbinol, com base nas comparações do espectro de dicroísmo circular (CD) para esses aminoácidos aromáticos de configuração absoluta conhecida, descritos na literatura (**TEDESCHI et al.**<sup>159</sup>, 1974). Comparando os dados das análises de raio-X e a transformação de (+)-isopilosina para (+)-pilocarpina, eles concluíram, e mais tarde publicaram, que a

estrutura da pilosina estava correta. Finalmente, esse trabalho foi confirmado com base nos estudos de infravermelho de alta-diluição (SAREL et al.<sup>141</sup>, 1975).

A epiisopiloturina é o último alcalóide secundário isolado do *Pilocarpus microphyllus* Stapf. descrito na literatura, tendo sido isolada das folhas de uma variedade de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. encontrada na região do Alto Turú (MA) por VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup> (1978).

### 2.2.5.1 Propriedades Físicas e Físico-Químicas

A pilosina, a isopilosina, a epiisopilosina e a epiisopiloturina são bases cristalinas opticamente ativas, solúveis em clorofórmio ou benzeno e muito pouco em éter, cristalizam em álcool ou água. O sais de pilosina cristalizam com dificuldade, porém têm sido obtidas formas cristalinas de cloridrato, sulfato, hidrogenotartarato e cloreto aúrico (PYMAN<sup>131</sup>, 1912). A pilosina é alcalina para tornassol mas não o é para fenolftaleína, sendo a base solúvel em água saturada com dióxido de carbono (LÉGER & ROQUES<sup>73</sup>, 1912).

As rotações específicas da pilosina, isopilosina e epiisopilosina em solução aquosa diminuem quando deixada em repouso por tempo prolongado, e são extremamente alteradas pela adição de ácido ou álcali (BATTERSBY & OPENSHAW<sup>15</sup>, 1953; LÖWE & POOK<sup>81</sup>, 1973; TEDESCHI et al.<sup>159</sup>, 1974). Os sais de isopilosina cristalizam com dificuldade, porém têm sido obtidas formas cristalinas de nitrato e salicilato (TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973; TEDESCHI et al.<sup>159</sup>, 1974).

### 2.2.5.2. Estereoquímica

Os alcalóides secundários pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina têm fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_3N_2$  e são bases monoácidas que

contém um grupo N-metil, nenhum grupo imino e nenhum metoxi (HAMMERSLAG<sup>57</sup>, 1950; VOIGTLÄNDER & ROSENBERG<sup>171</sup>, 1959; LINK & BERNAUER<sup>76</sup>, 1972; TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973; LINK et al.<sup>77</sup>, 1974; SAREL et al.<sup>141</sup>, 1975; VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978). A presença da estrutura lactônica é comprovada por titulação com álcali quente. O alcalóide também contém um grupo hidroxil alcoólico; a presença deste é indicada pela preparação de um derivado benzoil amorfo, e pela degradação do alcalóide com anidrido acético a quente para anidropilosina, C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. A anidropilosina é opticamente ativa e contém a estrutura lactona, porém difere da pilosina porque ela é imediatamente oxidada pelo permanganato de potássio aquoso a frio (PYMAN<sup>131</sup>, 1912; LÉGER & ROQUES<sup>73</sup>, 1912).

A pilosina não é alterada por ácido sulfúrico diluído a 140<sup>0</sup>C. Fervendo com hidróxido de sódio 5%, simplesmente abre o anel lactona (PYMAN<sup>131</sup>, 1912), mas quando é levada à ebulição com hidróxido de potássio a 20%, é degradada para benzaldeído e a uma nova base, a pilosinina, C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Uma degradação similar ocorre quando o alcalóide é aquecido com água ou com álcali diluído a 140 °C por 10 horas (LÉGER & ROQUES<sup>72,73</sup>, 1912, 1913). Quando a pilosina é oxidada com ácido nítrico, forma-se o ácido benzóico (LÉGER & ROQUES<sup>73</sup>, 1912).

A pilosina-base é dextrorrotatória em soluções alcoólicas, porém, levorotatória em soluções alcalinas (HAMMERSLAG<sup>57</sup>, 1950). A epiisopilosina-base é levorotatória em soluções alcoólicas (LÖWE & POOK<sup>81</sup>, 1973).

A estrutura da epiisopiloturina foi elucidada pelos dados de infravermelho, ressonância nuclear magnética – protônica (<sup>1</sup>H) e carbono-13 (<sup>13</sup>C), espectro de massa e por comparação com os conhecidos estereoisômeros da série pilosina. A diferença entre a epiisopiloturina e pilosina, está na ligação da lactona com o anel imidazol pela ponte metileno. Na pilosina a ponte

metileno está em C-5, porém, na episopiloturina está preferencialmente em C-4 (VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978).

## **2.2.6. Processos Industriais para Obtenção e Determinação da Pilocarpina**

### **2.2.6.1. Processos de Extração**

Nos processos usados, as operações unitárias podem ser divididas em duas etapas distintas:

- extração
- purificação

Ambas são baseadas em propriedades físicas dos alcalóides, referentes a sua solubilidade. A maioria dos alcalóides é muito pouco solúvel em água, porém solúvel na maioria de solventes orgânicos, imiscíveis ou miscíveis com água. Entretanto, os sais de alcalóides são usualmente solúveis em água e praticamente insolúveis em solventes orgânicos imiscíveis com água, ou parcialmente solúveis em solventes miscíveis com água. Assim, os processos de extração de alcalóides podem ser executados por:

a) solvente de baixa polaridade, imiscível com água: até pouco tempo era utilizado o benzeno, hoje proscrito em todas as indústrias do mundo por ser cancerígeno. Outras empresas utilizavam tricloroetileno (1,1,1 tricloro etano), que deixou de ser fabricado no mundo inteiro há cerca de 2 anos. O benzeno foi substituído por uma mistura de tolueno e diclorometano (BATTESRBY & OPENSHAW<sup>15</sup>, 1953; VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978).

b) solução aquosa de um ácido mineral forte: preferentemente ácido sulfúrico a 2 %. A miscela ácida é tratada com solução de sulfato de alumínio que, em pH superior a 5,0, forma gel de hidróxido de alumínio que precipita e arrasta parte das impurezas. Esse procedimento não é suficiente para limpar o

extrato, sendo seguido de uma segunda precipitação, desta vez com cloreto férrico, em pH na faixa alcalina. A miscela pode ser extraída com dicloro - metano sem grandes riscos de emulsões (LUCIO et al.<sup>83,84</sup>, 1997, 1998).

c) solução de um sal inorgânico da reação ácida: utiliza-se uma solução de sulfato de alumínio a 5 %. Esse procedimento resulta numa miscela mais limpa e a obtenção do agente de precipitação na própria miscela pela adição de hidróxido de amônio. Diferentemente do processo anterior, o uso de um único agente de precipitação é suficiente para limpar o extrato e permitir extração líquido-líquido com diclorometano sem formação de emulsões estáveis (SHARAPIN<sup>146</sup>, 1996).

Todos os processos envolvem como operação inicial a trituração da folha, e o produto final desta etapa é representado pelas bases livres de alcalóides, sendo denominado, na indústria, de base direta.

#### **2.2.6.2. Processo de Purificação**

Não importando qual tenha sido o processo de extração, as operações unitárias de purificação da base direta são:

- dissolução da base direta em mistura de metanol e acetona
- cloração da solução com o uso de gás clorídrico (HCl gasoso) em temperatura abaixo de 30 °C até atingir pH 3,5
- cristalização na temperatura inferior a 15 °C por um período de 12 horas
- separação dos cristais por filtração ou centrifugação, obtendo-se cloridrato de pilocarpina e respectivas águas-mães. dissolução do cloridrato de pilocarpina bruto em metanol a 60 °C
- tratamento da solução com carvão ativo
- filtração com “pre-coat” de diatomita



- concentração do filtrado até a metade do volume original
- cristalização na temperatura inferior a 15 °C
- separação dos cristais por centrifugação ou filtração, obtendo-se Cloridrato de pilocarpina puro e suas respectivas águas-mães
- lavagem dos cristais na centrífuga (ou filtro) com acetona
- secagem dos cristais em estufa de leito fluidizado
- moagem dos cristais secos e peneiramento
- mistura de todos os sais de pilocarpina aprovadas pelo Laboratório de
- Controle de Qualidade em misturador duplo cone ou similar, formando um lote do produto.
- análise do lote de acordo com a monografia USP<sup>165</sup> (1995) ou **EUROPEAN PHARMACOPOEIA**<sup>42</sup> (EUR.PH) (1981).
- após aprovação, liberação para embalagem e venda.

O cloridrato de pilocarpina é usado preferencialmente em relação ao nitrato, porque o cloridrato é mais compatível com os preservativos (MURRAY<sup>101</sup>, 1970).

### **2.2.6. 3. Determinação de Alcalóides Totais**

Na análise do fármaco utiliza-se, em particular, a alcalimetria (BASSET et al.<sup>14</sup>, 1981).

Os alcalóides são extraídos, em geral, por maceração com um solvente orgânico (clorofórmio, diclorometano, benzeno), em meio alcalinizado (amônia, carbonato de sódio). Renova-se a operação anterior de esgotamento: agita-se a fase orgânica com ácido sulfúrico diluído; depois de alcalinizada com amônia, essa solução alcalina é esgotada com solvente orgânico imiscível com água.

Elimina-se o excesso de amônia por métodos conhecidos, que evitam a decomposição dos alcalóides pelo aumento de temperatura.

Utiliza-se o método de cromatografia de camada delgada (C.C.D.) para determinar os teores de pilocarpina e isopilocarpina (MUNIER & MACHEBCEUF<sup>98</sup>, 1951; MORAES & PALMA<sup>96</sup>, 1954; WASHBURN<sup>174</sup>, 1953; VON DOZENT & STRAUB<sup>173</sup>, 1955; BAESCHLIN et al.<sup>9</sup>, 1969).

Depois do desenvolvimento indispensável e da revelação da cromatoplaça pelo método descrito na EUR. PH.<sup>42</sup> (1981), compara-se a intensidade de cor obtida com os padrões.

#### **2.2.6.4. Determinação de Cloridrato e Nitrato de Pilocarpina**

Existem dois métodos disponíveis para calcular a porcentagem dos sais de pilocarpina, sendo: as determinações em meio aquoso (Determinação Potenciométrica) e não aquoso (Determinação em meio não aquoso) para os fármacos (sais) pouco ácidos ou pouco básicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA<sup>43,44</sup>, 1988; 1996):

- a) **Determinação potenciométrica:** Dissolver cerca de 2 g de cloridrato de pilocarpina em 60 ml de água. Titular com hidróxido de sódio 1 N, determinando o ponto final potenciométricamente (EUR. PH.<sup>42</sup>, 1981).
  
- b) **Determinação em meio não aquoso:** Dissolver cerca de 500 mg de nitrato de pilocarpina em uma mistura de 20 ml de ácido acético glacial e 10 ml de acetato de mercúrio, aquecendo levemente. Resfriar à temperatura ambiente, adicionar duas gotas de cristal violeta e titular com ácido perclórico 0,1 N (USP<sup>165</sup>, 1995).

## 2.3. Farmacologia dos Alcalóides do *Pilocarpus*

Não foram encontrados trabalhos na literatura abordando aspectos farmacológicos dos alcalóides secundários do jaborandi. Dessa forma, a revisão, a seguir, foi baseada nas informações sobre a pilocarpina, o único alcalóide do gênero *Pilocarpus* cuja farmacologia é descrita na literatura.

### 2.3.1. Introdução do Jaborandi na Terapêutica – Histórico

Embora os nativos soubessem, há muito tempo, que mascar as folhas de *Pilocarpus* causasse salivação, as primeiras experiências de introdução do jaborandi (*Pilocarpus* sp.) na terapêutica médica ocidental devem-se, aparentemente, a dois nomes: major João Martins da Silva Coutinho e ao Dr. Symphrônio Olimpio César Coutinho. O major Coutinho, embora não se tenha graduado em medicina, exercia atividades científicas paramédicas e estudou plantas medicinais brasileiras, tendo em 1861 escrito acerca das epidemias no vale do Amazonas. Esse trabalho foi publicado nos Anais Brasilienses de Medicina em 1862-1863 (COSTA<sup>34</sup>, 1967; ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

No seu livro "Lições de Farmacologia", fica explícito que o major J.M.S. Coutinho foi o introdutor do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius*) e de seus extratos na terapêutica, tendo levado as folhas desta planta de Pernambuco para Paris para fazer análises e experiências (ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

A pesquisa botânica mostrou que a maioria das amostras eram de *Pilocarpus jaborandi* Holmes, embora *P. pennatifolius* Lem. também tenha sido usado. Entretanto, entre 1893 e 1896, essas duas espécies foram gradualmente substituídas pelo *P. microphyllus* Stapf., o qual continua sendo o mais pesquisado até hoje (ANDRADE NETO<sup>7</sup>, 1990).

O grande interesse em torno do jaborandi, após sua introdução na Europa pelo Dr. Coutinho em 1873, no meio médico e farmacêutico foi em virtude da ação biodinâmica de seu princípio ativo, um alcalóide posteriormente isolado e denominado de Pilocarpina (PINHEIRO<sup>115</sup>, 1997).

A pilocarpina, assim como outros alcalóides, principalmente a muscarina e arecolina, possuem os mesmos locais de ação dos ésteres da colina, tendo também como principal ação estimular ou inibir as células efetoras autônomas inervadas por fibras parassimpáticas pós-ganglionares; quando atuam com essa propriedade, podem receber a designação de agentes parassimpaticomiméticos. Além disso, exercem ações adicionais nos gânglios, na junção neuromuscular, em células pré-juncionais do sistema nervoso autônomo e em células que não recebem ampla inervação parassimpática, porém possuem receptores colinérgicos (MINETTE & BARNES<sup>92</sup>, 1988; COOK et al.<sup>32</sup>, 1987; AAS & MACLAGAN<sup>1</sup>, 1990).

A muscarina atua quase exclusivamente nos sítios receptores muscarínicos, sendo a sua classificação derivada desse fato. A arecolina atua também ao nível dos receptores nicotínicos. A pilocarpina exerce ação muscarínica predominante, mas produz respostas cardiovasculares anômalas, e as glândulas sudoríparas mostram-se particularmente sensíveis a ela (WILFFERT et al.<sup>177</sup>, 1983; MINETTE & BARNES<sup>92</sup>, 1988; VILCHES et al.<sup>170</sup>, 1995).

Embora esses alcalóides naturais sejam de grande valia como instrumentos farmacológicos, a pilocarpina logo atraiu interesse de muitos pesquisadores que, baseados em suas ações farmacológicas, realizaram muitos trabalhos para estabelecer sua aplicação na terapêutica, principalmente como agente miótico (AKESSON et al.<sup>5</sup>, 1983; BOGNAR et al.<sup>21</sup>, 1988; SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989; OLIVALVES et al.<sup>108</sup>, 1989; OROZ et al.<sup>110</sup>, 1991; TANIGUCHI & KITAZAWA<sup>156</sup>, 1994; CROFT et al.<sup>35</sup>, 1996) e em

pacientes com xerostomia (GREESPAN & DANIELS<sup>54</sup>, 1987; WYNN<sup>180</sup>, 1996; TAYLOR & HASHIMI<sup>157</sup>, 1996; LOCKHART et al.<sup>79</sup>, 1996; GARG & MALO<sup>47</sup>, 1997; GUCHELAAR et al.<sup>56</sup>, 1997).

A pilocarpina produz ações colinomiméticas exclusivamente pela ação direta em células efectoras autonômicas (VILCHES et al.<sup>170</sup>, 1995).

### 2.3.2. Relação Estrutura /Atividade

Os alcalóides muscarínicos apresentam diferenças pronunciadas, bem como relações interessantes na sua estrutura. A razão para classificá-los como agonistas muscarínicos é que produzem respostas muscarínicas em concentrações muito menores que as necessárias para produzir respostas nicotínicas, e sua limitada utilidade terapêutica reflete sua ação em receptores muscarínicos (SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989).

A muscarina e a pilocarpina são substâncias de ocorrência natural que atuam como agonistas colinérgicos. A muscarina, um composto do amônio quaternário, possuindo três átomos de carbono assimétrico, pode ser considerada semelhante à estrutura da acetilcolina, embora diferente da pilocarpina. A arecolina e a pilocarpina são aminas terciárias; além disso, a pilocarpina é uma base fraca, de maneira que uma fração substancial permanece não-ionizada em pH fisiológico (ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982). Existem relatos que demonstram que a pilocarpina perde sua atividade em pH 9,0, enquanto a acetilcolina não, sugerindo que a pilocarpina atue na forma ionizada, isto é, sua atividade diminui com o aumento do pH. A pilocarpina e a acetilcolina exibem o mesmo tipo de atividade e agem por estimulação direta da célula. Portanto, foi proposto que a pilocarpina e a acetilcolina atuem no mesmo receptor colinérgico (ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982).

Vários autores publicaram trabalhos sobre a relação estrutura / atividade da pilocarpina e seus derivados. Eles concluíram que o anel imidazol não é muito essencial para a atividade biológica. Entretanto, a maioria dos compostos que possuem o anel imidazol alterado são menos ativos quando comparados com a pilocarpina. Nos derivados de pilocarpina que possuem atividade parassimpatomimética, o sítio aniônico (nitrogênio terciário protonado) está separado da região de alta densidade eletrônica no mínimo de 4Å. O sítio de densidade eletrônica está localizado sobre a carbonila e o oxigênio do éter, a mínima alteração no ângulo C-O-C leva a uma pequena distorção no anel  $\gamma$ -butirolactona causando uma severa redução ou perda total da atividade, ou seja, o anel de 5 membros da lactona é essencial tanto para as ações parassimpatomiméticas, quanto para as parassimpatolíticas. Essa distorção alteraria a ligação devido ao impedimento estérico ou modificando a conformação necessária do anel lactona para a ligação no receptor. A pilocarpina fixa-se ao sítio receptor provavelmente com 4 pontos de ataque: a) um sítio catiônico quaternário; b) oxigênio do éter; c) oxigênio da carbonila, e d) o grupo etil na posição C-3 do anel lactona. Como a pilocarpina assume, em sistemas biológicos, a conformação espacial em que os grupos farmacofóricos, principais responsáveis pelo ataque ao sítio receptor, encontram-se na mesma relação espacial com os grupos da acetilcolina, a mínima modificação estrutural na molécula de pilocarpina causa redução drástica ou perda da atividade biológica (Figura 4) (BEN-BASSAT et. al.<sup>17</sup>, 1971; BEN-BASSAT & LAVIE<sup>16</sup>, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982).

SCHULMAN et al.<sup>144</sup> (1991) desenvolveram um modelo teórico de energias conformacionais da pilocarpina. Nesse estudo, fizeram uma comparação com as conformações energeticamente acessíveis da pilocarpina e as conformações da muscarina, para explicar de que maneira a pilocarpina pode ser reconhecida como agonista pelo receptor muscarínico.

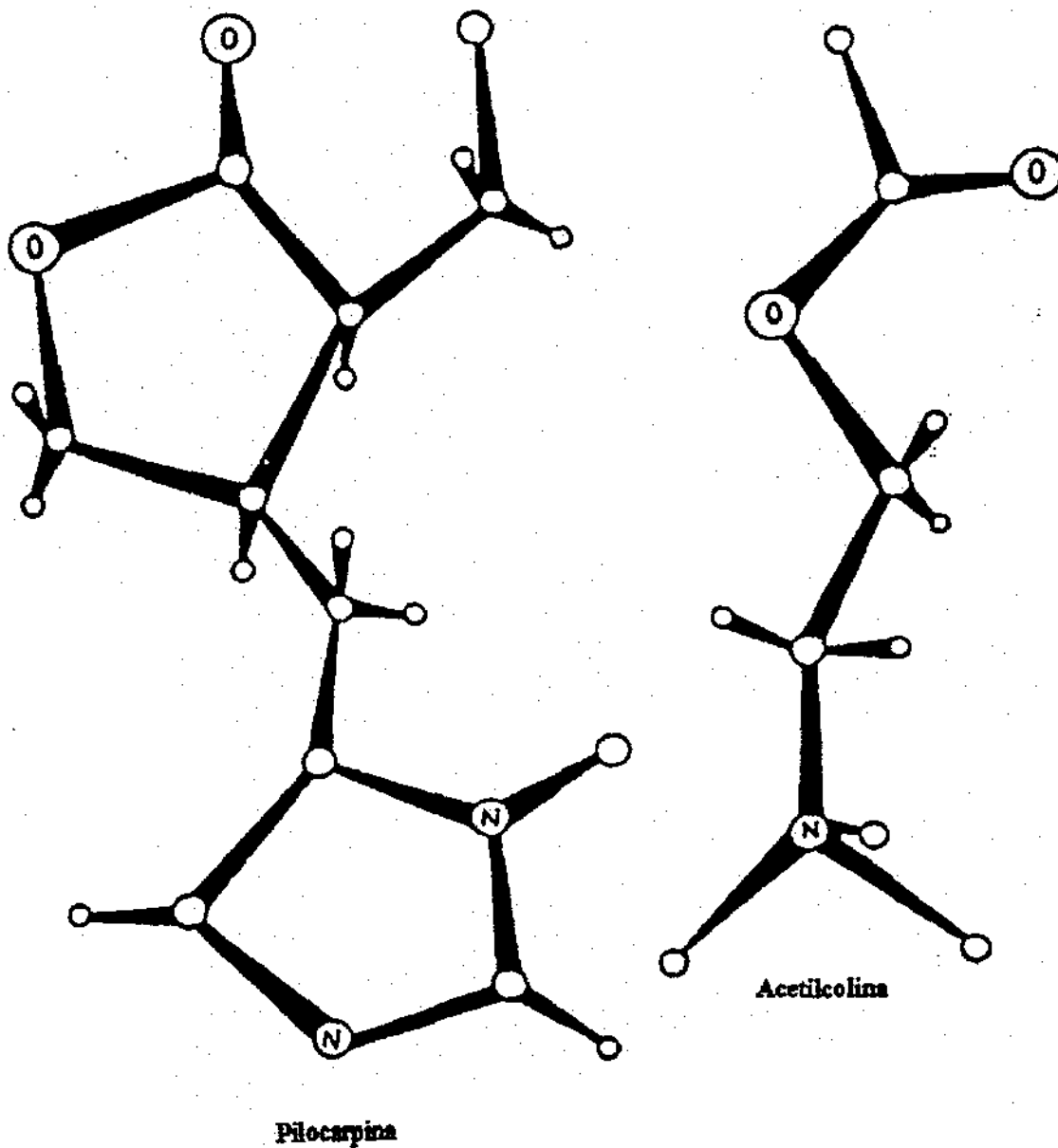


Figura 4. Relação espacial Acetilcolina e Pilocarpina (Aboul-Enein & Al-Badr<sup>2</sup>, 1982)

### **2.3.3. Propriedades Farmacológicas**

#### **2.3.3.1. Músculo Liso.**

Os alcalóides muscarínicos estimulam os músculos lisos do trato intestinal, aumentando assim o tônus e a motilidade. A pilocarpina tem um efeito purgativo em doses abaixo da dose letal e é clinicamente utilizada para relaxamento intestinal após laparotomia (TSURUMI et al.<sup>161</sup>, 1979). A pilocarpina também aumenta o tônus e a motilidade dos ureteres, da bexiga, da vesícula biliar e ductos biliares (ORDWAY et al.<sup>111</sup>, 1986; COOK et al.<sup>32</sup>, 1987). MINETTE & BARNES<sup>92</sup> (1988) e AAS & MACLAGAN<sup>1</sup> (1990) desenvolveram um modelo com vias aéreas *in vitro* de humano, traquéia de cobaia e rato, utilizando a pilocarpina para estimular a musculatura brônquica. Esses mesmos autores concluíram que os receptores muscarínicos pre-juncionais que inibem a liberação da acetilcolina estão presentes tanto na via aérea de humano quanto na traquéia de cobaia e do rato, e que estes receptores são do tipo M2.

#### **2.3.3.2 Sistema Ocular**

##### **Pressão Intra-Ocular**

A pressão intra-ocular do olho normal permanece quase constante durante toda a vida, o que mostra que o mecanismo regulador da pressão é muito eficaz.

Os nervos parassimpáticos oculares enervam o músculo constritor das pupilas, que passa circunferencialmente na íris, e o músculo ciliar, que se ajusta à curvatura do cristalino (Figura 5) (LEOPOLD & DUZMAN<sup>74</sup>, 1986).



O humor aquoso é secretado lenta e continuamente pelas células do epitélio que recobrem o corpo ciliar, sendo removido continuamente por drenagem para o canal de Schlemm (Figura 5), que passa ao redor do olho próximo à borda externa da íris. A pressão intra-ocular normalmente é de 10 a 15 mmHg maior que a pressão atmosférica, o que mantém o olho ligeiramente distendido (LEOPOLD & DUZMAN<sup>74</sup>, 1986). A elevação anormal da pressão intra-ocular pode lesar o olho de forma irreversível – por distensão da câmara esclerótica e causando deslocamento da retina (YANG et al.<sup>181</sup>, 1997).

Em alguns indivíduos, a drenagem de humor aquoso é impedida quando a íris é dilatada, porque as dobras do tecido da íris fecham o ângulo de drenagem, portanto, elevando a pressão intra-ocular (MONTEIRO et al.<sup>95</sup>, 1982). A ativação do músculo constritor da pupila por agonistas muscarínicos, nessas circunstâncias, reduz a pressão intra-ocular. A pilocarpina ativa os receptores muscarínicos pré-sinápticos inibitório no terminal do nervo simpático, causando miose e reduzindo o tônus simpático do músculo da íris dilatada (AKESSON et al.<sup>5</sup>, 1983; BOGNAR et al.<sup>21</sup>, 1988; SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989; OROZ et al.<sup>110</sup>, 1991). A pilocarpina reduz a pressão intra-ocular em poucos minutos e persiste por 4 a 8 horas. A irritação inicial, como: espasmo de acomodação, embaçamento transitório da visão, dor ocular, podem ser incômodas e deve-se ter cautela ao tratar pacientes com risco de deslocamento de retina, podendo causar cegueira irreversível (OLIVALVES et al.<sup>108</sup>, 1989; TANIGUCHI & KITAZAWA<sup>156</sup>, 1994; CROFT et al.<sup>35</sup>, 1996).

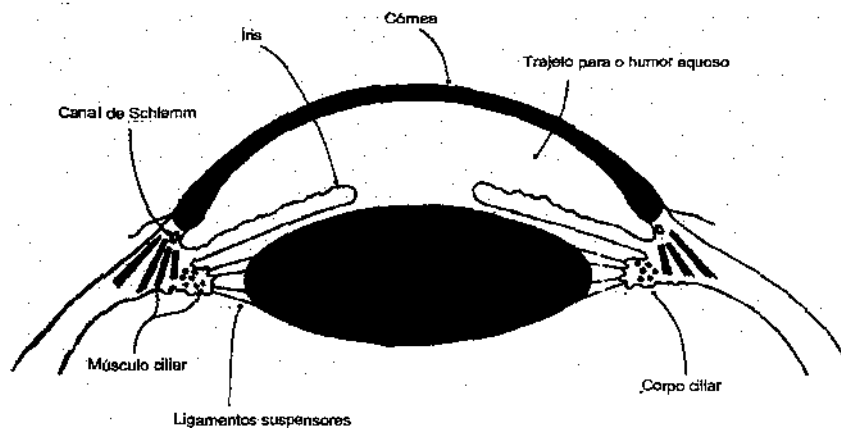


Figura 5. Câmara anterior do olho, mostrando a via para drenagem e secreção do humor aquoso (Rang & Dale<sup>84</sup>, 1991).

## **Glaucoma**

O glaucoma é uma doença do olho na qual a pressão intra-ocular torna-se patologicamente alta ( $> 22$  mmHg) e persistente, produzindo lesão do disco óptico na junção do nervo óptico com a retina, ou seja, resultando em atrofia da retina e do nervo óptico, além da cegueira (GREWE<sup>55</sup>, 1986).

Existem três tipos de glaucoma – primário, secundário e congênito – os agentes anticolinesterásicos são de grande valia no tratamento do glaucoma primário, bem como de certas do tipo secundário; o tipo congênito raramente responde a qualquer terapia, a não ser o tratamento cirúrgico (GREWE<sup>55</sup>, 1986). O glaucoma primário é subdividido em dois tipos: de ângulo fechado (agudo congestivo) e ângulo aberto (crônico simples), baseando-se na configuração do ângulo da câmara anterior onde ocorre reabsorção do humor aquoso (YANG et al.<sup>181</sup>, 1997).

A pilocarpina constitui o agente colinérgico padrão para o tratamento inicial do glaucoma de ângulo aberto e secundário.

No tratamento desses dois tipos de glaucoma, devem-se considerar as necessidades individuais do paciente na escolha da droga ou da associação de drogas a serem utilizadas na terapia (MONTEIRO et al.<sup>95</sup>, 1982; OLIVALVES et al.<sup>108</sup>, 1989; PUUSTJARVI & REPO<sup>130</sup>, 1992; OLIVEIRA & BETINJANE<sup>109</sup>, 1992; NYMAN<sup>106</sup>, 1993; ZADOK et al.<sup>182</sup>, 1994; TANIGUCHI & KITAZAWA<sup>156</sup>, 1994; ROBIN<sup>137</sup>, 1996).

### 2.3.3.3 Glândulas Exócrinas

A pilocarpina ativa os receptores colinérgicos M3 causando diaforese pronunciada em camundongos (2,5 e 5 mg/kg na sola). Esse efeito permanece estável por 45 min e decresce até o estado inicial do animal (GRANT et al.<sup>53</sup>, 1995; VILCHES et al.<sup>170</sup>, 1995).

A muscarina e a arecolina são também agentes diaforéticos potentes. Os efeitos colaterais podem incluir soluço, salivação, náuseas, vômitos, fraqueza e, em certas ocasiões, colapso. Esses alcalóides também estimulam as glândulas salivares, lacrimais, gástricas, pancreáticas e intestinais, bem como as células da mucosa do trato respiratório (GRANT et al.<sup>53</sup>, 1995; VILCHES et al.<sup>170</sup>, 1995)

Paralelamente, a pilocarpina também ativa os receptores colinérgicos M3 e alfa-1 das glândulas salivares (WISENAN & FAULDS<sup>178</sup>, 1995; CECANHO<sup>27</sup>, 1998).

A administração i.p. de cloridrato de pilocarpina nas doses 1 e 5 mg/kg em ratos induz vasodilatação e secreção salivar (SIVADJIAN<sup>151</sup>, 1975; RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993). Uma intensa salivação no período de 30 a 45 min foi observada quando se administra 8 ou 12 mg/kg de pilocarpina (BIXLER et al.<sup>20</sup>, 1958 ; SAGULIN et al.<sup>139</sup>, 1989).

Devido a seu efeito sialogogo, a pilocarpina é atualmente usada terapêuticamente em pacientes com xerostomia (GREENSPAN & DANIELS<sup>54</sup>, 1987; WYNN<sup>180</sup>, 1996; TAYLOR & HASHIMI<sup>157</sup>, 1996; LOCKHART et al.<sup>79</sup>, 1996; GARG & MALO<sup>47</sup>; 1997; GUCHELAAR et al.<sup>56</sup>, 1997).

#### **2.3.3.4. Sistema Cardiovascular**

Os efeitos cardiovasculares mais proeminentes, após a injeção intravenosa de doses extremamente pequenas (0,001 a 0,03 µg/kg) de muscarina em várias espécies, consistem em queda pronunciada da pressão arterial e bradicardia ou cessação temporária dos batimentos cardíacos. As ações da pilocarpina sobre o sistema cardiovascular ainda não foram explicadas satisfatoriamente. A injeção intravenosa de 0,1 mg/kg de pilocarpina produz breve queda de pressão arterial. Todavia, se a pilocarpina for precedida de uma dose apropriada de agente bloqueador nicotínico, ela produz acentuada elevação da pressão, porque a pilocarpina indiretamente ativa os adrenoreceptores  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 (WILFFERT et al.<sup>177</sup>, 1983). Tanto a resposta vasodepressora quanto a pressora são evitadas pela atropina; esse efeito pressor também é abolido por agentes bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos (WILFFERT et al.<sup>177</sup>, 1983; BRION et al.<sup>22</sup>, 1988; CECANHO<sup>27</sup>, 1998).

#### **2.3.3.5. Sistema Nervoso Central**

A injeção i.p. de cloridrato de pilocarpina nas doses entre 100-400 mg/kg é utilizada como modelo para induzir convulsões em ratos. Esse modelo envolve estudos que permitem avaliar o sistema colinérgico central (JOPE et al.<sup>62</sup>, 1986; TURSKI L. et al.<sup>162</sup>, 1986; CLIFFORD et al.<sup>30</sup>, 1987; TURSKI W.A. et al.<sup>163</sup>, 1987; PATEL et al.<sup>112</sup>, 1988; BARONE et al.<sup>13</sup>, 1992;

**BARONE et al.<sup>12</sup>, 1993; PRZEWLOCKA et al.<sup>129</sup>, 1994; PRIEL et al.<sup>128</sup>, 1996; RICE & DE LORENZO<sup>136</sup>, 1998).**

As doses entre 300-400 mg/kg (i.p.) de cloridrato de pilocarpina produz alterações comportamentais em ratos. Imediatamente após a injeção, surgem leve tremor, ataxia, salivação, movimentos intensos da mandíbula e queda, chegando a um estado epiléptico (350 mg/kg) no máximo em 60 min, e a dose de 400 mg/kg foi letal para os ratos (TURSKI W.A. et al.<sup>164</sup>, 1984; TURSKI L. et al.<sup>162</sup>, 1986; MASLANSKI et al.<sup>87</sup>, 1994). TURSKI L. et al.<sup>162</sup> (1986) e MASLANSKI et al.<sup>87</sup> (1994) observaram que em doses baixas (200 mg/kg) imediatamente após a injeção, os animais entram em estado cataléptico. Leves tremores da cabeça, movimentos mioclônicos ocasionais, coceira e bater dos dentes são comportamentos observados. Entretanto, essa atividade decresce dentro de 30-45 min, não se desenvolvendo, nessa dose, o estado epiléptico.

#### **2.3.4. Toxicologia**

A intoxicação por pilocarpina, muscarina e arecolina caracteriza-se principalmente pela exacerbação de seus vários efeitos parassimpatomiméticos, causando salivação, lacrimejamento, náuseas, vômitos, cefaléia, distúrbios visuais, cólicas abdominais, diarréia, broncoespasmo, bradicardia, hipotensão e choque. O tratamento consiste na administração de drogas antimuscarínicas, tais como; atropina, derivados de amônio quaternário de escopolamina, derivados de amina terciária e os antimuscarínicos seletivos (QUOCK et al.<sup>132</sup>, 1986; MASLANSKI et al.<sup>87</sup>, 1994; SHIMAZU et al.<sup>148</sup>, 1996). A DL<sub>50</sub> (203mg/kg) do cloridrato de pilocarpina caracteriza-se também pelo aumento dos efeitos parassimpatomiméticos, e chegando a um estado epiléptico causando mortes (SIGMA CHEM. Co.<sup>150</sup>, 1997).

### 2.3.5. Preparações

As preparações de pilocarpina incluem soluções oftálmicas de cloridrato e nitrato de pilocarpina. Em geral, as soluções de cloridrato de pilocarpina usam polímeros como a metilcelulose ou polímero semelhante (hidroxietilcelulose) para controlar a liberação da solução pelo fluxo lacrimal (MESEGUER et al.<sup>91</sup>, 1996) e estão disponíveis com diversos nomes comerciais, em concentrações que variam de 0,25 a 10%, enquanto as concentrações das soluções de nitrato de pilocarpina variam de 1 a 4%. Dispõe-se também no mercado, de associações de pilocarpina e adrenalina. Essa associação é utilizada no tratamento do glaucoma simples, aumentando a facilidade de drenagem através da ativação dos receptores adrenérgicos nos canais de drenagem. A fisostigmina associada com pilocarpina é muito eficaz na manutenção aguda e a longo prazo do glaucoma simples crônico, glaucoma secundário e glaucoma congestivo agudo. Seus efeitos duram de 12 a 36 horas (GRANT<sup>52</sup>, 1969; POTTER<sup>123</sup>, 1981).

### 2.3.6. Usos Terapêuticos

O jaborandi é utilizado na terapêutica como sudorífero nas nefrites com uremia e na hidropisia; como sialogogo em diversos estados mórbidos (HOLMSTEDT et al.<sup>60</sup>, 1979). Em dermatologia é usado como tônico capilar para evitar a queda de cabelo (GANGAROSA et al.<sup>46</sup>, 1995). As folhas de jaborandi são usadas sob forma de pó, infusão, tintura e extratos (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

A pilocarpina é utilizada no tratamento de glaucoma, em que é geralmente administrada sob a forma de solução aquosa entre 0,5 e 4,0 %. A ação miótica da pilocarpina é útil para corrigir a midríase produzida pela atropina; alternada com midriáticos, a pilocarpina é empregada para impedir a

formação de aderência entre a íris e o cristalino (MONTEIRO et al.<sup>95</sup>, 1982; OLIVALVES et al.<sup>108</sup>, 1989; PUUSTJARVI & REPO<sup>130</sup>, 1992; OLIVEIRA & BETINJANE<sup>109</sup>, 1992; NYMAN<sup>106</sup>, 1993; ZADOK et al.<sup>182</sup>, 1994; TANIGUCHI & KITAZAWA<sup>156</sup>, 1994; ROBIN<sup>137</sup>, 1996).

A forma oral de pilocarpina, Salagen<sup>®16</sup> está sendo amplamente utilizada em pacientes com xerostomia, efeito colateral mais comum em radioterapia na cavidade oral e regiões do pescoço. O Salagen<sup>®</sup> está sendo utilizado na área odontológica como tratamento suporte nos sintomas secundários provenientes da xerostomia, como: dificuldade de mastigação, engolir, falar e o aumento de incidência de candidíase oral e cárie dental (GREENSPAN & DANIELS<sup>54</sup>, 1987; WYNN<sup>180</sup>, 1996; TAYLOR & HASHIMI<sup>157</sup>, 1996; LOCKHART et al.<sup>79</sup>, 1996; GARG & MALO<sup>47</sup>, 1997; GUCHELAAR et al.<sup>56</sup>, 1997).

---

<sup>16</sup> Tabletes de Salagen (cloridrato de pilocarpina), MGI Pharma, Inc.

### 3. PROPOSIÇÃO

Devido à escassez de informações na literatura, tanto sobre a química dos alcalóides secundários de *Pilocarpus microphyllus* Stapf., quanto sobre os seus efeitos farmacológicos, propôs-se neste trabalho identificar e determinar a estrutura do alcalóide secundário de maior concentração encontrado no *Pilocarpus microphyllus* Stapf. e avaliar alguns efeitos farmacológicos e toxicológicos em modelos preliminares.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Matéria-Prima Vegetal – Folhas de Jaborandi

Para a realização deste trabalho, utilizaram-se folhas de jaborandi, as quais foram processadas a fim de se executar as seguintes etapas desta pesquisa: 1) determinação dos alcalóides totais por teste em C.C.D.; 2) processo de extração e purificação dos alcalóides secundários determinados na análise anterior; 3) obtenção do cloridrato (sal) do alcalóide secundário extraído e purificado em maior escala e sua identificação química. Após essa fase denominada de química, o alcalóide secundário identificado foi submetido a testes farmacológicos como: 1) determinação da DL<sub>50</sub>, 2) avaliação ou “screening” Hipocrático e a 3) determinação do peso corporal dos animais sobreviventes da DL<sub>50</sub>.

As folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf utilizadas neste experimento foram colhidas nas regiões de ocorrência dos Estados do Maranhão, Pará e Piauí, sendo elas procedentes de: Região de Perneiras/Barra do Corda (MA), Serra dos Carajás/São Félix do Xingu (PA), Tocumã/São Félix do Xingu (PA), Arame (MA), Rio Primavera (lado direito)/São Félix do Xingu (PA), Rio Primavera (lado esquerdo)/São Félix do Xingu (PA) e Represa da Boa Esperança [(entre Uruçuí (PI) e Benedito Leite (MA)]. O período da colheita das folhas foi de junho a dezembro de 1995 e identificadas botanicamente como *P. microphyllus* Stapf, as quais foram doadas pelos grupos Sourcetek Química Ltda. e Phytosul Produtos Naturais Ltda.<sup>17</sup>. As excicatas correspondentes aos lotes de folhas doadas estão arquivadas nos Departamentos de Controle de

<sup>17</sup> Sourcetek Química Ltda e Phytosul Prod. Naturais Ltda são indústrias de capital nacional, cuja atividade principal é extração de princípios ativos de produtos naturais. Estão localizadas, respectivamente, em Pindamonhangaba e Águas de S. Pedro, SP, Brasil.

Qualidade das empresas mencionadas. O material vegetal utilizado foi seco à temperatura ambiente e armazenado em sacos plásticos no abrigo da luz à temperatura ambiente.

Doze amostras de folhas, procedentes das 7 regiões de colheita, foram utilizadas para determinação de A.T. e A.S. As folhas que apresentaram maior teor de A.S. foram selecionadas para serem processadas e estudadas nesta pesquisa.

As folhas secas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. foram moídas em moinho de facas e passadas por tamis n<sup>o</sup> IV de mesh 6mm (modelo MR-300). Amostras de 5 g de folhas moídas foram pesadas em duplicata e extraídas com 100 ml de diclorometano (Merck Co.) ou clorofórmio (Merck Co.), com agitação, por 5 min. Em seguida, adicionaram-se 5 ml de hidróxido de amônio 5% (Merck Co.) e agitou-se por 30 min. Filtrou-se a mistura para um funil de separação contendo 25 ml de ácido sulfúrico a 5% (Merck Co.). Após agitação, as fases foram separadas e a fase orgânica transferida para um segundo funil de separação contendo 25 ml de ácido sulfúrico 2,5 %. As fases aquosas ácidas foram reunidas e recolhidas num terceiro funil de separação contendo 50 ml de diclorometano ou clorofórmio. (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

O resíduo da extração das folhas foi novamente extraído como descrito anteriormente. As fases ácidas foram reunidas com as da primeira extração no terceiro funil de separação da primeira extração, o qual continha 50 ml de diclorometano ou clorofórmio (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

A fase ácida contida no terceiro funil de separação foi neutralizada com 25 ml de hidróxido de amônio P.A. (pH ~ 9,0). Após agitação e separação das fases, a fase orgânica foi evaporada em placa aquecedora. Ao final da evaporação foram retirados 2,0 µl da solução para análise por C.C.D. contra os padrões de cloridrato de pilocarpina (Sigma Chem.Co.) e nitrato de isopilocarpina (Sigma Chem.Co.). O resíduo da evaporação foi resfriado,

adicionado de 15 ml de ácido sulfúrico 0,05 N, 5 gotas de indicador de vermelho de metila e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,05 N (Merck Co.) (COSTA<sup>34</sup>, 1967).

A fórmula para calcular a porcentagem de alcalóides totais descrita na **PHARMACOPOEIA HELVETICA<sup>114</sup> (PHARM. HELV) (1978)** é dada como:

$$\% \text{ A.T.} = \frac{(V_{\text{ácido}} - V_{\text{base}}) \times 0,01043 \times 100}{\text{massa da amostra (g)}}$$

onde,  $V_{\text{ácido}}$  = volume de ácido sulfúrico (15 ml) e  $V_{\text{base}}$  = volume gasto na titulação com NaOH.

O procedimento da determinação de alcalóides totais está apresentado no forma de um fluxograma na Figura 6.

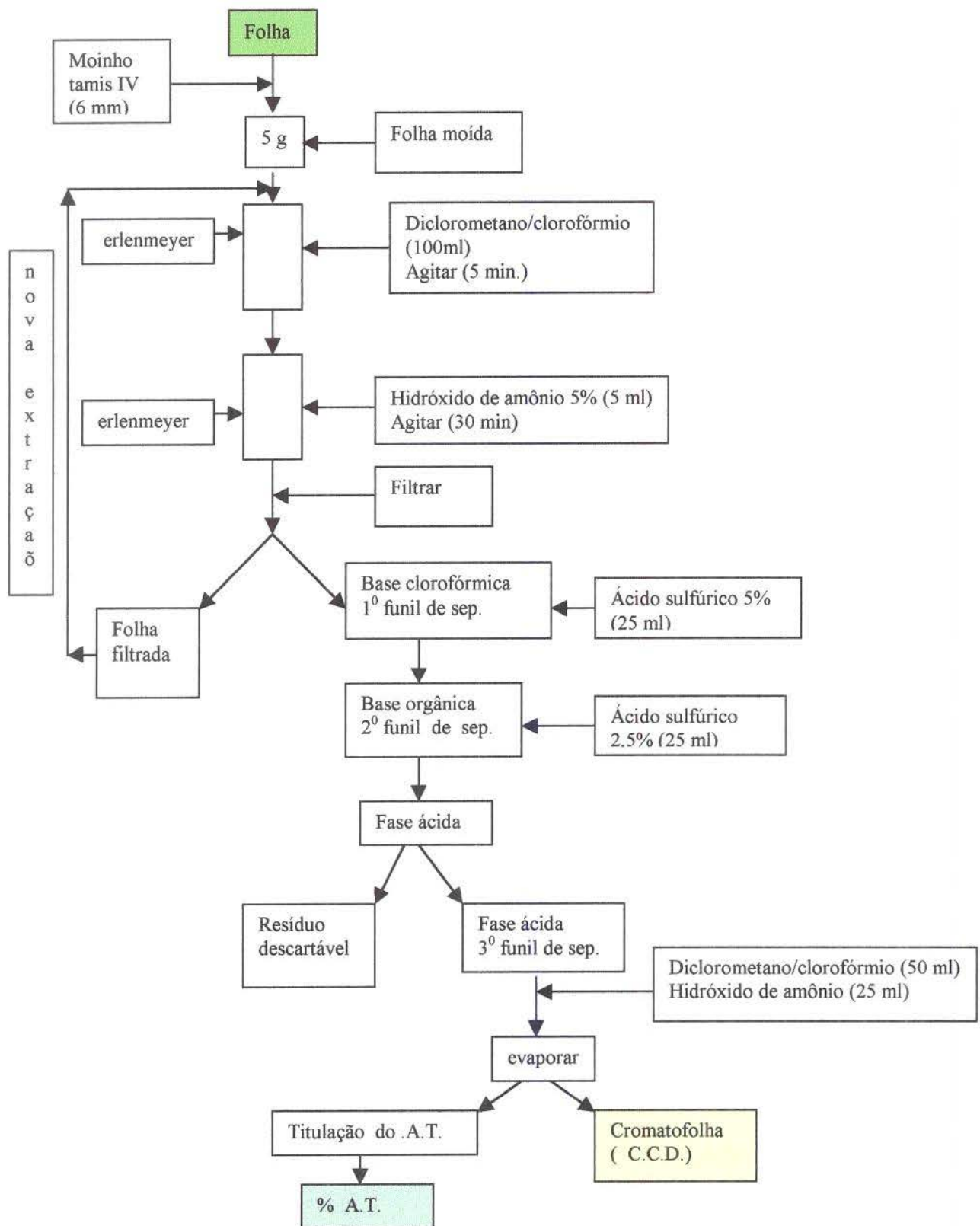


Figura 6. Fluxograma da determinação de alcalóides totais.

## 4.2. Teste em Cromatografia de Camada Delgada (C.C.D.)

Após a determinação dos alcalóides totais, a metodologia de C.C.D. é empregada para separação e identificação dos alcalóides devido a sua eficiência e rapidez de desenvolvimento (BASSET et al.<sup>14</sup>, 1981; COLLINS<sup>31</sup>, 1993). Aplicaram-se separadamente em cromatofolha de alumínio de sílica gel<sub>60</sub> com fluorescência (E.Merck – Darmstadt - art. 5554) 2,0 µl de cada solução extraída no processo descrito anteriormente. Desenvolveu-se o cromatograma por 15 cm, sendo a fase móvel uma mistura de hidróxido de amônio, metanol e diclorometano na proporção 1 : 14 : 85 (v/v/v). O cromatograma foi seco a 100 - 105 °C por 10 min; resfriado até a temperatura ambiente e pulverizado com uma solução de iodobismutato de potássio (Merck Co.) e, em seguida, com uma solução de peróxido de hidrogênio (Merck Co.) para revelação e identificação dos alcalóides totais (EUR. PH.<sup>42</sup>, 1981; F. BRAS.<sup>43,44</sup>, 1988, 1996). O resultado do cromatograma foi avaliado segundo método desenvolvido por SHARAPIN<sup>18</sup> (1972)

## 4.3 Processo de Extração e Purificação do Alcalóide Secundário

Para a extração em escala industrial foi elaborado um processo que pode ser aplicado à maioria dos alcalóides de interesse terapêutico. O processo consiste em extrair a matéria-prima vegetal com solução aquosa de ácidos inorgânicos, purificação da miscela pelo tratamento com agentes de precipitação e extração da miscela purificada e alcalinizada com solventes clorados, como já é convencional nos processos clássicos de purificação de alcalóides (LUCIO et al.<sup>83,84</sup>, 1997, 1998)<sup>19</sup>.

<sup>18</sup> Protocolo laboratorial desenvolvido na empresa Merck Produtos Vegetais S. A., São Luís, MA, 1972.

<sup>19</sup> Processo com Patentes: US Patent 5.684.155 e European Patent 0707589.

No presente trabalho foram utilizados 10 kg de folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf, que foram triturados em moinho de facas passadas sobre tamís n<sup>o</sup> IV de mesh 6mm (modelo MR-300). A matéria-prima foi extraída duas vezes, cada vez com 60 litros de uma solução aquosa de ácido sulfúrico a 2 % (LUCIO et al.<sup>83,84</sup>, 1997, 1998).

A análise por C.C.D. do resíduo de extração revelou apenas traços de alcalóides, indicando que a extração foi completa. O extrato ácido foi neutralizado até pH 6,5, com soluções de hidróxido de cálcio (Merck Co.) e hidróxido de amônio, e filtrado. A seguir neutralizou-se o extrato com uma solução 0,3% de sulfato de alumínio (Merck Co.) O extrato ficou decantando por 5 horas e então filtrado. A “lama” resultante, contendo precipitados de sulfato de cálcio e hidróxido de alumínio, foi lavada com água (seis vezes o peso da lama ). Após a decantação, o líquido sobrenadante foi separado, filtrado e reunido com o extrato filtrado. O pH do extrato foi elevado a 9,5 com hidróxido de amônio e, a seguir, foi feita uma extração com diclorometano. Finalmente, o extrato diclorometânico foi concentrado em rotavapor (Evaporador Rotatório – Buchner- Instruments, Inc.), a 45 °C, obtendo-se a base concentrada ( LUCIO et al.<sup>83,84</sup>, 1997, 1998).

#### 4.4. Obtenção do Cloridrato do Alcalóide Secundário.

A base concentrada obtida no processo descrito acima foi dissolvida numa mistura de metanol P.A. (Merck Co.) e acetona P. A. (Merck Co.) 97 : 3 (volume oito vezes o peso da base). A solução foi resfriada a 0 °C, borbulhando-se gás clorídrico (White Martins) até atingir pH 4,0, sob agitação constante e mantendo a temperatura abaixo de 40 °C. Obteve-se um precipitado volumoso de cloridratos de alcalóides, o qual foi filtrado, dissolvido em metanol (volume oito vezes o peso do sal) e recristalizado, obtendo-se o cloridrato do alcalóide

secundário. As impurezas (cloridratos de pilocarpina e de outros alcalóides) permanecem na solução.

Os procedimentos do processo de extração, purificação e obtenção do alcalóide secundário estão apresentados na forma de um fluxograma de acordo com a Figura 7.

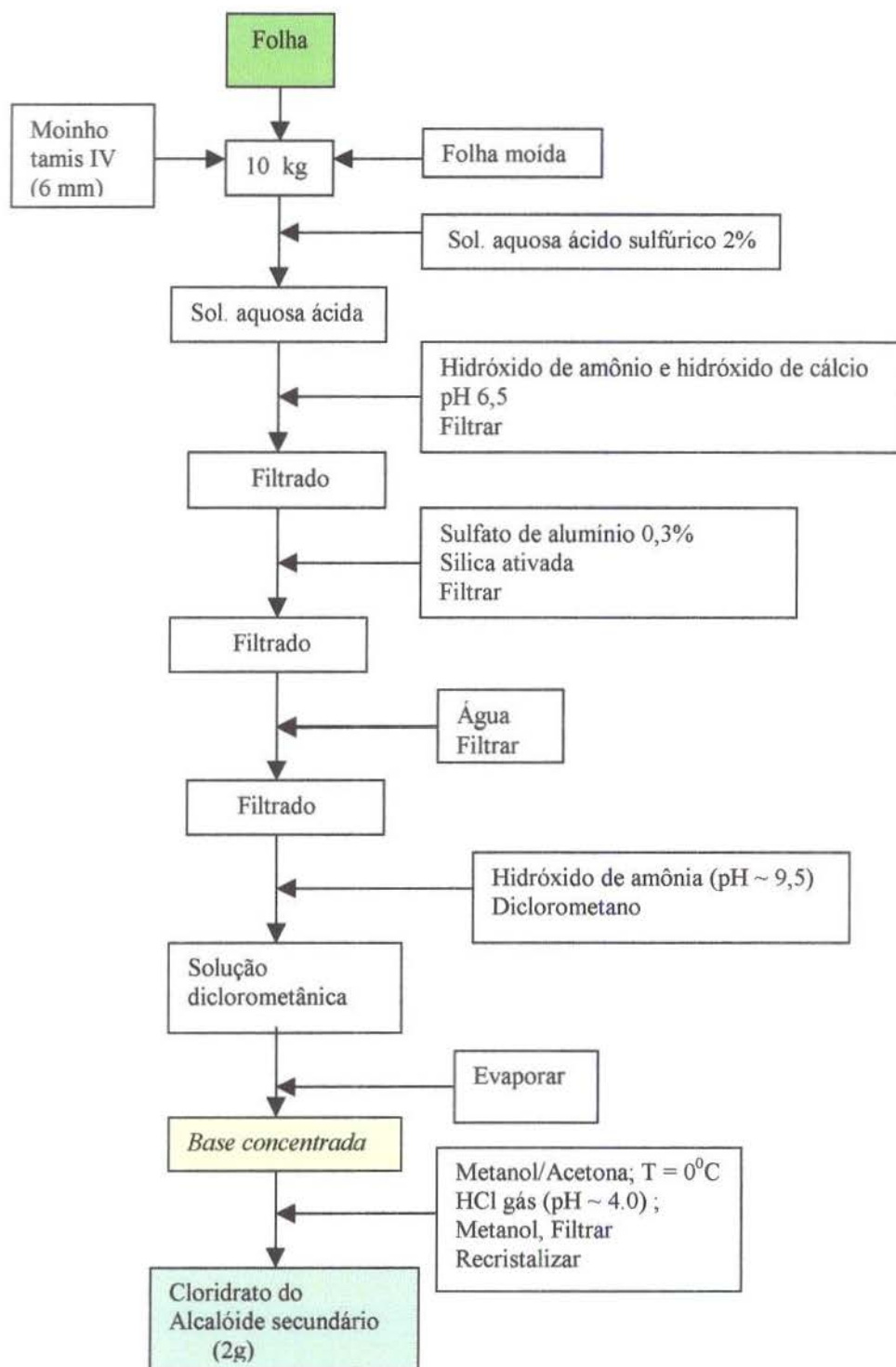


Figura 7. Fluxograma do processo de extração, purificação e obtenção do alcalóide secundário



#### 4.5. Identificação Química do Cloridrato do Alcalóide Secundário.

O cloridrato do alcalóide secundário puro, solúvel em água, foi submetido a processos de determinação da estrutura química. Para essa determinação foram feitas análises de: absorção no infravermelho, e ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Foi determinada, ainda, a faixa de fusão.

Os espectros de absorção no infravermelho (I.V.) foram obtidos entre  $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ , registrados em espectrofotômetro Perkin - Elmer, modelo 1420. A técnica utilizada na preparação das amostras para a região descrita acima foi a da pastilha de KBr (F. BRAS.<sup>42</sup>, 1988).

A faixa de fusão foi determinada em tubo capilar num aparelho digital Uni - Melt (Thomas Hoover - Capillary Melting Point Apparatus, Philadelphia P.A., USA). Essa determinação foi realizada em triplicata e o resultado expresso na forma de faixa de fusão (valores mínimo e máximo) (F. BRAS.<sup>42</sup>, 1988).

Os espectros de ressonância magnética nuclear próton (R.M.N.  $^1\text{H}$ ) e de carbono - 13 (R.M.N.  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos dissolvendo-se o padrão de cloridrato de pilocarpina e o cloridrato do alcalóide secundário em dimetilsulfóxido (DMSO) (100mg/0,5ml) (Merck Co.) deuterado usando tubos de 10 mm. Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (R.M.N.  $^1\text{H}$ ) foram registrados em aparelho Varian modelo Gemini-200 (200 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (ppm), utilizando como padrão interno dimetilsulfóxido (DMSO). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz). Os sinais foram caracterizados como: s = singlete, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto, dd = duplo dubleto, ddd = duplo duplo dupleto, dt = duplo tripleto, dq = dupleto de quarteto. Os espectros usados para os cálculos foram obtidos à temperatura ambiente, com seqüência de pulso de 45 graus, largura espectral 1959,6 Hz e tempo de aquisição 2,6 segundos.

Os espectros de ressonância nuclear magnética (R.M.N.) de carbono –  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em aparelho Varian modelo Gemini-200 (200 MHz). Os deslocamentos químicos R.M.N.  $^{13}\text{C}$  foram registrados em ppm, utilizando como padrão interno DMSO.

A interpretação dos dados de R.M.N.  $^{13}\text{C}$  foi realizada com a ajuda da técnica DEPT 135 e DEPT 90 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), onde:  $\text{CH}_3 / \text{CH} =$  sinal positivo (+),  $\text{CH}_2 =$  sinal negativo (-), C (não ligado ao hidrogênio) = sinal de C quart. = ausente, intensidade zero e confirmada por espectro bidimensionais: HETCOR (correlações de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação) e COSY (correlações homonucleares  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ). Os espectros usados para os cálculos foram obtidos usando-se temperatura de  $55\text{ }^\circ\text{C}$  e seqüência de pulso: primeiro pulso 180 graus e o segundo pulso de 45 graus, largura espectral 14992,5 Hz e tempo de aquisição 1,0 segundos. (BENN & GÜNTER<sup>19</sup>, 1983).

#### 4.6. Animais

Foram utilizados 250 camundongos (espécie *Mus musculus*) machos, linhagem Swiss spf, provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), e do Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura - Campinas-S.P. (LARA), pesando de 28 a 30 g, idade 21 – 22 dias, os quais foram alimentados com ração Labina - Purina e água *ad libitum*. No período de adaptação, os animais foram mantidos na sala de testes do biotério do Instituto de Biologia da UNICAMP por, pelo menos, 7 dias antes do início do ensaio para adaptação. Todos os experimentos foram realizados em condições à temperatura ambiente.

#### 4.7. Determinação da DL<sub>50</sub>

Dose letal mediana ou DL<sub>50</sub> é a dose que causa morte de 50% de animais em um ensaio, num determinado período de tempo (VALLE et al.<sup>167</sup>, 1988; SOUZA BRITO<sup>152</sup>, 1995). A toxicidade aguda ou dose simples representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma droga, resultantes de uma exposição de curta duração pela via selecionada (VALLE et al.<sup>167</sup>, 1988; SOUZA BRITO<sup>152</sup>, 1995). Os animais foram deixados em jejum por 24 horas antes da administração das soluções teste e controle por via intraperitoneal (i.p.). Foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 animais por gaiola para cada dose. A seguir, cada animal foi pesado (balança digital eletrônica Petit Balance - modelo MK 500C), sendo considerada uma casa após a vírgula. Após a pesagem, foi feito o cálculo da dose para cada animal. As injeções foram feitas intraperitonealmente, com uso de seringas e agulhas 13 x 4,5 ( marca Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda.).

Para o padrão USP<sup>165</sup> (1995) de cloridrato de pilocarpina (Sigma Chem. Co.) as doses administradas i.p. foram: 4, 40, 120, 180, 240, 300 e 400 mg/kg, sendo que para o cloridrato do alcalóide secundário as doses administradas foram: 4, 40, 120, 180, 240, 300, 400, 600, 800, 1000 mg/kg de peso corporal. O tempo de observação para verificação de ocorrência de morte dos animais foi de 48 horas (ARAÚJO et al.<sup>8</sup>, 1994). O número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado e a DL<sub>50</sub> foi calculada pelo método de LITCHFIELD & WILCOXON<sup>78</sup> (1949). Os animais do grupo controle receberam solução de NaCl 0,9% (Merck Co.) i.p. no volume de 10 ml/kg de peso corporal.

O número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado e a DL<sub>50</sub> (LOOMIS<sup>80</sup>, 1975) calculada pelo método de LITCHFIELD & WILCOXON<sup>78</sup> (1949), utilizando o “software” Probit (FUNG<sup>45</sup>, 1989).

#### **4.8. Determinação do Peso Corporal**

Os animais sobreviventes da determinação da DL<sub>50</sub>, foram pesados e observados a cada 24 horas até o 14<sup>o</sup> dia após os tratamentos, para verificação de possíveis efeitos tardios da(s) substância(s) e para determinar a evolução da perda ou ganho de peso corporal. Os efeitos médios foram obtidos a partir dos dados anotados individualmente (ARAÚJO et al.<sup>8</sup>, 1994). Os dados relativos ao peso corporal entre os grupos que receberam cloridrato de pilocarpina, cloridrato de alcalóide secundário (teste) e solução de cloreto de sódio a 0,9 % (controle), receberam um tratamento estatístico, através da ANOVA e teste de Tukey-Kramer HSD, usando o “software” para estatística JMP versão 3.1 (SAS INSTITUTE INC.<sup>142</sup>, 1995).

#### **4.9. Avaliação ou "Screening" Hipocrático**

A avaliação ou “screening” Hipocrático fornece uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida biologicamente. Esse método baseia-se no critério observacional qualitativo e semi-quantitativo e nas avaliações feitas a partir dos efeitos produzidos por uma substância desconhecida sobre: estado consciente e disposição (I), atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II), reflexos (III), atividades sobre o sistema nervoso central (IV) e sistema nervoso autônomo (V) (MALONE & ROBICHAUD<sup>89</sup>, 1962; MALONE<sup>88</sup>, 1983).

Os parâmetros farmacológicos (Anexo 3), que podem tanto estimular ou causar depressão do sistema nervoso central, são avaliados com índice de 4 a 0 para depressão e 4 a 8 para estimulação. A técnica adotada neste experimento para a avaliação ou “screening” Hipocrático foi de acordo com as descrições de

**MALONE & ROBICHAUD<sup>89</sup>, 1962** e **MALONE<sup>88</sup>, 1983**, com algumas modificações descritas a seguir.

O teste foi realizado em grupos contendo 7 camundongos, para cada nível de dose. Os animais foram mantidos em jejum de, no mínimo, 15h antes da administração de soluções padrão (cloridrato de pilocarpina, Sigma Chem. Co.) e teste (alcalóide secundário obtido). As soluções foram administradas via i.p. nas doses: 4, 40, 120, 180, 240, 300, 400 mg/kg para o padrão de cloridrato de pilocarpina, sendo que para o cloridrato do alcalóide secundário as doses administradas foram: 4, 40, 120, 180, 240, 300, 400, 600, 800, 1000 mg/kg de peso corporal e o grupo controle recebeu solução de NaCl 0,9% (Merck Ind. Quim. S.A), i.p., no volume de 10ml/kg de peso corporal. As avaliações foram feitas em 30 min; 1; 2; 4; 24 e 48 horas após a administração das soluções (ARAÚJO et al.<sup>8</sup> 1994). Posteriormente, a cada 24 horas, os animais foram observados até o 14<sup>o</sup> dia, para verificação de possíveis efeitos tardios das substâncias.

Nos tempos determinados para cada dose estabelecida, para avaliar os efeitos farmacológicos das soluções padrão e teste, foram observados os parâmetros farmacológicos segundo descrito por **MALONE & ROBICHAUD<sup>89</sup>, 1962**), a saber: (I) Estado Consciente e Disposição – 1. Atividade geral; 2. Frênilo vocal e 3. Irritabilidade; (II) Atividade e Descoordenação do Sistema Motor e Tônus Muscular – 1. Resposta ao toque; 2. Resposta ao aperto da cauda; 3. Contorção; 4. Posição do trem posterior; 5. Reflexo de endireitamento; 6. Tônus do corpo; 7. Força para agarrar e 8. Ataxia; (III) Reflexos – 1. Auricular e 2. Corneal; (IV) Atividade do Sistema Nervoso Central; 1. Tremores; 2. Convulsões; 3. Estimulações; 4. Ereção da cauda; 5. Hipnose e 6. Anestesia; (V) Atividade Autônoma – 1. Lacrimação; 2. Ptosis; 3. Micção; 4. Defecação; 5. Piloereção; 6. Hipotermia; 7. Respiração e 8. Cianose (Anexo 3).

A análise observacional dos animais foi conduzido de modo simples cego, e os valores médios dos efeitos foram obtidos a partir das observações individuais dos animais em cada grupo (**MALONE & ROBICHAUD**<sup>89</sup>, 1962; **CARLINI**<sup>26</sup>, 1972; **ARAÚJO et al.**<sup>8</sup>, 1994).

## 5. RESULTADOS

Para melhor apresentação dos resultados obtidos, inicialmente serão descritos os dados relativos às análises de identificação química do padrão de cloridrato pilocarpina e alcalóide secundário e, em seguida, serão abordados os dados obtidos da determinação da dose letal (DL<sub>50</sub>), determinação do peso corporal e avaliação ou “screening” Hipocrático.

### 5.1. Identificação Química do Alcalóide Secundário

#### 5.1.1. Determinação de Alcalóides Totais (A.T.)

Os resultados obtidos das determinações de A.T. de folhas de *P. microphyllus* Stapf. provenientes de diversas regiões de ocorrência, permitiram selecionar folhas com altos teores de alcalóides secundários. A Tabela 1 compara os resultados obtidos entre os A.T. e os teores de Pilocarpina/ A.S. obtidos por C.C.D. de folhas de *P. microphyllus* Stapf. de diversas regiões de ocorrência e expressos em porcentagem.

Tabela 1. Alcalóides Totais e relação entre teores de pilocarpina e alcalóides secundários (C.C.D.) de folhas provenientes de diversas regiões de ocorrência.

Procedência* das folhas	A.T. Pilocarpina/A.S.	
	(%)	(%)
	1,03	80/20
Região de Perneiras/Barra do Corda (MA)	0,62	70/30
	1,13	60/40
Serra dos Carajás/ São Felix do Xingú (PA)	1,07	30/70
Tocumã/ São Felix do Xingú (PA)	0,47	70/30
	1,06	70/30
Arame (MA)	0,49	70/30
	0,51	70/30
Rio Primavera (lado direito)/São Felix do Xingú (PA)	0,61	70/30
	0,98	70/30
Rio Primavera (lado esquerdo)/São Felix do Xingú (PA)	1,14	70/30
Represa da Boa Esperança [entre Uruçuí (PI)e Benedito Leite (MA)]	0,61	20/80

\* distrito/município (estado)

(%) porcentagem de A.T. em relação ao peso de folhas secas.



As folhas procedentes da Represa da Boa Esperança [entre Uruçuí (PI) e Benedito Leite (MA)] apresentaram maior teor de A.S. (80%) dentre toda a amostragem de 7 localidades, embora sua concentração de A.T (0,61%) foi inferior aos teores encontrados nas folhas da Serra dos Carajás (PA) (1,07%), porém estas apresentaram menor teor de A.S. (70%). Essas folhas provêm de áreas indígenas, o que dificulta sua colheita em escala, razão pela qual não tenha sido estudada nesta pesquisa. As folhas das demais regiões apresentaram concentração de A.S. inferiores às da Represa da Boa Esperança [entre Uruçuí(PI) e Benedito Leite (MA)].

A Figura 8 mostra o resultado da cromatografia em camada delgada (C.C.D.) das folhas provenientes da região da Represa da Boa Esperança, as quais apresentaram maior teor de A.S.

Diante desses resultados as folhas procedentes da Represa da Boa da Esperança [entre Uruçuí (PI) e Benedito Leite (MA)] foram selecionadas para que os alcalóides secundários fossem extraídos, identificados e testados farmacologicamente, conforme proposta deste trabalho.

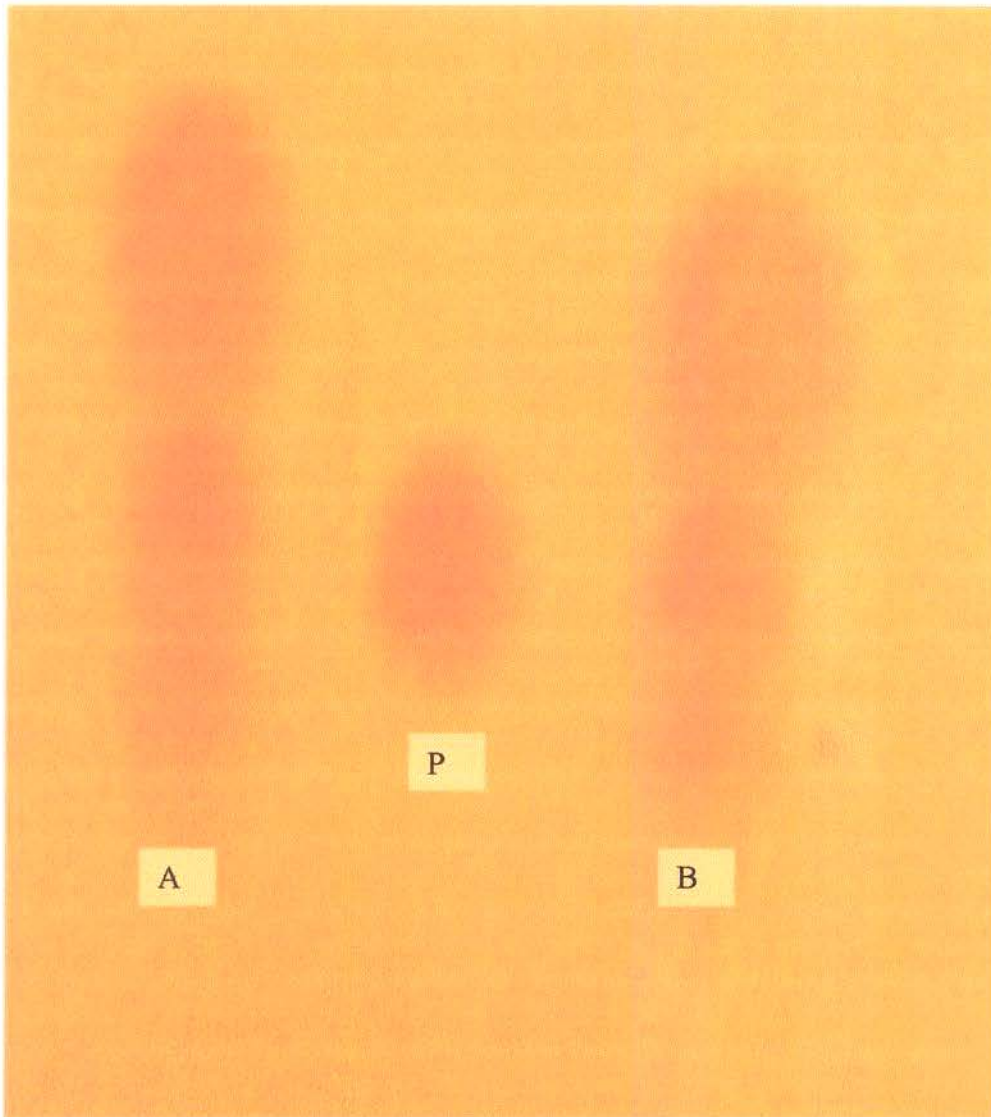


Figura 8. Cromatografia em camada delgada. A e B – amostra do extrato de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. (duplicata) proveniente das folhas procedentes da Represa da Boa Esperança; P – padrão de cloridrato de pilocarpina

### 5.1.2. Faixa de Fusão (P.F.)

A Tabela 2 compara os resultados obtidos com o A.S. extraído das folhas procedentes da Represa da Boa Esperança [entre Uruçuí (PI) e Benedito Leite (MA)] e o padrão de cloridrato de pilocarpina.

Tabela 2. Resultados das comparações das faixas de fusão (P.F.) em °C entre os dados da literatura e os obtidos para o padrão de cloridrato de pilocarpina e alcalóide secundário extraído.

Grupo Químico	P.F. (lit.)*	P.F. (exp.)
Pilocarpina base	34	33-34
Cloridrato pilocarpina	199-205	204-205
Alcalóide secundário base	-	184-186
Cloridrato alcalóide secundário	-	216-218

\* P.F. (lit.) = Al-Badr & Aboul-Enein<sup>6</sup> (1983) para Pilocarpina base e USP<sup>165</sup> (1995) para o Cloridrato de pilocarpina.

A pilocarpina base e cloridrato apresentaram valores de faixa de fusão (P.F.) de acordo com a literatura (Tabela2).

Os P.F. tanto para o A.S. base quanto para o cloridrato do alcalóide secundário diferem dos valores de P.F. da pilocarpina base e cloridrato de pilocarpina.

### 5.1.3. Infravermelho (I.V.)

A Tabela 3 e as Figuras 9, 10 e 11 mostram as diferenças e semelhanças entre o padrão de cloridrato de pilocarpina, pilosina e o A.S. extraído, comparando-os a partir das frequências (ou comprimento de onda) obtidas.

Tabela 3. Comparação entre as frequências ( $\text{cm}^{-1}$ ) do padrão de cloridrato de pilocarpina, pilosina (lit.) e o alcalóide secundário extraído.

	Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
Cloridrato de pilocarpina	3078; 3028	N-CH <sub>3</sub> (Quat.) e CH aromático
	1766	C = O (anel lactona de 5 membros)
	1611	C = C (anel aromático)
Pilosina (lit.)	3328; 3300	N-CH <sub>3</sub> (Quat.) e CH aromático
	3112	OH
	1753	C = O (anel lactona de 5 membros)
Alcalóide secundário extraído	3340; 3305	N-CH <sub>3</sub> (Quat.) e CH aromático
	3117	OH
	1751	C = O (anel lactona de 5 membros)
	1623	C = C (anel aromático)

Pilosina (lit.) – Voightländer & Rosenberg<sup>171</sup> (1959) e Tedeschi et al.<sup>159</sup> (1974).

Os valores das frequências atribuídos para o cloridrato de pilocarpina e para a pilosina (lit.) são: N-CH<sub>3</sub> e CH aromático (3078  $\text{cm}^{-1}$ - 3028  $\text{cm}^{-1}$ ; 3328  $\text{cm}^{-1}$  e 3000  $\text{cm}^{-1}$ ), respectivamente; OH - pilosina (3112  $\text{cm}^{-1}$ ); C = O (1766  $\text{cm}^{-1}$ ; 1753  $\text{cm}^{-1}$ ), respectivamente ; C = C – pilocarpina (1611  $\text{cm}^{-1}$ ) e os valores das frequências obtidas para o alcalóide secundário extraído foram: N-CH<sub>3</sub> e CH aromático (3340  $\text{cm}^{-1}$  e 3305  $\text{cm}^{-1}$ ); OH (3117  $\text{cm}^{-1}$ ); C = O (1751  $\text{cm}^{-1}$ ) e C = C (1623  $\text{cm}^{-1}$ ) (Tabela 3).

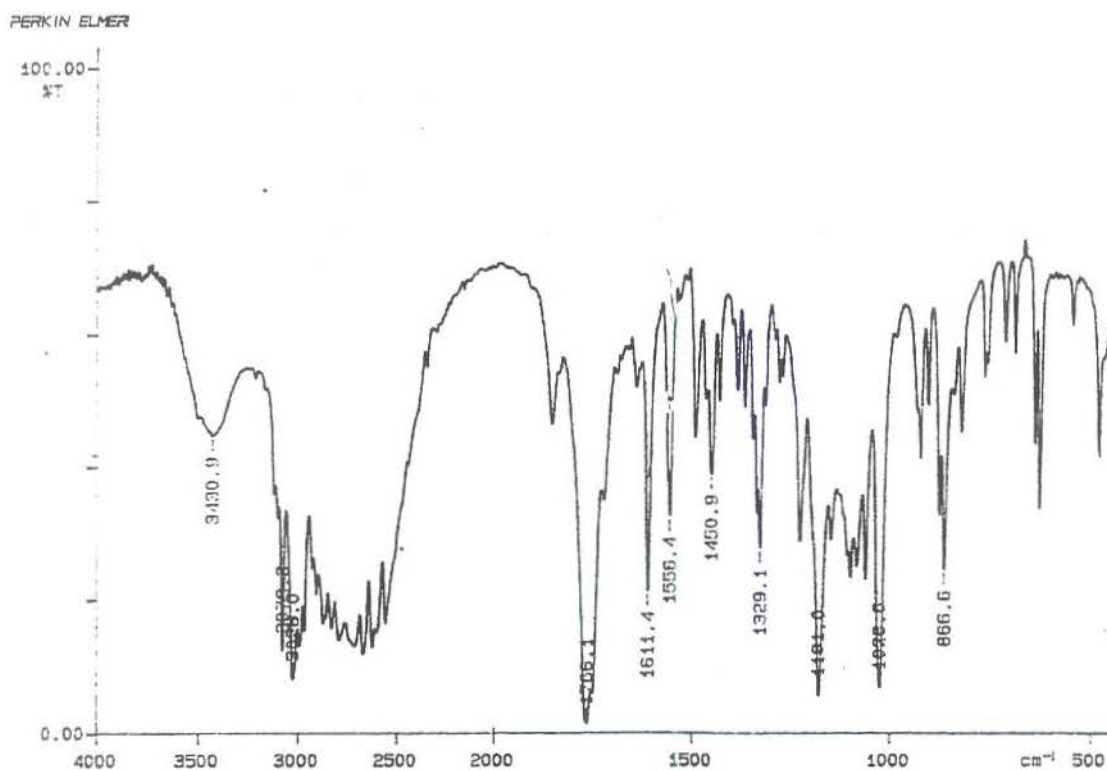


Figura 9. Espectro de I.V. do padrão de cloridrato de pilocarpina.

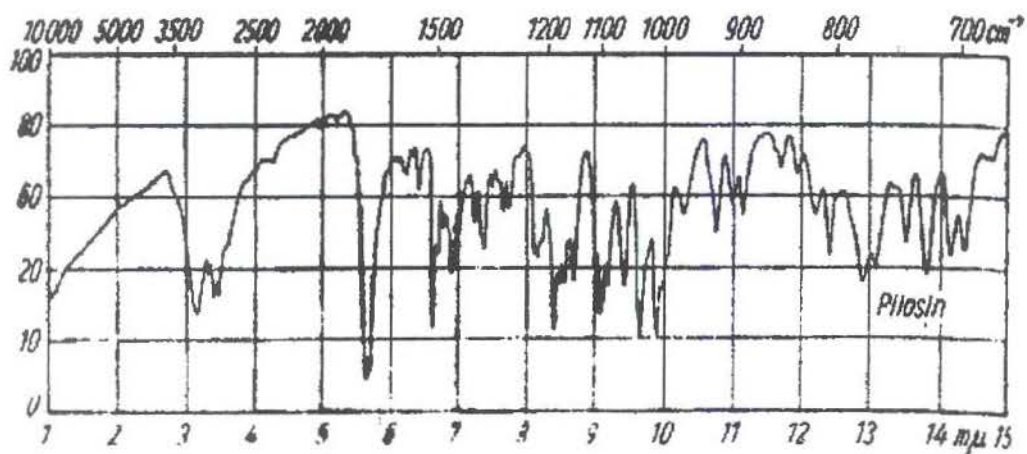


Figura 10. Espectro de I.V. da pilosina (Voigtländer & Rosenberg<sup>171</sup>, 1959; Tedeschi et al.<sup>159</sup>, 1974)

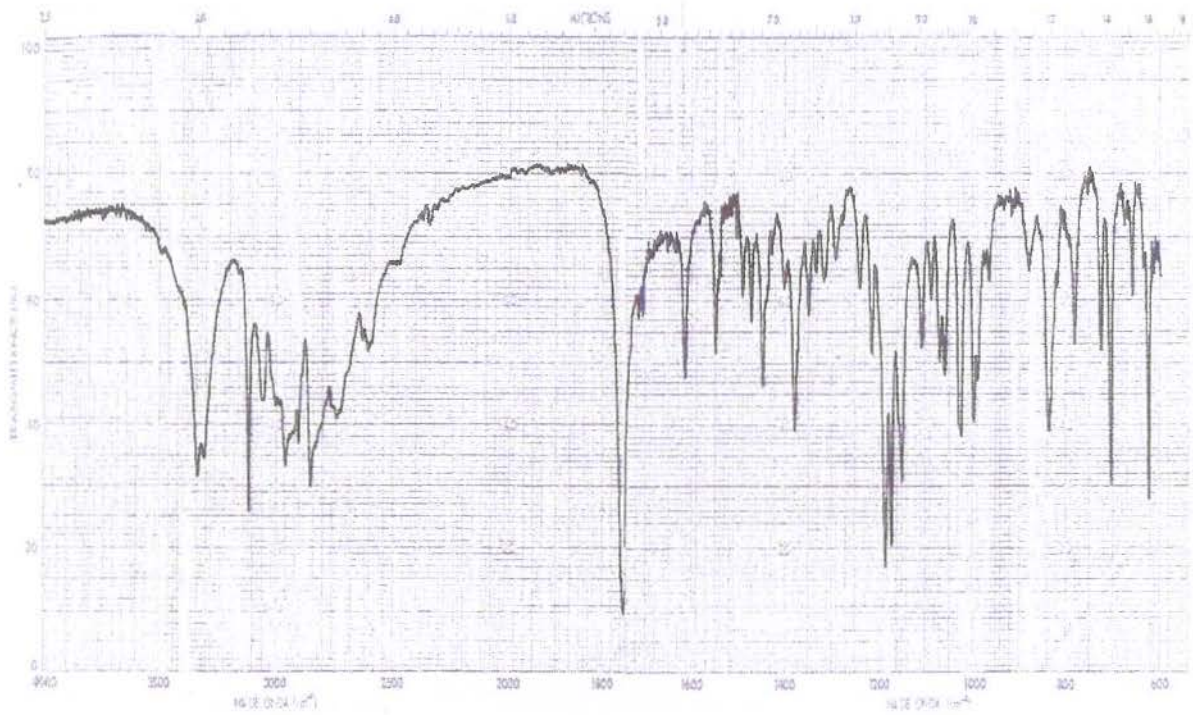


Figura 11. Espectro de I.V. do alcalóide secundário extraído.

### 5.1.4. Ressonância Magnética Nuclear (R.M.N.)

Para melhor visualização e comparação entre os espectros de  $^{13}\text{C}$  e o  $^1\text{H}$ , os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) referentes ao padrão de cloridrato de pilocarpina, a epiisopilosina descrita na literatura e o alcalóide secundário extraído, estão apresentados na Tabela 4 e nas Figuras 12 e 13, 14, 15 e 16.

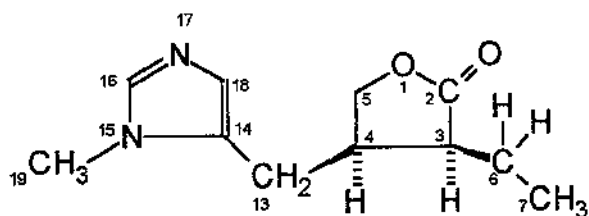
Tabela 4. Resultado das comparações da ressonância magnética nuclear protônica ( $^1\text{H}$ ) e carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) entre os dados da literatura para o padrão de cloridrato de pilocarpina, a epiisopilosina e o alcalóide secundário extraído.

Carbono	Pilocarpina		Epiisopilosina (lit.)		Alcalóide secundário ext.	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	182,4	-	-	-	177,4	-
3	44,6	2,70 (m)	-	3,3; 3,7 (m)	32,4	3,36; 3,54(m)
4	36,2	7,2 (m)	-	8,3; 7,7 (m)	52,0	7,4; 7,0 (m)
5	71,3	4,24; 4,00(dd)	-	3,92;4,36(dd)	71,4	3,95;4,26(dd)
6	17,9	-	-	5,9; 6,2 (m)	70,2	5,82;5,89(m)
6 <sup>a</sup>	-	-	-	4,76 (d)	70,2	5,2 (d)J=6,22
7	11,4	0,89 (s)	-	-	138,1	-
8	-	-	-	7,36	127,7	7,36
9	-	-	-	7,36	125,3	7,36
10	-	-	-	7,36	126,6	7,36
11	-	-	-	7,36	125,3	7,36
12	-	-	-	7,36	127,7	7,36
13	20,7	2,74; 2,51(m)	-	2,78 (m)	30,9	1,9; 2,2 (m)
14	132,7	-	-	-	142,8	-
16	116,9	7,59 (m)	-	7,3 (m)	116,9	6,49 (m)
18	135,4	7,17 (s)	-	6,53 (s)	137,1	7,3 (s)
19	33,3	3,66 (s)	-	3,1 (s)	33,8	2,78 (s)

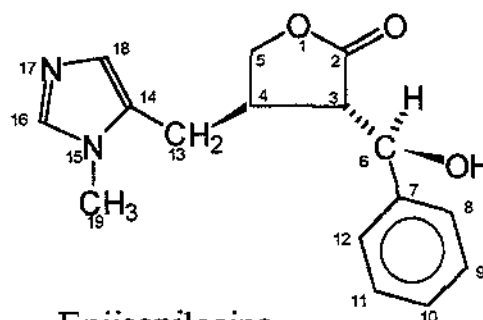
Epiisopilosina (lit.) – Tedeschi et al.<sup>158</sup> (1973).

$\delta$  = deslocamento químico; J = constantes de acoplamento.

Localização dos carbonos nas fórmulas estruturais.



Pilocarpina



Epiisopilosina

O espectro de  $^{13}\text{C}$ -R.M.N. para o cloridrato de pilocarpina mostrou onze sinais e o alcalóide secundário extraído mostrou dezesseis sinais correspondendo a treze carbonos insaturados e três carbonos saturados. Quanto ao espectro de  $^{13}\text{C}$ -R.M.N. da epiisopilosina (lit.) os valores não foram comparados devido à ausência destes dados na literatura. As técnicas DEPT e HECTOR (Figura 16) mostraram dois metilenos saturados  $\delta$  71,4 e  $\delta$  30,9, um grupo metileno em  $\delta$  33,8; oito carbonos  $\text{sp}^2$  hidrogenados em  $\delta$  137,1;  $\delta$  116,9;  $\delta$  127,7;  $\delta$  125,3;  $\delta$  126,6;  $\delta$  125,3;  $\delta$  127,7;  $\delta$  32,4;  $\delta$  52,0;  $\delta$  70,2, dois carbonos  $\text{sp}^2$  não-hidrogenados em  $\delta$  138,1 e  $\delta$  142,8, e uma carbonila em  $\delta$  177,4 (Tabela 4).

Os espectros  $^1\text{H}$ -R.M.N. da epiisopilosina (lit.) (TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973) do cloridrato de pilocarpina e o alcalóide secundário extraído mostraram um deslocamento químico em 3,1 (s); 3,66 (s) e 2,78 (s), respectivamente, atribuído ao grupo N-CH<sub>3</sub>; um duplo-dublete atribuído ao CH<sub>2</sub> do C-5 com deslocamento químico em 3,92 - 4,36; 4,24 - 4,00 e 3,95 - 4,26, respectivamente e um multiplete atribuído ao CH do C-3 com deslocamento químico em 3,3 - 3,7; 2,70 e 3,36 - 3,54, respectivamente. Um multiplete atribuído ao CH<sub>2</sub> do C-13 com deslocamento químico em 2,78; 2,74 - 2,51 e 1,9 - 2,2, respectivamente e um multiplete atribuído ao CH do C-4 com deslocamento químico em 7,2; 8,3



– 7,7 e 7,4 – 7,0, respectivamente. Um multiplete atribuído ao CH do C-16 com deslocamento químico em 8,49; 7,3 e 7,3, respectivamente e um multiplete atribuído ao CH do C-18 com deslocamento químico em 7,17; 6,53 e 6,49, respectivamente. Um deslocamento químico atribuído ao CH do C-8 ao C-12 em 7,36 do grupo fenil observados na episipilosina (lit.) (TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973) e no alcalóide secundário extraído (Tabela 4).

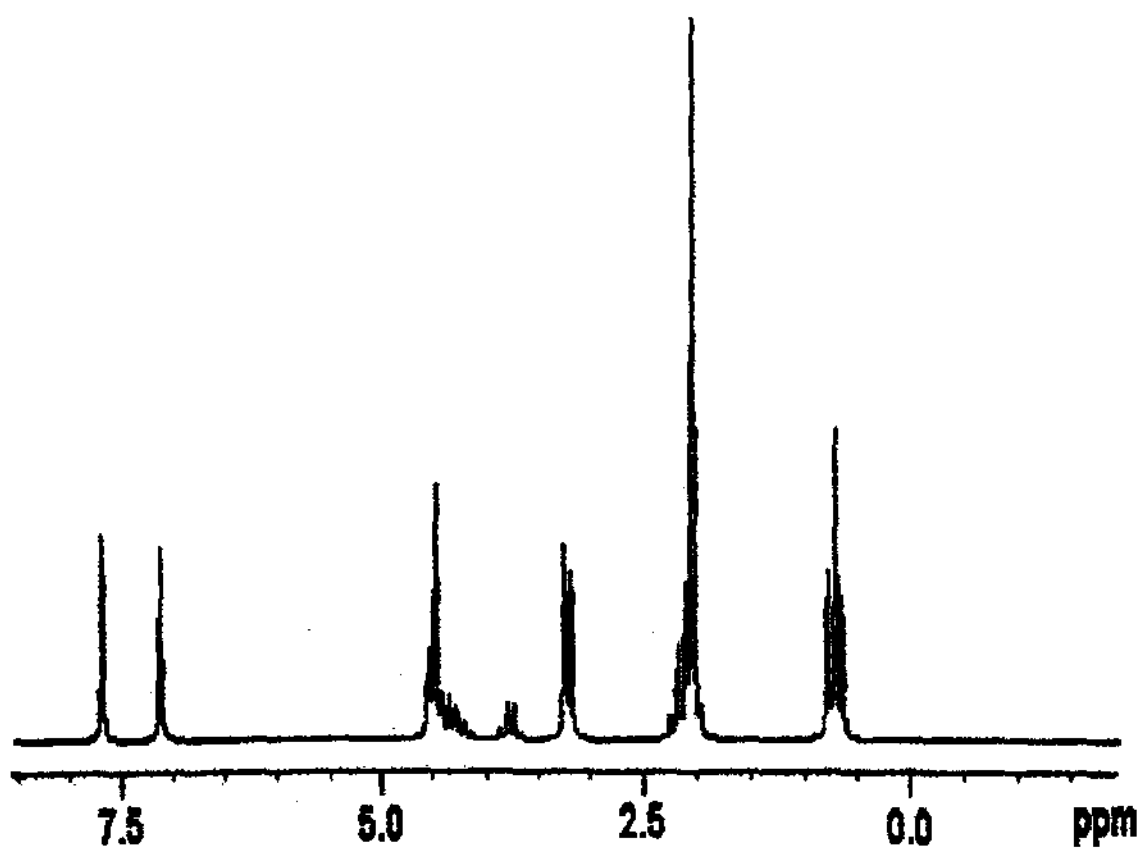


Figura 12. Espectro de R.M.N. ( $^1\text{H}$ ) do padrão de cloridrato de pilocarpina.

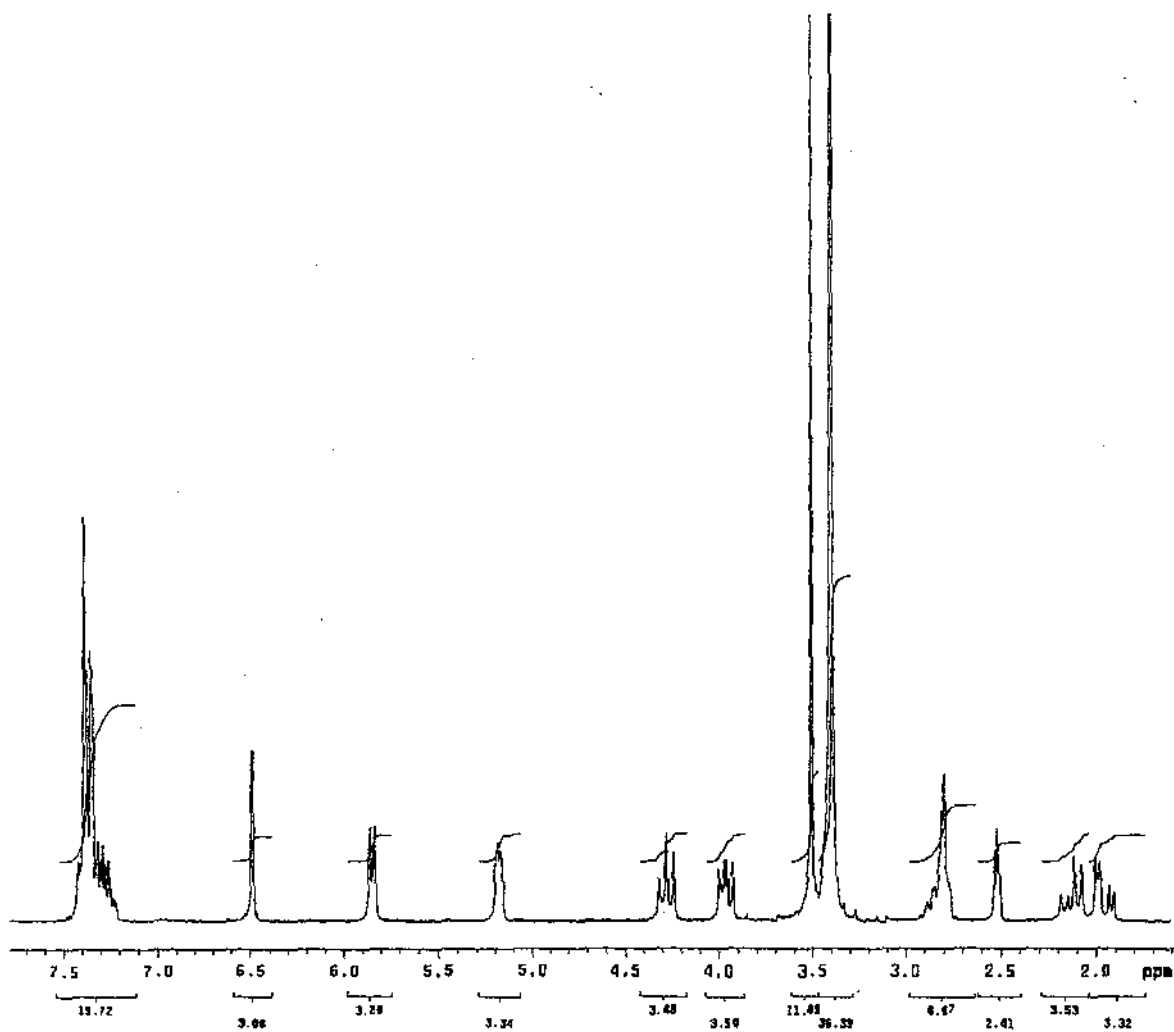


Figura 13. Espectro de R.M.N. ( $^1\text{H}$ ) do alcalóide secundário extraído.

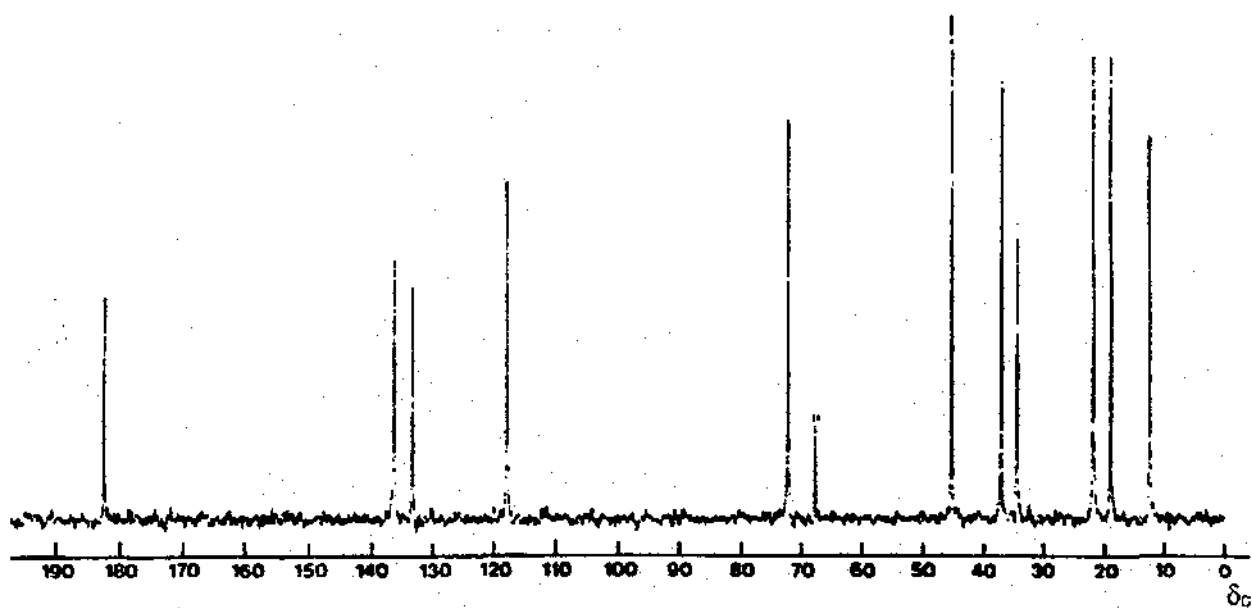


Figura 14. Espectro de R.M.N. ( $^{13}\text{C}$ ) do padrão de cloridrato de pilocarpina.

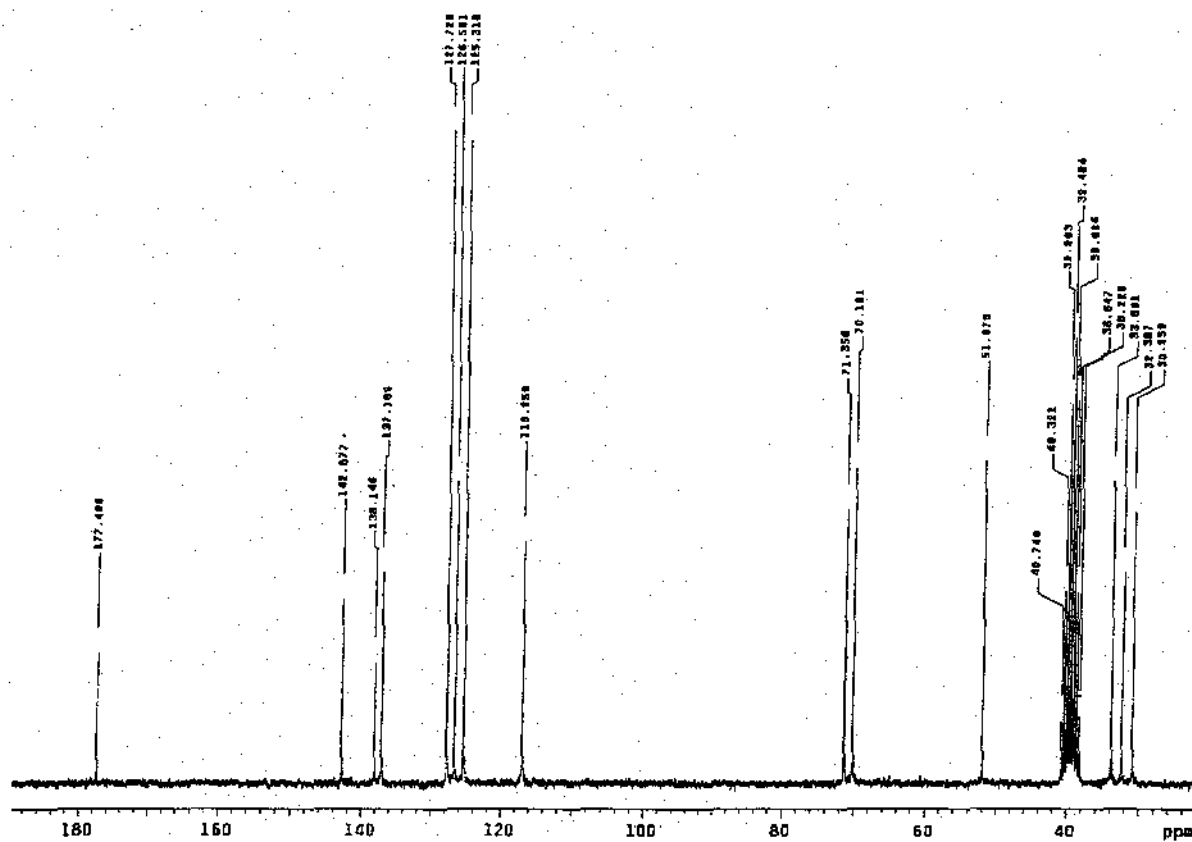


Figura 15. Espectro de R.M.N. (<sup>13</sup>C) do alcalóide secundário extraído.

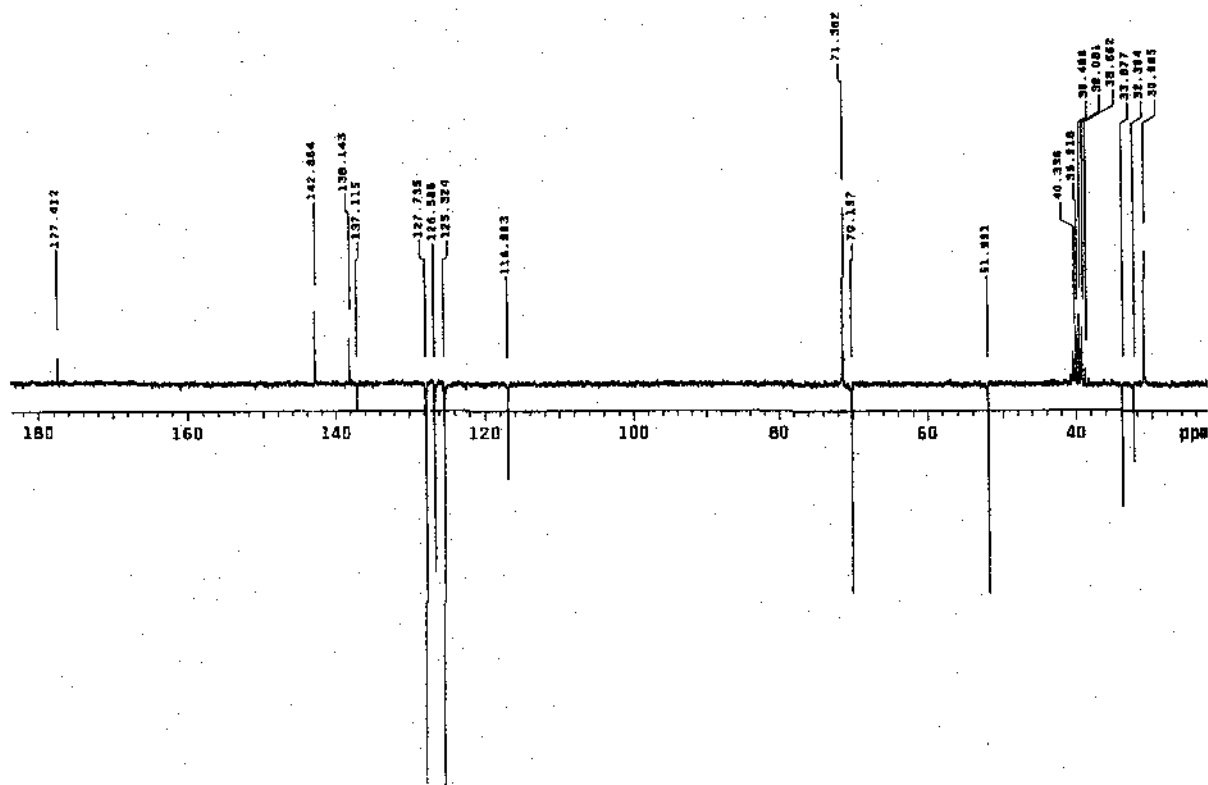


Figura 16. Espectro de R.M.N. (<sup>13</sup>C) do alcalóide secundário extraído (DEPT).

## 5.2. Dose Letal (DL<sub>50</sub>) e Efeitos Farmacológicos do Padrão de Cloridrato de Pilocarpina e Alcalóide Secundário.

### 5.2.1. Dose Letal (DL<sub>50</sub>)

Os grupos experimentais encontram-se no Anexo 2 (estudo da dose letal para o padrão de cloridrato de pilocarpina e alcalóide secundário, respectivamente).

Os cálculos da DL<sub>50</sub> (mg/kg), o erro padrão e os intervalos de confiança, com coeficiente de confiança de 95% de probabilidade, estão apresentados na Tabela 5 para o padrão de cloridrato de pilocarpina e o alcalóide secundário, respectivamente.

Tabela 5. Valores de Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>), expressos em mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, erro padrão (ep), equação da reta e o intervalo de confiança (95%) do padrão de cloridrato de pilocarpina e alcalóide secundário extraído.

Grupo	Equação	DL <sub>50</sub> (ep) em mg/kg	Intervalo de Confiança
Cloridrato de Pilocarpina	$23,8 + 11,7 \ln(d)$	253,2 (2,76)	(253,2; 324,9)
Alcalóide Secundário ext.	$19,3 + 8,8 \ln(d)$	540,9 (3,08)	(470,6; 621,7)

Comparando os valores obtidos de DL<sub>50</sub> na Tabelas 5, observa-se que cloridrato de pilocarpina apresentou uma DL<sub>50</sub> de 253,2 mg/kg e o alcalóide secundário extraído uma DL<sub>50</sub> de 540,9 mg/kg via i.p., em camundongos.

### **5.2.2. Determinação do Peso Corporal**

Os animais sobreviventes da determinação da  $DL_{50}$  foram pesados conforme descrição no Material e Métodos (4.8) e permaneceram normais durante todo período de observação.

Houve ganho de peso em todos os grupos avaliados no período de 14 dias de observação e esse resultado está expresso na Tabela 6. Não houve diferença estatisticamente significativa quando se analisou os ganhos de peso entre os animais que receberam cloridrato de pilocarpina nas diferentes doses e também quando comparados com o controle. O mesmo resultado estatístico se observou com os animais que receberam A.S. e o seu controle. Também não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os ganhos de peso entre os animais que receberam cloridrato de pilocarpina ou A.S. na mesma dose ou ainda entre os grupos controle.



Tabela 6. Ganho de peso médio (g) (desvio padrão) dos grupos experimentais que receberam o padrão de cloridrato de pilocarpina e A.S. extraído, após 14 dias de experimento.

Grupos	Ganho de Peso (g)			
	Pilocarpina	n <sub>p</sub>	A.S.	n <sub>a.s.</sub>
Controle*	2,7 (3,0) <sup>a</sup>	7	5,5 (3,5) <sup>a</sup>	10
4 mg/kg	5,6 (4,2) <sup>a</sup>	7	4,0 (5,5) <sup>a</sup>	10
40 mg/kg	3,3 (3,7) <sup>a</sup>	7	6,0 (3,3) <sup>a</sup>	10
120 mg/kg	7,4 (3,9) <sup>a</sup>	7	2,7 (1,7) <sup>a</sup>	10
180 mg/kg	6,2 (5,0) <sup>a</sup>	7	3,0 (3,2) <sup>a</sup>	10
240 mg/kg	6,0 (3,5) <sup>a</sup>	5	4,8 (4,1) <sup>a</sup>	10
300 mg/kg	3,0 (3,5) <sup>a</sup>	4	2,4 (2,5) <sup>a</sup>	10
400 mg/kg	+	0	1,0 (2,0) <sup>a</sup>	8
600 mg/kg	0	0	7,8 (7,0) <sup>a</sup>	5
800 mg/kg	0	0	+	0
1000 mg/kg	0	0	+	0

<sup>a</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,1160$ ), quando comparados na vertical quanto na horizontal.

Comparação para todos os pares por Anova; Tukey-Kramer – HSD.

\*Controle = solução de NaCl 0,9% i.p.

n = número de animais avaliados (n<sub>p</sub> = grupo que recebeu cloridrato de pilocarpina e n<sub>a.s.</sub> = grupo que recebeu A.S. extraído).

+ = mortos.

0 = a dose não foi testada.

### 5.2.3. Avaliação ou "Screening" Hipocrático

Os valores médios obtidos na avaliação ou "screening" Hipocrático do cloridrato de pilocarpina e o A.S. estão demonstrados nas Tabelas de 7 a 13.

As avaliações dos parâmetros farmacológicos a partir dos efeitos produzidos pelo cloridrato de pilocarpina e o A.S. sobre o estado consciente (I), atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II), reflexos (III), atividades sobre o sistema nervoso central (IV) e autônomo (V), foram obtidas a partir das observações individuais dos animais em cada grupo.

Pela análise observacional das Tabelas 7 a 13, foi possível relatar, para o cloridrato de pilocarpina os seguintes efeitos:

- diminuição, dose não-dependente, da atividade geral no estado consciente e disposição (I), principalmente nas duas primeiras horas. Após a 2ª h os animais retornam ao normal, exceto nas doses acima de 180 mg/kg, quando os animais voltaram ao normal após a 4ª hora (Tabela 7).
- diminuição da atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II), dose não-dependente. Este efeito foi observado nas duas primeiras horas, em seguida, os animais retornam ao normal (Tabela 8).
- diminuição da atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II), dose não-dependente. Este efeito foi observado até a 4ª h, em seguida os animais retornam ao normal (Tabela 9).
- efeitos auriculares (III) são pronunciados até a 1ª hora e independem da dose administrada. Entre a 2ª e 4ª h esta manifestação auricular é observada em doses superiores a 120 mg/kg (Tabela 10).
- efeito corneal (III) é elevado entre 0,5 hora a 2ª h, independente da dose. Entre 2ª e 4ª h esta manifestação corneal é observada em doses superiores a 120 mg/kg (Tabela 10).

- tremores (IV) e convulsões (IV) ocorrem somente em doses acima de 240 mg/kg, até a 2<sup>a</sup> h, dose dependente, retornando ao estado normal, indicando atividade sobre o sistema nervoso central (Tabela 11).
- ereção da cauda (IV) não foi observado em nenhuma dose administrada e em nenhum tempo (Tabela 11).
- lacrimação (V) ocorre somente em doses acima de 120 mg/kg, até 1<sup>a</sup> h; e o aumento da frequência da respiração (V) é pronunciada em doses acima de 120 mg/kg apenas na 0,5 hora; a salivação é pronunciada até a 1<sup>a</sup> hora e independe da dose administrada. Após a 1<sup>a</sup> hora todos os animais retornam ao normal (Tabela 12).
- micção (V) e piloereção (V) são pronunciadas até as duas primeiras horas, dose não-dependente. Após a 2<sup>a</sup> h todos os animais retornam ao normal. A defecação (V) é pronunciada até a 0,5 hora, dose não-dependente, acima de 180 mg/kg até a 4<sup>a</sup> h, em seguida os animais retornam ao normal (Tabela 13).

Com relação ao alcalóide secundário, a análise das Tabelas 7 a 13 revelou os seguintes efeitos farmacológicos:

- diminuição da atividade geral no estado consciente e disposição (I), porém, este efeito só foi observado em altas doses, dose dependente, acima de 120 mg/kg apenas na 0,5 hora; 300 mg/kg até 2<sup>a</sup> h e 400 - 600 mg/kg até 4<sup>a</sup> h (Tabela 7).
- diminuição da atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II), este efeito foi observado em altas doses, dose dependente, acima de 120 mg/kg até a 1<sup>a</sup> h; 400 - 600 mg/kg entre a 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> h. Após a 4<sup>a</sup> h todos os animais retornam ao normal (Tabela 8 e 9).
- efeitos auriculares (III) são pronunciados somente em doses acima de 120 mg/kg apenas na 0,5 h; acima de 300 mg/kg até 1<sup>a</sup> h, dose dependente, retornando ao estado normal (Tabela 10).

- efeito corneal (III) é elevado em doses acima de 120 mg/kg apenas na 0,5 h; acima de 300 mg/kg até a 1<sup>a</sup> h, dose dependente, retornando ao estado normal (Tabela 10).

- tremores (IV) não foram observados, porém convulsões (IV) e ereção da cauda (IV) foram manifestos em doses bastante elevadas, acima de 400 mg/kg até a 1<sup>a</sup> h, dose dependente, retornando ao estado normal (Tabela 11).

- não ocorreu lacrimação (V), a respiração (V) e a salivação (V) foram bastante pronunciadas em doses acima de 400 mg/kg até a 1<sup>a</sup> h, dose dependente, retornando ao estado normal (Tabela 12).

- micção (V), defecação (V) foram observadas até a 1<sup>a</sup> h, independente da dose. Entre a 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> h estas manifestações foram observadas em doses superiores a 300 mg/kg. Após a 4<sup>a</sup> h todos os animais retornam ao normal (Tabela 13). A piloereção (V) é pronunciada em doses acima de 120 mg/kg até a 1<sup>a</sup> h, dose dependente, em seguida os animais retornam ao normal (Tabela 13).

Comparando os efeitos farmacológicos avaliados observou-se que os parâmetros avaliados atividade geral (I), resposta ao toque (II), resposta ao aperto da cauda (II), endireitamento (II), força para agarrar (II), tônus do corpo (II), auricular (III), corneal (III), respiração (V), salivação (V), micção (V), defecação (V) e piloereção (V) são dose não-dependente e a lacrimação (V) é dose dependente para os animais que receberam o padrão de cloridrato de pilocarpina.

Para o A.S. observou-se que os parâmetros avaliados atividade geral (I), resposta ao toque (II), resposta ao aperto da cauda (II), endireitamento (II), força para agarrar (II), tônus do corpo (II), auricular (III), corneal (III), ereção da cauda (IV), respiração (V), salivação (V) e piloereção são dose dependente e micção (V) e a defecação (V) são dose não-dependente para os animais que receberam o A.S.

Entretanto, o parâmetro avaliado convulsão (IV) é dose dependente para os animais que receberam tanto o cloridrato de pilocarpina quanto o A.S. Observou-se que os parâmetros avaliados tremores (Tabela 11) e lacrimação (Tabela 12) só foram observados nos animais que receberam o cloridrato de pilocarpina. Também foi observado que o efeito ereção da cauda (Tabela 11) só ocorreu em animais que receberam o A.S.

Tabela 7 - Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – estado consciente e disposição (I).

Parâmetro avaliado	Dose (mg/kg) i.p.	Tempo (horas)															
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0			
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.		
I Atividade geral	Controle	4		4		4		4		4		4		4			
	4	4	4	2	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	1	4	1	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	1	3	1	4	2	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	1	3	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4		
	240	4	4	1	3	1	4	1	4	2	4	4	4	4	4		
	300	4	4	1	3	1	3	2	4	3	4	4	4	4	4		
	400	4	4	1	2	1	3	+	3	+	3	+	4	+	4		
	600	-	4	-	2	-	3	-	3	-	3	-	4	-	4		
	800	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
1000	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+			

+ = mortos

Normal “0” - Variação de 0 a 4

Normal “4” - Variação de 0 a 8

8- Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II) .

Parâmetros avaliados	Dose (mg/kg) i.p.	Tempo (horas)															
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0			
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.		
II Resposta ao toque	Controle	4	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	2	3	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	2	3	2	3	2	4	4	4	4	4	4	4		
	240	4	4	2	3	2	3	2	4	4	4	4	4	4	4		
	300	4	4	2	3	2	3	2	4	4	4	4	4	4	4		
	400	4	4	3	2	2	3	+	3	+	3	4	4	+	4		
	600	-	4	-	2	-	3	-	3	-	3	-	4	-	4		
	800	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
II Resposta ao aperto Da cauda	4	4	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	2	3	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	2	3	1	3	1	4	4	4	4	4	4	4		
	240	4	4	1	3	1	3	2	4	4	4	4	4	4	4		
	300	4	4	1	3	1	3	2	4	4	4	4	4	4	4		
	400	4	4	2	2	2	3	+	3	+	3	+	4	+	4		
	600	-	4	-	2	-	3	-	3	-	3	-	4	-	4		
	800	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
II Endireitamento	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	240	4	4	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	300	4	4	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	400	4	4	3	2	3	4	+	4	+	4	+	4	+	4		
	600	-	4	-	2	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4		
	800	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

+ = mortos

Normal “0”- Variação de 0 a 4

Normal “4”- Variação de 0 a 8

Tabela 9 - Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II).

Parâmetros avaliados	Dose (mg/kg) i.p. Controle	Tempo (horas)															
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0			
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.		
II Força para agarrar	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	40	4	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	120	4	4	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	
	180	4	4	1	3	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	
	240	4	4	2	3	2	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	
	300	4	4	1	3	1	3	2	4	3	4	4	4	4	4	4	
	400	4	4	1	2	1	3	+	3	+	3	+	4	+	4	+	
	600	-	4	-	2	-	3	-	3	-	3	-	4	-	4	-	
	800	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	1000	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
II Tônus do corpo	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	40	4	4	1	4	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	120	4	4	2	3	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	
	180	4	4	1	3	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	
	240	4	4	2	3	2	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	
	300	4	4	2	3	2	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	
	400	4	4	2	2	2	3	+	4	+	4	+	4	+	4	+	
	600	-	4	-	2	-	3	-	4	-	4	-	4	-	4	-	
	800	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	1000	-	4	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

+ = mortos

Normal “0”- Variação de 0 a 4

Normal “4”- Variação de 0 a 8



Tabela 10 - Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – Reflexos (III).

Parâmetros avaliados	Dose (mg/kg) i.p.	Tempo (horas)															
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0			
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.		
Controle		4		4		4		4		4		4		4			
III Auricular	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	7	4	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	7	5	6	4	7	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	6	5	6	4	6	4	5	4	4	4	4	4		
	240	4	4	6	5	6	4	6	4	5	4	4	4	4	4		
	300	4	4	6	5	6	5	5	4	5	4	4	4	4	4		
	400	4	4	6	6	7	5	+	4	+	3	+	4	+	4		
	600	-	4	-	6	-	5	-	4	-	3	-	4	-	4		
	800	-	4	-	6	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	6	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
III Corneal	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	6	4	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	6	5	6	4	6	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	6	5	6	4	6	4	5	4	4	4	4	4		
	240	4	4	7	5	7	4	6	4	5	4	4	4	4	4		
	300	4	4	7	5	7	5	5	4	5	4	4	4	4	4		
	400	4	4	7	7	7	5	+	4	+	4	+	4	+	4		
	600	-	4	-	7	-	5	-	4	-	4	-	4	-	4		
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

+ = mortos

Normal “0”- Variação de 0 a 4

Normal “4”- Variação de 0 a 8

Tabela 11 - Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – S.N.C. (IV)

Parâmetros avaliados	Dose (mg/kg) i.p.	Tempo (horas)													
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0	
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.
IV Tremores	Controle	0		0		0		0		0		0		0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	240	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	400	0	0	4	0	4	0	+	0	+	0	+	0		0
	600	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
	800	-	0	-	0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1000	-	0	-	0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
IV Convulsões	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	240	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	400	0	0	4	3	4	3	+	0	+	0	+	0	+	0
	600	-	0	-	4	-	4	-	0	-	0	-	0	-	0
	800	-	0	-	4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	1000	-	0	-	4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
IV Straub	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0
	600	-	0	-	4	-	4	-	0	-	0	-	0	-	0
	800	-	0	-	4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	1000	-	0	-	4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

+ = mortos

Normal “0”- Variação de 0 a 4

Normal “4”- Variação de 0 a 8

Tabela 12 - Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – S.N.A. (V)

Parâmetros avaliados	Dose (mg/kg) i.p.	Tempo (horas)															
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0			
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.		
Lacrimação	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	120	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	180	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	240	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	
	600	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
	800	-	0	-	0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1000	-	0	-	0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Respiração	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	40	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	120	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	180	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	240	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	300	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	400	4	4	5	6	4	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4
	600	-	4	-	7	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Salivação	4	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	40	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	120	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	180	4	4	6	4	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	240	4	4	7	4	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	300	4	4	7	4	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	400	4	4	7	5	7	5	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4
	600	-	4	-	7	-	7	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

+ = mortos

Normal “0”- Variação de 0 a 4

Normal “4”- Variação de 0 a 8

Tabela 13 Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e alcalóide secundário extraído (a.s.) na avaliação ou “screening” – S.N.A. (V)

Parâmetros avaliados	Dose (mg/kg) i.p.	Tempo (horas)															
		0,0		0,5		1,0		2,0		4,0		24,0		48,0			
		c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.	c.p.	a.s.		
V Micção	Controle	4	4	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4		
	4	4	4	5	5	6	5	4	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	5	5	6	5	4	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	6	5	6	5	6	4	4	4	4	4	4	4		
	240	4	4	6	5	6	5	6	4	4	4	4	4	4	4		
	300	4	4	6	5	6	5	6	5	4	4	4	4	4	4		
	400	4	4	6	6	6	6	+	5	+	5	+	4	+	4		
	600	-	4	-	7	-	7	-	5	-	5	-	4	-	4		
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
V Defecação	4	4	4	5	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4		
	40	4	4	6	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4		
	120	4	4	6	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4		
	180	4	4	6	6	5	5	5	4	5	4	4	4	4	4		
	240	4	4	6	6	5	5	5	4	5	4	4	4	4	4		
	300	4	4	7	6	6	5	5	5	5	4	4	4	4	4		
	400	4	4	7	6	7	6	+	5	+	3	+	4	+	4		
	600	-	4	-	7	-	7	-	6	-	3	-	4	-	4		
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
V Piloereção	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	4	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	40	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	120	0	0	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	180	0	0	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	240	0	0	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	300	0	0	2	2	3	2	3	0	0	0	0	0	0	0		
	400	0	0	4	2	4	4	+	0	+	0	+	0	+	0		
	600	-	0	-	2	-	4	-	0	-	0	-	0	-	0		
	800	-	0	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
1000	-	0	-	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+			

+ = mortos

Normal “0”- Variação de 0 a 4

Normal “4”- Variação de 0 a 8

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Diversos trabalhos publicados mostram que os teores de alcalóides totais podem variar de 0,4 % a 1,8 % do peso das folhas de jaborandi secas; que o alcalóide principal é a pilocarpina e que os alcalóides secundários variam em número e proporção (BATTERSBY & OPENSHAW<sup>15</sup>, 1953; MAAT & BEYERMAN<sup>85</sup>, 1983; VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978; BENIGNI et al.<sup>18</sup>, 1964).

O resultado da determinação de A.T. em folhas de jaborandi da Represa da Boa Esperança (% A.T.=0,61; % Pilocarpina/Alc.Secundário=20/80) está compatível com o observado em algumas regiões do Estado do Maranhão e Estado do Piauí (municípios próximos à Represa da Boa Esperança e áreas vizinhas), onde o teor de pilocarpina é baixo (Tabela 1). Entretanto, o teor de A.S. é maior. Este fato é particularmente importante neste trabalho pois o objetivo foi o de estudar quimicamente os A.S. do *Pilocarpus microphyllus* Stapf.

O processo utilizado na extração de A.S. das folhas de *P. microphyllus* Stapf., em solução aquosa de ácido sulfúrico a 2 %, descrito neste trabalho, é inédito na literatura e apresenta uma forma alternativa de extração, estando patenteado nos EUA (US Pat. 5.684.155) e na Comunidade Européia (EP 0.707.589). A alternativa da utilização de solução aquosa em vez de solventes orgânicos, preconizados pelos métodos tradicionais de extração (BATTERSBY & OPENSHAW<sup>15</sup>, 1953; VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978) torna este processo mais interessante do ponto de vista econômico, uma vez que o seu custo é, aproximadamente, 70 % menor.

Os resultados da faixa de fusão (P.F.), I.V. e R.M.N. que serão discutidos a seguir, identificam o A.S., assim como dão consistência ao processo



de extração desenvolvido, uma vez que caracteriza o A.S. obtido como uma substância pura.

A pilocarpina base funde a 34°C (AL-BADR & ABOUL-ENEIN<sup>6</sup>, 1983) e o resultado deste estudo, observado na Tabela 2, está de acordo com a faixa de fusão estabelecida para a pilocarpina base experimental que foi de 33°C a 34°C. A faixa de fusão da pilocarpina base experimental próxima ao relatado na literatura confirma o grau de pureza da base de pilocarpina obtida no processo de extração do alcalóide desenvolvido nesta pesquisa.

Para o P.F. do cloridrato de pilocarpina, a USP<sup>165</sup> (1995) estabelece a faixa de fusão de 199°C a 205°C, entretanto adverte que o intervalo de fusão entre o início e o fim não deve exceder de 3°C. O resultado deste estudo, observado na Tabela 2, também está de acordo com a faixa de fusão estabelecida na literatura que foi de 204°C a 205°C. De acordo com a faixa de fusão estabelecida na USP (1995) para o cloridrato de pilocarpina, podemos afirmar que o P.F. obtido para o cloridrato de pilocarpina experimental possui também alto grau de pureza.

No presente estudo foram determinados os pontos de fusão para o alcalóide secundário base que teve a faixa de fusão entre: 184°C - 186°C e o cloridrato do alcalóide secundário na faixa de 216°C - 218°C. Esses valores diferem daqueles encontrados para a pilocarpina base e o cloridrato de pilocarpina e portanto sugerem que se trata de um alcalóide cuja estrutura química difere de ambos.

Os dados de A.S. obtidos (Tabela 2) aproximam-se dos dados da literatura para a epiisopilosina base (179°C - 184°C) (LINK & BERNAUER<sup>76</sup>, 1972; LÖWE & POOK<sup>81</sup>, 1973; TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973; TEDESCHI et al.<sup>159</sup>, 1974; SAREL et al.<sup>141</sup>, 1975; VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978), um alcalóide secundário descrito na literatura. A diferença entre o dado da literatura

para a epiisopilosina base e o alcalóide secundário base, deve-se, provavelmente, ao tipo de solvente utilizado para cristalização (LINK & BERNAUER<sup>76</sup>, 1972; LÖWE & POOK<sup>81</sup>, 1973; TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973; TEDESCHI et al.<sup>159</sup>, 1974; SAREL et al.<sup>141</sup>, 1975; VOIGTLÄNDER et al.<sup>172</sup>, 1978). Entretanto, não há relato na literatura referente ao ponto de fusão do cloridrato de epiisopilosina ou outro sal de epiisopilosina. A partir da proximidade dos dados de P.F. da epiisopilosina e o A.S., as demais análises foram comparados com os resultados disponíveis na literatura para a pilosina e seus isômeros.

Comparando-se os valores das frequências de absorção obtidos no espectro de I.V, Tabela 3, o cloridrato de pilocarpina, a pilosina (lit.) e o alcalóide secundário extraído, possuem frequências próximas para os grupos N-CH<sub>3</sub> (quaternário); CH aromático; C = O (anel lactona de 5 membros) e C = C (anel aromático) (VOIGTLÄNDER & ROSENBERG<sup>171</sup>, 1959; TEDESCHI et al.<sup>159</sup>, 1974; AL-BADR & ABOUL-ENEIN<sup>6</sup>, 1983). Entretanto, o alcalóide secundário extraído apresenta uma banda de estiramento OH (3117 cm<sup>-1</sup>) inexistente no cloridrato de pilocarpina, porém próximo a banda de estiramento OH citado na literatura para a pilosina (3112 cm<sup>-1</sup>), confirmando a suposição descrita no parágrafo anterior de que o A.S. possa ser um isômero da pilosina.

VOIGTLÄNDER & ROSENBERG<sup>171</sup> (1959) e TEDESCHI et al.<sup>159</sup> (1974) são os únicos autores que se dedicaram ao estudo de espectros no infravermelho de pilosina e seus isômeros. Esses autores assinalaram um único pico em torno de 1750 cm<sup>-1</sup> (C = O, anel de 5 membros) para epiisopilosina, enquanto que os isômeros desses apresentam picos duplos na mesma região. O valor da frequência obtida C = O (anel de 5 membros) para o alcalóide secundário extraído (1751 cm<sup>-1</sup>) está de acordo com o valor obtido na literatura para epiisopilosina (VOIGTLÄNDER & ROSENBERG<sup>171</sup>, 1959; TEDESCHI

et al.<sup>159</sup>, 1974), confirmando a hipótese de que a epiisopilosina, um isômero da pilosina, seja o provável alcalóide secundário, objeto deste estudo.

Comparando os valores obtidos de <sup>1</sup>H e carbono-13 na R.M.N., Tabela 4, para o cloridrato de pilocarpina, epiisopilosina (TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973) e o cloridrato do alcalóide secundário extraído, observa-se que o cloridrato de pilocarpina possui 11 sinais de carbono e o alcalóide secundário extraído possui 16 sinais de carbono. Para o cloridrato de pilocarpina observou-se a presença do grupo etil e do anel imidazol, entretanto para o alcalóide secundário extraído observou-se apenas a presença do anel imidazol. Também foram observadas na Tabela 4 a presença do metileno saturado para o cloridrato de pilocarpina (δ11,4), e a ausência deste grupo para o alcalóide secundário extraído. O cloridrato de pilocarpina não apresenta deslocamentos químicos referentes aos grupos CHOH e ao anel fenil; entretanto o alcalóide secundário extraído apresenta o duplete (δ 5,20), referente ao deslocamento químico CHOH e a presença dos deslocamentos do anel fenil (δ 7,36). Esses dados levam a sugerir a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para o alcalóide secundário. O espectro de (<sup>1</sup>H) R.M.N. protônica do cloridrato do alcalóide secundário mostra semelhança com o espectro da epiisopilosina encontrado na literatura (TEDESCHI et al.<sup>158</sup>, 1973) e diferenças com a estrutura química do cloridrato de pilocarpina. Esses dados, uma vez mais, reforçam a hipótese de que a epiisopilosina seja o A.S. extraído das folhas de jaborandi da Represa da Boa Esperança, pelo método desenvolvido neste trabalho.

Com relação aos resultados obtidos na fase farmacológica para o A. S. extraído e agora com a estrutura química determinada como sendo, provavelmente, a epiisopilosin, constata-se na literatura que essa substância não possui descrição de suas propriedades farmacológicas, sendo que para esta discussão, sempre que possível, a pilocarpina será considerada como uma droga



padrão descrita na literatura.(BEN-BASSAT et al.<sup>17</sup>, 1971; SIVADJIAN<sup>151</sup>, 1975; BEN-BASSAT & LAVIE<sup>16</sup>, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982; TURSKI W.A et al.<sup>164</sup>, 1984; BUNDGAARD et al.<sup>25</sup>, 1985; USHIJIMA et al.<sup>166</sup>, 1985; JOPE et al.<sup>62</sup>, 1986; MOLINENGO & ORSETTI<sup>94</sup>, 1986; SALAMONE et al.<sup>140</sup>, 1986; TURSKI L. et al.<sup>162</sup>, 1986; CLIFFORD et al.<sup>30</sup>, 1987; SAGULIN et al.<sup>139</sup>, 1989; TURSKI W. A. et al.<sup>163</sup>, 1987; PATEL et al.<sup>112</sup>, 1988; SAUERBERG, et al.<sup>143</sup>, 1989; BARONE et al.<sup>13</sup>, 1992; BARONE et al.<sup>12</sup>, 1993; RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993; MASLANSKI et al.<sup>87</sup>, 1994; PRZEWLOCKA et al.<sup>129</sup>, 1994; PRIEL et al.<sup>128</sup>, 1996.; CECANHO<sup>27</sup>, 1998; RICE & DE LORENZO<sup>136</sup>, 1998).

Os resultados da DL<sub>50</sub> (Tabela 5) para o cloridrato de pilocarpina (253,2 mg/kg) obtido através da administração da droga via i.p. em camundongos *Mus musculus*, machos, divergem do valor encontrado na literatura que é de 203 mg/kg (SIGMA CHEM. Co.<sup>150</sup>, 1997). Talvez essa diferença se justifique pelo fato de que a espécie animal utilizada nesta experiência difere da literatura mencionada na qual foram utilizadas ratos, não se referindo especificamente à linhagem e ao sexo. Como a espécie, a linhagem e o sexo animal interferem na determinação da DL<sub>50</sub> (VALLE et al.<sup>167</sup>, 1988), talvez a diferença da DL<sub>50</sub> verificada seja causada por essas características.

TURSKI W.A. et al.<sup>163</sup> (1987) utilizaram o cloridrato de pilocarpina, via i.p., como modelo para induzir convulsões em ratos. A dose administrada de 380mg/kg de cloridrato de pilocarpina produziu estado epiléptico, causando três mortes num total de nove animais. Os autores não calcularam a DL<sub>50</sub>, porém pelos dados apresentados estima-se uma DL<sub>50</sub> superior a 300 mg/kg e também não se referem a análise estatística dos dados.

Comparando os dados da DL<sub>50</sub> do cloridrato de pilocarpina (SIGMA CHEM. Co.<sup>150</sup>, 1997) e o trabalho desenvolvido por TURSKI W.A. et al.<sup>163</sup>. em

1987, observou-se que ambos utilizaram no experimento a espécie rato, entretanto, existe, uma grande discrepância no que se refere a DL<sub>50</sub>.

Vários trabalhos são usados como modelo para epilepsia, observando-se mortes nas doses entre 350-400 mg/Kg (TURSKI W.A. et al.<sup>164</sup>, 1984; TURSKI L. et al.<sup>162</sup>, 1986; CLIFFORD et al.<sup>30</sup>, 1987; TURSKI W.A. et al.<sup>163</sup>, 1987; PRIEL et al.<sup>128</sup>, 1996). Nos trabalhos revisados não há estimativas de DL<sub>50</sub> para os alcalóides secundários de *Pilocarpus microphyllus* Stapf., tais como, pilosina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina. Para o alcalóide secundário, objetivo deste estudo, o valor da DL<sub>50</sub> via i.p., em camundongos, foi de 540,9 mg/kg (Tabela 5).

Ao se comparar os resultados da DL<sub>50</sub> obtidos para o cloridrato de pilocarpina e o A.S. extraído verificou-se uma DL<sub>50</sub>, no mínimo, duas vezes superior a da pilocarpina, significando que a toxicidade da droga pesquisada é menor que a droga referência.

Observando os valores obtidos na Tabela 6, verificou-se que houve ganho de peso nos grupos que receberam de cloridrato de pilocarpina e o alcalóide secundário extraído. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos tanto na análise estatística intragrupos (só cloridrato de pilocarpina e só A.S.) ou extragrupos (cloridrato de pilocarpina e A.S.). O ganho de peso para ambos os grupos foi considerado normal para animais saudáveis, bem como suas atividades e comportamentos observados. Dessa forma, o ganho de peso do animal não foi afetado tanto nos camundongos que receberam cloridrato de pilocarpina quanto A.S., o que faz supor que esses animais tiveram um desenvolvimento normal após administração das drogas.

Os resultados obtidos na Tabela 7 na avaliação ou “screening” Hipocrático [estado consciente e disposição (I) – Atividade Geral] mostram que houve uma pequena redução no estado consciente e disposição dos animais que

receberam o padrão de cloridrato de pilocarpina, i.p., redução esta, dose não-dependente e que diminui com o tempo de observação. Provavelmente esse efeito é devido à quebra do anel lactônico da pilocarpina, formando isopilocarpina e ácido pilocárpico durante o processo de biotransformação, os quais são inativos farmacologicamente (ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982; SAUERBERG, et al.<sup>143</sup>, 1989).

Ao se discutir os resultados da avaliação ou “screen” Hipocrático para o A.S. extraído é importante mencionar que a literatura farmacológica relata, além da pilocarpina, a isopilocarpina (isômero trans da <sup>pilocarpina</sup>), a pilosina (A.S.) e a pilosinina (A.S.), as quais possuem atividades colinérgicas muito fracas quando comparadas à pilocarpina. Esse fato está relacionado a flexibilidade estrutural da molécula de pilocarpina em se ligar ao receptor. As demais moléculas isômeras ou A.S. não possuem flexibilidade estrutural, devido aos grupamentos etil (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>- trans) ou fenil carbinol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CHOH), que fazem impedimento estérico no acoplamento droga – receptor, responsável pela diminuição do efeito colinérgico destas drogas em relação à pilocarpina (BEN-BASSAT et al.<sup>17</sup>, 1971; BEN-BASSAT & LAVIE<sup>16</sup>, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982; BUNDGAARD et al.<sup>25</sup>, 1985; SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989).

Na Tabela 7 [estado consciente e disposição (I) - Atividade Geral] observa-se que a administração do alcalóide secundário extraído, i.p., causa uma pequena redução no estado consciente e disposição, dose dependente. Essa redução diminui com o tempo, devido provavelmente ao alcalóide secundário estar sendo degradado a benzaldeído e pilosinina, que são inativos farmacologicamente e menos ativos que o cloridrato de pilocarpina, conforme observado anteriormente (BEN-BASSAT et al.<sup>17</sup>, 1971; BEN-BASSAT & LAVIE<sup>16</sup>, 1976; BUNDGAARD et al.<sup>25</sup>, 1985).

As Tabelas 8 e 9 mostram que houve uma pequena redução nos cinco parâmetros avaliados de atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II) dos animais que receberam o cloridrato de pilocarpina, i.p.; redução esta, dose não-dependente e que diminui com o tempo. Em doses menores que 240 mg/Kg, os animais mostraram acinesia e catalepsia imediatamente após a injeção. Esse resultado está de acordo com a literatura e confirma que cloridrato de pilocarpina atua ativando os receptores muscarínicos colinérgicos (TURSKI L. et al.<sup>162</sup>, 1986; CLIFFORD et al.<sup>30</sup>, 1987; TURSKI W.A. et al.<sup>163</sup>, 1987; PATEL et al.<sup>112</sup>, 1988; BARONE et al.<sup>13</sup>, 1992; MASLANSKI et al.<sup>87</sup>, 1994).

Nas Tabela 8 e 9 verifica-se que houve uma pequena redução na atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (II) dos animais que receberam o alcalóide secundário extraído, i.p.; redução esta, dose dependente e que diminui com o tempo. Em doses maiores que 300 mg/kg os animais apresentaram tremores leves de cabeça, ocasionalmente movimentos mioclônicos ou cabeça girando, coçar ou bater os dentes. Provavelmente, o alcalóide secundário atua ativando os receptores colinérgicos centrais, de forma semelhante ao cloridrato de pilocarpina, porém com intensidade inferior.

Os reflexos auriculares (III) e corneal (III) para os animais que receberam cloridrato de pilocarpina (Tabela 10) foram elevados, dose não-dependentes e diminuíram com o tempo. O cloridrato de pilocarpina provavelmente estimulou os receptores muscarínicos colinérgicos (SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989; RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993).

Os reflexos auriculares e corneal (III) (Tabela 10) foram pronunciados em doses acima de 120 mg/kg até a 0,5 hora para os animais que receberam A.S. Os efeitos foram dose não-dependentes e diminuíram com o tempo. O alcalóide

secundário extraído atua provavelmente estimulando os receptores muscarínicos colinérgicos a semelhança do cloridrato de pilocarpina.

A Tabela 11 [sistema nervoso central (IV)] mostra uma excitação nos animais que receberam cloridrato de pilocarpina de forma dose dependente e que diminuiu o efeito com o passar do tempo. Provavelmente, o cloridrato de pilocarpina ativa seletivamente todos os receptores muscarínicos centrais, segundo relatos da literatura, causando esse mesmo efeito excitatório (JOPE et al.<sup>62</sup>, 1986; TURSKI L. et al.<sup>162</sup>, 1986; CLIFFORD et al.<sup>30</sup>, 1987; TURSKI W.A. et al.<sup>163</sup>, 1987; PATEL et al.<sup>112</sup>, 1988; BARONE et al.<sup>13</sup>, 1992; RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993; BARONE et al.<sup>12</sup>, 1993; PRZEWLOCKA et al.<sup>129</sup>, 1994; PRIEL et al.<sup>128</sup>, 1996; CECANHO<sup>27</sup>, 1998; RICE & DE LORENZO<sup>136</sup>, 1998).

Na Tabela 11 verifica-se uma estimulação [convulsões e ereção da cuada (IV)] em doses acima de 400 mg/kg para os animais que receberam o A.S., dose dependente e que diminuiu com o tempo. Não foram observados tremores nos animais que receberam o A.S.. O alcalóide secundário extraído atua, provavelmente, por estimulação dos receptores muscarínicos M3. Entretanto, a ligação droga-receptor só ocorre em altas concentrações. Provavelmente, devido ao impedimento estérico causado pelo grupo  $C_6H_5CHOH$  afetando a ligação droga - receptor (BEN-BASSAT et al.<sup>17</sup>, 1971; BEN-BASSAT & LAVIE<sup>16</sup>, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982; BUNDGAARD et al.<sup>25</sup>, 1985; SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989).

A Tabela 12 [sistema nervoso autônomo (V)] mostra uma estimulação nos animais que receberam cloridrato de pilocarpina para os três parâmetros avaliados, ou seja, lacrimação, respiração e salivação, sendo que a estimulação foi dose dependente para os dois primeiros parâmetros e dose não-dependente para o efeito da salivação.

O cloridrato de pilocarpina causa aumento da lacrimação, respiração e salivação, estimulando os receptores muscarínicos centrais (RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993). Os receptores adrenérgicos alfa glândulares poderiam estar sendo ativados indiretamente, pela ação do cloridrato de pilocarpina em receptores da medula adrenal e do gânglio simpático, liberando noradrenalina e adrenalina para a circulação e noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas para as glândulas salivares (RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993). CECANHO<sup>27</sup>, em 1998, concluiu que grande parte da saliva induzida por ativação colinérgica central é secretada por mediação simpática de receptores alfa-1.

Os dados da Tabela 12 [lacrimação (V), respiração (V) e salivação (V)] mostram que o A.S. não provocou lacrimação, provavelmente devido ao tamanho do grupo  $C_6H_5CHOH$ , que não possui uma conformação flexível para se ligar aos receptores muscarínicos centrais (BEN-BASSAT et al.<sup>17</sup>, 1971; BEN-BASSAT & LAVIE<sup>16</sup>, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR<sup>2</sup>, 1982; BUNDGAARD et al.<sup>25</sup>, 1985; SAUERBERG et al.<sup>143</sup>, 1989). Portanto, na ligação droga-receptor, o alcalóide secundário extraído pode ser específico para estimular determinados receptores. Observaram-se, porém, uma intensa salivação e uma estimulação respiratória pronunciada, dose dependente, seguida de convulsão, levando os animais à morte, demonstrando que para alguns efeitos colinérgicos o A.S. conseguiu reproduzir sinais semelhantes ao cloridrato de pilocarpina.

A Tabela 13 [sistema nervoso autônomo (V)] mostra que a administração de cloridrato de pilocarpina (via i.p.) em camundongos causa, dentro de alguns minutos, sinais de estimulação periférica colinérgica, tais como: micção, defecação e piloereção efeitos dose não-dependentes. Esses resultados também estão de acordo com os descritos na literatura para o cloridrato de pilocarpina (SIVADJIAN<sup>151</sup>, 1975; USHIJIMA et al.<sup>166</sup>, 1985; SALAMONE

**et al.<sup>140</sup>, 1986; CLIFFORD et al.<sup>30</sup>, 1987; SAGULIN et al.<sup>139</sup>, 1989; BARONE et al.<sup>12</sup>, 1993; RENZI et al.<sup>135</sup>, 1993).**

Na Tabela 13 [micção (V), defecação (V) e piloereção (V)] verifica-se que a administração do alcalóide secundário extraído, i.p., causou estimulação periférica colinérgica, sendo que a estimulação foi dose não-dependente para os dois primeiros parâmetros e dose dependente para a piloereção. O estímulo da defecção foi pronunciado, em forma de diarreia. Novamente, caracteriza que o A.S. possui atividades sobre o sistema nervoso autônomo com parâmetros semelhantes ao cloridrato de pilocarpina.

Entretanto, sobre o sistema nervoso central o A.S. não produz os efeitos farmacológicos tremores e diferentemente do cloridrato de pilocarpina estimula o efeito ereção da cauda, portanto o A.S. pode ser específico para estimular determinados receptores.

O parâmetro farmacológico convulsão, dose dependente, para o A.S. foi semelhante ao cloridrato de pilocarpina. Provavelmente o A.S. atue estimulando os receptores do sistema nervoso central da mesma maneira do cloridrato de pilocarpina.

O A.S. atua sobre o sistema nervoso autônomo estimulando os efeitos farmacológicos respiração, salivação e piloereção dose dependente e micção e defecação, dose não-dependentes, semelhantes ao cloridrato de pilocarpina. Entretanto, o efeito farmacológico lacrimação não foi observado quando administrado o A.S. Provavelmente o A.S. seja específico para estimular determinados receptores.

## 7. CONCLUSÕES

1. De acordo com os resultados obtidos nas análises de faixa de fusão, absorção de raios infravermelhos e ressonância magnética nuclear, pode-se concluir que o alcalóide secundário extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. coletadas na Represa da Boa Esperança é a epiisopilosina.
2. Com base nos valores da  $DL_{50}$  e nos resultados da avaliação ou “screening” Hipocrático, pode-se afirmar que a epiisopilosina é menos tóxica que o cloridrato de pilocarpina.
3. Excluindo-se os efeitos na lacrimação, salivação e ereção da cauda a epiisopilosina apresentou atividades farmacológicas sobre os sistemas nervosos central e autônomo parassimpático, cujos efeitos foram de menor intensidade quando comparados ao do cloridrato de pilocarpina.



## ANEXOS

Anexo 1. Folhas secas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf.



**Anexo 2.** Tabelas do número de animais mortos em função das doses utilizadas para cada um dos grupos contendo cloridrato de pilocarpina e o alcalóide secundário no estudo da Dose Letal 50% (via intraperitoneal)

Cloridrato de pilocarpina

---

Dose (mg/Kg)	180	240	300	400
--------------	-----	-----	-----	-----

---

n <sup>o</sup> mortos	0	2	3	7
-----------------------	---	---	---	---

---

n = 7

Alcalóide secundário

---

Dose (mg/Kg)	300	400	600	800
--------------	-----	-----	-----	-----

---

n <sup>o</sup> de mortos	0	2	5	10
--------------------------	---	---	---	----

---

n = 10

### Anexo 3. Teste de Toxicidade Aguda em Camundongos

Amostra:----- Via de Administração:-----

Solubilidade:----- Dose:-----

	Normal	30'	1h	2h	4h	24h	48h
Atividade geral	4						
Frenito vocal (I)	0						
Irritabilidade	0						
Resposta ao toque	4						
Resp. aperto cauda	4						
Contorção	0						
Posição trem post.	0						
Ref. Endireitamento (II)	4						
Tônus do corpo	4						
Força para agarrar	4						
Ataxia	4						
Auricular (III)	4						
Corneal	4						
Tremores	0						
Convulsões	0						
Estimulações	0						
Straub (IV)	0						
Hipnose	0						
Anestesia	0						
Lacrimação	0						
Ptosis	0						
Micção	4						
Defecação	4						
Piloereção (V)	0						
Hipotermia	0						
Respiração	4						
Cianose	0						
Mortos							

- I- Estado Consciente e Disposição
- II- Ativ. e Descoordenação do Sist. Motor e Tônus Muscular
- III- Reflexos
- IV- Ativ. Do Sistema Nervoso Central
- V- Ativ. Autônoma

Normal "0"- Variação de 0 a 4

Normal "4"- Variação de 0 a 8

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

1. AAS, P., MACLAGAN, J. Evidence for prejunctional M2 muscarinic receptors in pulmonary cholinergic nerves in the rat. **Br J Pharmacol**, London, v.101, n.1, p.73-76, Sept. 1990.
  2. ABOUL-ENEIN, H.Y., AL-BADR, A.A. Prognosis of the pilocarpine receptor sites. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.4, n.5, p.321-329, 1982.
  3. \_\_\_\_\_, BORNE, R.F. Carbon-13 magnetic resonance spectra of pilocarpine, isopilocarpine and derivatives. **Chem Biomed Environm Instrum**, v.10, n.2, p.231-235, 1980.
  4. AKABORI, S., NUMANO S. Synthese von imidazol-derivaten aus amino-säuren. II. Mitteil: Synthese einiger neuer imidazol-derivate und zur kenninis der konstitution des pilocarpins. **Ber**, v.66B, p.159-165, 1933.
  5. AKESSON, C., SWANSON, C., PATIL, P.N. Muscarinic receptors of rabbit irides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.322, n.2, p.104-110, 1983.
  6. AL-BADR, A.A., ABOUL-ENEIN, H.Y. **Pilocarpine. Analytical profiles of drug substances**. London: Academic Press, 1983. v.12, p.385-427.
- ANDRADE NETO, M. **Contribuição no conhecimento químico do**

---

\* De acordo com a NBR 6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

7. ANDRADE NETO, M. **Contribuição no conhecimento químico do gênero Pilocarpus. P. trachylophus Holmes e P. spicatus Saint Hilaire.** Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, 1990. 133p.
8. ARAÚJO, L.C.L. et al. Avaliação toxicológica aguda e "screening" hipocrático da *Anchietae salutaris* St. Hill.- Violaceae. **Lecta-USF**, Bragança Paulista, v.12, n.1, p.7-21, 1994.
9. BAESCHLIN, K., ETTER, J.C., MOLL, H. Stability of pilocarpine aqueous media. Identification of pilocarpine decomposition products. **Pharm Acta Helv**, v.44, n.5, p.301-309, May 1969.
10. BAEYENS, W. et al. Analysis of pilocarpine and its trans epimer isopilocarpine by capillary electrophoresis. **J Cromatogr**, v.638, n.2, p.319-326, May 1993.
11. BALANSARD, G. et al. Détermination de la pilocarpine et de l'isopilocarpine par chromatographie liquide haute performance en phase normale. **Pharm Acta Helv**, v.61, n.2, p.47-50, 1986.
12. BARONE, P. et al. Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. **Sinapse**, v.14, n.1, p.1-9, May 1993.
13. \_\_\_\_\_. et al. Dopaminergic regulation of epileptic activity. **Neurochem Int**, v.20, p.245S-249S, Mar. 1992. [Supplement]

14. BASSET, J. et al. **Vogel: análise inorgânica quantitativa**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. 690p.
15. BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. The imidazole alkaloids. In: MANSKE, R.H.F., HOLMES, H.L. **The alkaloids: Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press, 1953. v.3, Cap.20, p.201-246.
16. BEN-BASSAT, A., LAVIE, D. Quaternary pilocarpine derivatives as potential acetylcholine antagonists. 2. Alterations in the lactone and imidazole moieties. **J Med Chem**, v.19, n.7, p.928-933, July 1976.
17. \_\_\_\_\_. et al. Quaternary pilocarpine derivatives acting as acetylcholine antagonists. **J Med Chem**, v.14, n.11, p.1066-1069, 1971.
18. BENIGNI, R., CAPRA, C., CATTORINI, P.E. Jaborandi. Pianti Medicinali. **Chimica Farmacologia e Terapia**, v.2, Parte I, p.781-787, 1964.
19. BENN, R. y GÜNTHER, H. Modern Pulse Methods n High resolution NMR Spectroscopy. Background and overview of. Experiments. **Angew. Chem. Int.** v.22, p.350-380, 1983.

20. BIXLER, D., WEBSTER, R.C., MUHLER, J.C. The effect of pilocarpine on the submaxillary gland of the rat. **J Dent Res.**, Washington, v.37, n.4, p.649-653, Apr. 1958.
21. BOGNAR, I.T. et al. Muscarinic inhibition of [3H]-noradrenaline release on rabbits iris in vitro: effects of stimulation conditions on intrinsic activity of methacholine and pilocarpine. **Br J Pharmacol**, v.94, n.3, p.890-900, July 1988.
22. BRION, N., BEAUMONT, D., ADVENIOR, C. Evaluation of the antimuscarinic activity of atropine, terfenadine and mequitazine in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, v.25, n.1, p.27-32, Jan. 1988.
23. \_\_\_\_\_. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: DI STASI. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1995. p.99-107.
24. BUNDGAARD, H., HANSEN, S.H. Hydrolysis and epimerization kinetics of pilocarpine in basic aqueous solution as determined by HPLC. **Int J Pharm**, v.10, n.4, p. 281-289, 1982.
25. BUNDGAARD, H. et al. Pilocarpic acid esters as novel sequentially labile pilocarpine prodrugs for improved ocular delivery. **J Med Chem**, v.28, n.2, p. 979-981, 1985.

26. CARLINI, E.A. "Screening" farmacológico de plantas brasileiras. **Rev Bras Biol**, v.32, n.2, p. 265-274, 1972.
27. CECANHO, R. "Mecanismo autônomos efetores da salivação induzida por ativação colinérgica central". Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 1998. 83p.
28. CHEMNITIUS, F.J. **Prakt Chem**, v.118, n.20, 1928. Apud MAAT, L., BEYERMAN, H.C. Op.cit. Ref. 85.
29. CHUNG, P., CHIN, T., LACH, J.L. Kinetics the hydrolysis of pilocarpine in aqueous solution. **J Pharm Sci**, v.59, n.9, p.1300-1306, Sept. 1970.
30. CLIFFORD, D.B. et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v.23, n.3, p.953-968, 1987.
31. COLLINS, C.H. **Introdução a métodos cromatográficos**. São Paulo: UNICAMP, 1993. Cap. 2, p.279.
32. COOK, C.J. et al. Cholinoreceptors in the isolated costo-uterine muscle of the rat. **J Auton Pharmacol**, v.7, n.2, p.165-174, June 1987.



33. CORRÊA, P.M. **Dicionário de plantas úteis e de exóticas cultivadas.**  
Brasília: Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
34. COSTA, A.F. Fármacos com alcalóides de núcleo glioxalina. In: **FARMACOGNOSIA.** Lisboa: Fund. Calouste Gulbenkian, 1967.  
v.2, p.636-643.
35. CROFT, M.A. et al. Aging effects on accommodation and outflow facility responses to pilocarpine in humans. **Arch Ophthalmol**, v.114, n.5, p.586-592, May 1996.
36. DRAKE, M.V., O'DONNELL, J.J., SANDMAN, R.P. Analysis of commercial pilocarpine preparations by high-performance liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v.71, n.3, p.358-359, 1982.
37. DÖPKE, W., D'HEUREUSE, G. Mechanism of pilocarpine isomerization. **Tetrahedron Letters**, v.15, p.1807-1808, 1968.
38. DUNN, D.L., SCOTT, B.S., DORSEY, E.D. Analysis of pilocarpine and isopilocarpine in ophthalmic solutions by normal-phase high-performance liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v.70, n.4, p.446-449, 1981.
39. DUNN, D.L. THOMPSON, R.E. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation for pilocarpine and isopilocarpine using radial compression columns. **J Chromatogr**, v.264, n.2, p.264-271, 1983.

40. DURIF, C.M. et al. Etude comparative du comportement des phases stationnaires en H.P.L.C. pour le dosage de la piloarpine et de ses impuretés / produits de dégradation. **Pharm Acta Helv**, v.63, n.11, p.294-298, 1988.
41. \_\_\_\_\_. et al. Validation d'une technique HPLC de dosage de la pilocarpine et de ses impuretés / produits de dégradation. **Pharm Acta Helv**, v.63, n.11, p.315-320, 1988.
42. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Pilocarpini Hydrochloridum**. 2.ed., 1981. Part. II, p.633.
43. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Part I, p.v.3.4.5-3.4.5-3.
44. \_\_\_\_\_. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. Part II, p. 20-20-2, 54-54-2.
45. FUNG, P.K. Computer program in basic for stimulation of. ED50 and DL50. **Compt Biol Med**, v.19, n.1, p.131-135, 1989.
46. GANGAROSA, L.P. et al. Iontophoresis for enhancing penetration of dermatologic and antiviral drugs. **J Dermatol**, p.101-115, Nov. 1995.
47. GARG, A.K., MALO, M. Manifestations and treatment of xerostomia and associated oral effects secondary to head on neck radiation therapy. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.128, n.8, p.1128-1133, Aug. 1997.

48. GERRARD, A.W. **Pharm J**, v.5, n.3, p.865, 1875. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
49. \_\_\_\_\_. **Pharm J**, v.5, n.3, p.965, 1875. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
50. \_\_\_\_\_. **Pharm J**, v.6, n.3, p.227, 1876. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
51. \_\_\_\_\_. **Pharm J**, v.7, n.3, p.255, 1877. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
52. GRANT, W.M. Action of drugs on movement ocular fluids. **Ann Rev Pharmacol**, v.9, p.85-94, 1969.
53. GRANT, W.M., M.P., FRANCIS, N.J., LAUDIS, S.C. The role of acetylcholine in regulating secretory responsiveness in rat sweat glands. **Mol Cell Neurosci**, v.6, n.1, p.32-42, Feb. 1995.
54. GREENSPAN, D., DANIELS, T.E. Effectiveness of pilocarpine in posradiaton xerostomia. **Cancer**, v.59, n.6, p.1123-1125, Mar. 1987.
55. GREWE, R. The history glaucoma. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, v.188, n.2, p.167-169, Feb. 1986.

56. GUCHELAAR, H.J., VERMES, A, MEERWALD, J.H Radiation-induced xerostomia; pathophysiology, clinical course and supportive treatment. **Support Care Cancer**, v.5, n.4, p.281-288, July 1997.
57. HAMMERSLAG, F. **The technology of alkaloids**. New york: D. Van Nostrand Company, 1950. p.236-252.
58. HARDY, E. **Bull. Soc. chim. France**, v.24, n.2, p.497, 1875. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
59. HARNACK, E., MEYER, H. **Ann**, v.204, p.67, 1880. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. op. cit. Ref. 15.
60. HOLMSTEDT, B. et al. Jaborandi: an interdisciplinary approach. **J Ethnopharmacology**, v.1, p.3-21, 1979.
61. IMBESI, A.O. Pilocarpus pennatifolius. **Rev Bras Farm**, v.4, p.123-139, 1944.
62. JOPE, R.S., MORRISSET, R.A, SNEAD, OC. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Exp Neurol**, v.91, n.3, p.471-480, Mar. 1986.

63. JOWETT, H.A.D. The constitution of pilocarpine. Part I. **J Chem Soc**, v.77, p.851-860, 1900.
64. \_\_\_\_\_. The constitution of pilocarpine. Part II. **J Chem Soc**, v.79, p.580, 1901.
65. \_\_\_\_\_. The constitution of pilocarpine. Part III. **J Chem Soc**, v.79, p.1331-1338, 1901.
66. \_\_\_\_\_. **J Chem Soc**, v.87, p.794, 1905. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
67. KAASTRA, R.C. **Pilocarpinae**. Monograph number 33: Flora Neotropica. New York: New York Botanical Garden, 1982.
68. KHALIL, S.K. High-Speed liquid chromatographic determination of pilocarpine in pharmaceutical dosage forms. **J Pharm Sci**, v.66, n.11, p.1625-1626, Nov. 1977.
69. KENNEDY, J.M., McNAMARA, P.E. High-performance chromatographic analysis of pilocarpine hydrochloride, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in eye-drop preparations. **J Chromatogr**, v.212, n.3, p.331-338, 1981.
70. KNECZKE, M. Determination of pilocarpine, physostigmine, its degradation product rubreserine and preservatives by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v.198, p.529-533, 1980.

71. LANGENBERG, W. **Ber**, v.57, p.2072, 1924. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
72. LÉGER, E., ROQUES, F. Contribution à l'étude de la carpiline ou pilosine. **Compt. Rend.**, v.156, p.1687-1689, 1913.
73. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Sur la carpiline, nouvel alcaloïde du Jaborand. **Compt. Rend.**, v.155, p.1088, 1912.
74. LEOPOLD, I.H., DUZMAN, E. Observations on the pharmacology of glaucoma. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v.26, p.401-426, 1986.
75. LEVINE, J., HORROCKS, E. The determination of pilocarpine. **J Assoc Offic Agr Chemists**, v.43, p.233-234, 1960.
76. LINK, H., BERNAUER, K. Über die synthese der pilocarpus-alkaloïde isopilosin und pilocarpin, sowie die absolute konfiguration des (+)-isopilosins. **Helv Chim Acta**, v.55, p.1053, 1972.
77. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, OBERHÄNLI, W.E. Configuration of Pilocarpus alkaloids. **Helv Chim Acta**, v.57, n.7, p.2199-2200, 1974.
78. LITCHFIELD, J.T., WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J Pharm Exp Ther**, v.95, p.99-113, 1949.

71. LANGENBERG, W. **Ber**, v.57, p.2072, 1924. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. Op. cit. Ref. 15.
72. LÉGER, E., ROQUES, F. Contribution à l'étude de la carpiline ou pilosine. **Compt. Rend.**, v.156, p.1687-1689, 1913.
73. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Sur la carpiline, nouvel alcaloïde du Jaborand. **Compt. Rend.**, v.155, p.1088, 1912.
74. LEOPOLD, I.H., DUZMAN, E. Observations on the pharmacology of glaucoma. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v.26, p.401-426, 1986.
75. LEVINE, J., HORROCKS, E. The determination of pilocarpine. **J Assoc Offic Agr Chemists**, v.43, p.233-234, 1960.
76. LINK, H., BERNAUER, K. Über die synthese der pilocarpus-alkaloïde isopilosin und pilocarpin, sowie die absolute konfiguration des (+)-isopilosins. **Helv Chim Acta**, v.55, p.1053, 1972.
77. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, OBERHÄNLI, W.E. Configuration of Pilocarpus alkaloids. **Helv Chim Acta**, v.57, n.7, p.2199-2200, 1974.
78. LITCHFIELD, J.T., WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J Pharm Exp Ther**, v.95, p.99-113, 1949.

79. LOCKHART, P.B. et al. Pilot study of controlled-release pilocarpine in normal subjects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v.82, n.5, p.517-524, Nov. 1996.
80. LOOMIS, T.A. Acute and prolonged toxicity test. **J Assoc Offic Anal Chem** v.58, p. 645-705, 1975.
81. LÖWE, W., POOK, K. Pilosin und epiisopilosin. **Liebigs Ann Chem** p.1476-1479, 1973.
82. LUCIO, E.M.R.A. et al. Determinação de pilocarpina e isopilocarpina em preparações oftálmicas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 18. 1995, Caxambú. **Anais ... Caxambú: SBQ, 1995. QA 068, 1995.**
83. \_\_\_\_\_. et al. **Process for the extraction and purification of alkaloids.** U.S.Pat. 5.684.155. 4 Nov. 1997.
84. \_\_\_\_\_. et al. **Process for the extraction and purification of alkaloids.** EP 0 707 589 B1. 7 Oct. 1998.
85. MAAT, L., BEYERMAN, H.C. The imidazole alkaloids. **The alkaloids.** In: MANSKE, R.H.F., HOLMES, H.L. **The alkaloids: Chemistry and Pharmacology.** New York: Academic Press, 1983. v.12, Cap.5, p.281-333.



86. MAAT, L., PETERS, J.A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Preferred conformations of pilocarpine, pilocarpine. HCl and isopilocarpine.HCl in solution deduced from 200 Mhz 1H NMR spectra. **Org Magn Reson**, v.22, n.7, p.454-455, 1984.
87. MASLANSKI, J.A. et al. Assesment of the muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced seizures in mice. **Neuroscience Lett**, v.168, n.1-2, p.225-228, 1994.
88. MALONE, M.H. The pharmacological evaluation of natural products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol**, v. 8, p.127-147, 1983.
89. \_\_\_\_\_., ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v.25, n.4, p.320-331, Dec. 1962.
90. MAX, M.M., POLONOVSKI, M. Pilocarpine. V. Isomerism of pilocarpine and isopilocarpine. **Bull Soc Chim**, v.31, p.1314-1330, 1922.
91. MESEGUER, G. et al. Gamma scintigraphic comparison of eyedrops containing pilocarpine in health volunteers. **J Ocul Pharmacol Ther**, v.12, n.4, p.481-488, Winter 1996.
92. MINETTE, P.A., BARNES, P.J. Prejunctional inhibitory muscarinic receptors on cholinergic nerves in human and guinea-pig airways. **J Appl Physiol**, v.64,n.6, p.2532-2537, 1988.

93. MITRA, A.K., BAUSTIAN, C.L., MIKKELSON, T.J. High-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine in aqueous humor. Derivatization by quaternization of methylimidazole tertiary amine group. **J Pharm Sci**, v.69, n.3, p.257-261, 1980.
94. MOLINENGO, L., ORSETTI, M. Doses versus survival time curves in the evaluation of 'prompt' and 'delayed' acute toxicities. **J Pharm Pharmacol**, v.38, p.54-56, 1986.
95. MONTEIRO, M.L.R., MALTA, R.F.S., SUSANNA JUNIOR, R. Efeito da pilocarpina nos resultados da prova de "prone position" em quarto escuro. **Rev Bras Oftalmol**, v.41, n.1, p.71-75, fev. 1982.
96. MORAES, E.C.F., PALMA, E.T.M. A cromatografia em papel aplicada à química toxicológica. I. Separação e identificação de alcalóides e substâncias afins. **Anais Fac Farm Odont USP**, v.12, p.149-161, 1954.
97. MORTON, J.F. **Major medicinal plants**. Botany, culture and uses. Charles G. Thomas, 1979. p.187-189.
98. MUNIER, R., MACHEBCEUF, M. Microchromatographie de partage sur papier des alcaloides et des diverses bases azotées biologiques. III. Exemples de séparation de diverses alcaloides par la technique en phase solvante acide. **Bull Soc Chim Biol**, v.33, p.846-867, 1951.

99. MUNIER, R., R., MACHBOEUF. Microchromatography separation of alkaloids and various biological nitrogenous bases. II. Utilization of an acids solvent phase. Importance of the dissociation constants of alkaloids in chromatography. **Bull Soc Chim Biol**, v.32, p.192-212, 1950.
100. MUNIER, R., MACHBOEUF, M. Separation of nitrogen-containing bases through microchromatography in acid media. **Compt Rend**, v.230, série II, p.1177-1179, 1950.
101. MURRAY, J.B. The analysis of degraded pilocarpine solutions. **Proc Soc Anal Chem**, p.107-109, July 1970.
102. NEVILLE, G.A., HASSAN, F.B., SMITH, I.C.P. Quantitative analysis of degradation products in pilocarpine hydrochloride ophthalmic formulations. **J Pharm Sci**, v.66, n.5, p.638-642, 1977.
103. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Stereoselective epimerization of pilocarpine in aqueous solution as determined by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Can J Chem**, v.54, p.2094-2100, 1976.
104. NOORDAM, K.A. et al. Determination of the ophthalmic therapeutic pilocarpine and its degradation products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v.153, p.271-273, 1978.

105. NOORDAM, K.A., MAAT, L., BEYERMAN, H.C. Quantitative determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid, and isopilocarpic acid in clinical ophthalmic pilocarpine formulations by reversed-phase liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v.70, n.1, p.96-97, 1981.
106. NYMAN, K. Intraocular pressure reduction with topically administered pilocarpine, timolol and betaloxol in normal tension glaucoma. **Acta Ophthalmol**, Copenhagen, v.71, n.5, p.686-690, Oct. 1993.
107. O'DONNELL, J.J., SANDMAN, R., DRAKE, M.V. Measurement of pilocarpine and its degradation products by high-performance liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v.69, n.9, p.1096-1097, 1980.
108. OLIVALVES, E., OLIVALVES, S., TORTELLI, L. Comparação do efeito do malleato de timolol e pilocarpina na queda de pressão intra-ocular. **Arq Bras Med**, v.63, n.3, p.247-249, maio-jun. 1989.
109. OLIVEIRA, N.M., BETINJANE, J.A. Síndrome de íris de platô. **Arq Inst Penido Burnier**, v.34, n.1, p.22-24, 1992.
110. OROZ, J.S. et al. Effects of topical dehydroergocristine on intraocular pressure, aqueous humor dynamics and pupil diameter in conscious rabbits. A comparative study with timolol and pilocarpine. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.13, n.4, p.231-238, 1991.

111. ORDWAY, G.A. et al. Effect of age on cholinergic muscarinic responsiveness and receptors in the rat urinary bladder. **J Urol**, v.136, n.2, p.492-496, Aug. 1986.
112. PATEL, S., MELDRUM, B.S., FINE, A. Susceptibility to pilocarpine-induced seizures in rats increases with age. **Behav Brain Res**, v.31, p.165-167, 1988.
113. PETIT, A., POLONOVSKI, M. **Bull Soc Chim France**, v.17, n.3, p.554, 1897. Apud BATTERSBY, A.R., OPENSHAW, H.T. op. cit. Ref. 15.
114. PHARMACOPOEIA HELVETICA. **Pilocarpini hydrochloridum**. Editio Sexta 1971, Office Central Fédéral des Imprimés et du Matériel, Suppl. 1978.
115. PINHEIRO, C.U.B. Jaborandi [*Pilocarpus* sp., Rutaceae]: A wild species and its rapid transformation into a crop. **Economic Botany**, v.51, n.1, p.49-58, 1997.
116. PINNER, A., KOHLHAMMER, E. Ueber pilocarpin. (Mittheilungen). **Ber**, v.33, p.1424-1431, 1900.
117. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Ueber pilocarpine. (II. Mittheilung). **Ber**, v.33, p.2357-2363, 1900.

118. PINNER, A., KOHLHAMMER, E.. Ueber pilocarpin. (III. Mittheilung). **Ber**, v.34, p.727-737, 1901.
119. \_\_\_\_\_, SCHWARZ R. Ueber pilocarpin. **Ber**, v.35, p.192-210,1902.
120. \_\_\_\_\_, SCHWARZ R. Ueber pilocarpin. Constituion des alkalöids.(II. Mittheilung). **Ber**, v.35, p.2441-2459, 1902.
121. POLJAKOWA, A.M., PREOBRASHENSKI, W.A., PREOBRASHENSKI, N.A. Über die alkaloide der Jaborandi-blätter. IX. Mitteil : Die synthese des racem. iso-pilocarpins. **Ber**, v.69B, p.1314-1316, 1936.
122. POPL, M., KY, L.D., STRNADOVÁ, J. Reversed-phase liquid chromatography of some alkaloids. **J Chromatogr Sci**, v.23, n.3, p.95-100, 1985.
123. POTTER, D.E. Adrenergic pharmacology of aqueous humor dynamics. **Pharmacol Ver**, v.33, p.133-153, 1981.
124. PREOBRASHENSKI, N.A., KABATSCHNIK, M.J. Über die alkaloide der Jaborani-blätter. IV. Mitteil: Diazomethyl- racem.- isopilopyl-keton und seine umwandlungg- produkte. **Ber**, v.66B, p.1641-1645, 1933.

125. PREOBRASHENSKI, N.A., POLJAKOWA, A.M., PREOBRASHENSKI, W.A. Über die Alkaloide der Jaborandi-blätter. X. Mitteil: Synthese und isomerisation des racem. Pilocarpins. **Ber**, v.69B, p.1835-1837, 1936.
126. \_\_\_\_\_, WOMPE, A.F., PREOBRASHENSKI, W.A. Struktur und Synthese des iso-pilocarpins (II- Mitteil). **Ber**, v.66B, p.1187-1193, 1933.
127. \_\_\_\_\_. et al. Über Alkaloide der Jaborandi-blätter. III. Mitteil: Synthese des pilocarpins und des pilocarpidins. **Ber**, v.66B, p.1536-1541, 1933.
128. PRIEL, M.R., FERREIRA, S.N., CAVALHEIRO, E.A. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, v.26, n.1, p.115-121, 1996.
129. PRZEWLOCKA, B., MACHELSKA, H., LASON, W. Kappa opioid receptor agonists inhibit the pilocarpine-induced seizures and toxicity in the mouse. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.4, n.4, p.527-533, Dec. 1994.
130. PUUSTJARVI, T.J., REPO, L.P. Timolol-pilocarpine, fixed-ratio combinations in the treatment of chronic open angle glaucoma. A controlled multicenter study of 48 weeks. **Arch Ophthalmol**, v.110, n.12, p.1725-1729, Dec. 1992.

131. PYMAN, F.L. Pilocarpine: A new alkaloid from *Pilocarpus microphyllus*.  
**J Chem Soc**, v.101, p.2260-2271, 1912.
132. QUOCK, R.M., FUJIMOTO, J.M., ISHII, T.K., LANGE, D.G.  
Microwave facilitation of methylatropine antagonism of central  
cholinomimetic drug effects. **Radiat Res**, v.105, p.328-340, 1986.
133. RANG, H.D., DALE, M.M. *Farmacologia: Transmissão Colinérgica*. 2.  
Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1991, p.95.
134. RENDI, M.A., ELLIS P.P., GAL J. High-performance chromatography  
assay for pilocarpine in aqueous humor. **J Chromatogr**, v.336, n.2,  
p.337-344, 1984.
135. RENZI, A. et al. Involvement of the Central Nervous System in the  
salivary secretion induced by pilocarpine in rats. **J Dent Res**,  
Washington, p.1481-1484, Nov. 1993.
136. RICE, A.C., DE LORENZO, R.J. NMDA receptor activation during  
status epilepticus is required for the development of epilepsy. **Brain  
Res**, v.782, n.1-2, p.240-247, Jan. 1998.
137. ROBIN, A.L. Ocular hypotensive efficacy and safety of a combined  
formulation of betaxolol and pilocarpine. **Trans Am Ophthalmol  
Soc**, v.94, p.89-101, 1996.



138. RYAN J.A. Sensitive infrared measurement of pilocarpine-isopilocarpine isomerization. **Anal Chim Acta**, v.85, p.89-93, 1976.
139. SAGULIN, G.B. et al. Mechanism of action of calcitonin on secretion in rat submandibular gland. **Acta Physiol Scand**, v.136, p.435-442, 1989.
140. SALAMONE, J.D. et al. Behavioural and pharmacological characterization of the mouth movements induced by musarinic agonists in the rat. **Psychopharmacology**, Berl, v.88, n.4, p.467-471, 1986.
141. SAREL, S., USIELI, V., TEDESCHI, E. Re-assignment of configurations in isopilosine stereoisomers. **Tetrahedron Lett**, v.2, p.97-98, 1975.
142. SAS Institute Inc. (ed): JMP<sup>®</sup>, user's guide: version 3.1 of JMP. Cary, SAS Institute, 1995.
143. SAUERBERG, J.C., MUSSIE, E.W., RAPOPORT, H. Cyclic carbamate analogues of pilocarpine. **J Med Chem**, v.32, p.1322-1326, 1989.
144. SCHULMAN, J.M., PECK, R.C., DISCH, R.L. Recognition of cholinergic agonists by the muscarinis receptor. 2. Pilocarpine. **J Med Chem**, v.34, p. 1455-1459, 1991.

145. SCOTT, B.S., DUNN, D.L., DORSEY, E.D. Analysis of pilocarpine and isopilocarpine in ophthalmic solutions by UV spectrophotometry -polarimetry. **J Pharm Sci**, v.70, n.9, p.1046, Sept. 1981.
146. SHARAPIN, N. Process for the extraction of. jaborandi. Pat. Bras. Depositada, n. PI 9800138-8, 1996.
147. SHUPE, I.S. Colorimetric determination of pilocarpine and its separation from other alkaloids. **J Assoc Official Agr Chem**, v.24, p.757-766, 1941.
148. SHIMAZU, M. et al. A new approach to anallysis of humor sweating. **Experientia**, v.52, n.2, p.131-135, Feb. 1996.
149. SIDHU, A.S., KENNEDY, J.M., DEEBLE, S. General method for the analysis of pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v.391, n.1, p.233-242, 1987.
150. SIGMA Chem. Co. **Biochemical Reagents for Science Research. Sigma Transductional. Cell Culture. Imunochemical**, 1998. p.202.
151. SIVADJIAN, M.J. Etude comparative de la fonction sudorale chez le rat et la souris. **C R Acad Sci**, Paris, v.280, p.77-80, 1975.

152. SOUZA BRITO, A.R.M. Farmacologias de plantas medicinais. In: DI STASI. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1995. p. 87-97.
153. SPÄTH, E., KUNZ, E. Jaborandi alkaloids. I. Pilocarpidine. **Ber**, v.58B, p.513-518. 1925.
154. STERNITZKE, K.D., FAN, T.Y., DUNN, D.L. High-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine hydrochloride and its degradation products using a  $\beta$ -cyclodextrin column. **J Chromatogr**, v.589, p.159-164, 1992.
155. SZEPESI, G. et al. Investigation of degradation mechanism of pilocarpine by HPLC. **Pharmazie**, v.38, n.2, p.94-98, 1983.
156. TANIGUCHI, T., KITAZAWA, Y. A risk-benefit assessment of drugs in the management of glaucoma. **Drug saf**, v.11, n.1, p.68-74, July 1994.
157. TAYLOR, S.E., HASHIMI, I. Pilocarpine, an old drug; a new formulation. **Tex Dent J**, v.113, n.10, p.9-13, Oct. 1996.
158. TEDESCHI, E., KAMIONSKI, J., FACKLER, S. The isolation of pure pilosine and epi-isopilosine from leaves of *Pilocarpus jaborandi*. **Israel J Chem**, v.11, n.5, p.731-733, 1973.

159. TEDESCHI, E., KAMIONSKI, J., FACKLER, S. Isolation characterization and synthesis of trans-pilosine stereoisomers occurring in nature. Circular Dichroism and mass spectral studies. **J Org Chem**, v.39, p.1864, 1974. THIES, H.,
160. THIES, H., SÖRGENFREY, C.H. The spectrophotometric determination of alkaloids in the ultraviolet spectral region at 2537 Å. **Arch Pharm**, v.291, p.68-76, 1958.
161. TSURUMI, K. et al. Cathartic activity of spasmogens in mice, rats and guinea-pigs. **Nippon Yakurigaku Ku Zasshi**, v.75, n.4, p.309-314, May 1979.
162. TURSKI, L. et al. Seizures produced by pilocarpine: neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. **Brain Res**, v.398, p.37-48, 1986.
163. TURSKI, W.A., et al. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res Reviews**, v.12, p.281-305, 1987.
164. \_\_\_\_\_, et al. Seizures produced by pilocarpine in mice, a behavioural, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res**, v.321, n.2, p.237-253, Nov. 1984.
165. UNITED STATES PHARMACOPOEIA. **Pilocarpine Hydrochloride and pilocarpine nitrate**. Earten: Mack Publishing, 1995. v.23, part I, p.1226-1229.

166. USHIJIMA, I. et al. Characteristics of yawning behavior induced by apomorphine, physostigmine and pilocarpine. **Arch int Pharmacodyn**, v.273, p.196-201, 1985.
167. VALLE, L.B.S. et al. **Farmacologia integrada** Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. v.1.
168. VAN ACKEREN, J.L., VENABLE, R.M., WAINER, I.W. Separation and analysis of pilocarpine, isopilocarpine and pilocarpic acid by reverse phase liquid chromatography: Collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem**, v.67, n.5, p.924-926, 1984
169. VESPALEC, R., FIEDOROVA, M., SUBERT, J. Problems connected with HPLC separation of pilocarpine from its degradation products by means of silica gel and water-based mobile phase. **Pharmazie**, v.43, n.10, p.689-691, 1988.
170. VILCHES, J.J., NAVARRO, X., VERDÚ, E. Functional sudomotor responses to cholinergic agonists and antagonists in the mouse. **J Auton Nerv Syst**, v.55, n.1-2, p.105-111, Oct. 1995.
171. VOIGTLÄNDER, H.W., ROSENBERG, W. Carpiline (Pilosine) and Isopilocarpine. **Arch Pharm**, v.292, p.579-585, 1959.
172. \_\_\_\_\_. et al. Epiisopiloturin, ein neues Pilocapus- alkaloid. **Arch Pharm**, v.311, p.927-935, 1978.

173. VON DOZENT, O.E., STRAUB, A.D. Paper chromatographic determination of alkaloids. **Arzneimitter-Forch**, v.5, p.342-348, 1955.
174. WASHBURN W.H. Infrared analysis of active ingredients in ointments. II. Pilocarpine Hydrochloride and phenacaine hydrochloride. **J Am Pharm Assoc**, p.698-699, 1953
175. WEBB, J.W., KELLEY, R.S., MCBAY, A.J. A colorimetric assay for pilocarpine and its salts. **J Am Pharm Assoc**, v.41, p.278-279, 1952.
176. WEBER, J.D. Pilocarpine hydrochloride in ophthalmic solutions: Modification of a high-pressure liquid chromatographic determination and survey. **J Assoc Off Anal Chem**, v.59, n.6, p.1409-1415, 1976.
177. WILFFERT, B. et al. Role of ganglionic M-1 e M-2 receptors in the neuronal control of the cardiovascular system of the normotensive rat as determined with pilocarpine. **Eur J Pharmacol** , v.95, n.1-2, p.109-116, Nov. 1983.
178. WISEMAN, L.R., FAULDS, D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. **Drugs**, v.49, p.143-155, 1995.

179. WOOD, R.W., ROBINSON, J.R. High-performance chromatographic determination of pilocarpine and pilocarpic acid in ocular tissues. **Int J Pharm**, v.20, n.3, p.285-293, 1984.
180. WYNN, R.L. Oral pilocarpine (Salagen)—a recently approved salivary stimulant. **Gen Dent**, v.44, n.1, p.29-30, Jan. 1996.
181. YANG, C.C. et al. Anterior chamber angles shallowing and intraocular pressure after topical pilocarpine. **J Ocul Pharmacol Ther**, v.13, n.3, p. 219-224, June 1997.
182. ZADOK, D. et al. Combined timolol and pilocarpine vs pilocarpine alone and timolol alone in the treatment of glaucoma. **Am J Ophthalmol**, v.117, n.6, p.728-731, June 1994.
183. ZAVYALOV, S.I. **Dokl Akad Nauk SSSR**, v.82, p.257, 1952. Apud MAAT, L., BEYERMAN, H.C. Op. cit. Ref. 85.