

# Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da epiisopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf.

Lucio, E. M. R. de A.<sup>1</sup>; Rosalen, P.L.<sup>2</sup>; Sharapin, N.<sup>3</sup>;  
Souza Brito, A.R.M.<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas; <sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense; <sup>4</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

**RESUMO:** A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf. recebe a designação geral de jaborandi, fonte industrial de pilocarpina, utilizada no tratamento do glaucoma. O jaborandi contém vários alcalóides secundários. A epiisopilosina foi submetida a testes farmacológicos para determinação da DL<sub>50</sub>, *screening* hipocrático e determinação do peso corporal dos animais sobreviventes da DL<sub>50</sub>. A análise dos resultados revelou que a epiisopilosina apresentou DL<sub>50</sub> duas vezes maior que a pilocarpina. Os animais que sobreviveram à determinação da DL<sub>50</sub> ganharam peso no período de 14 dias de observação. A epiisopilosina demonstrou ser um estimulante periférico do sistema nervoso parassimpático, semelhante à pilocarpina, somente em altas doses.

**Unitermos:** epiisopilosina, avaliação toxicológica, *screening* hipocrático, toxicidade aguda, jaborandi, pilocarpina.

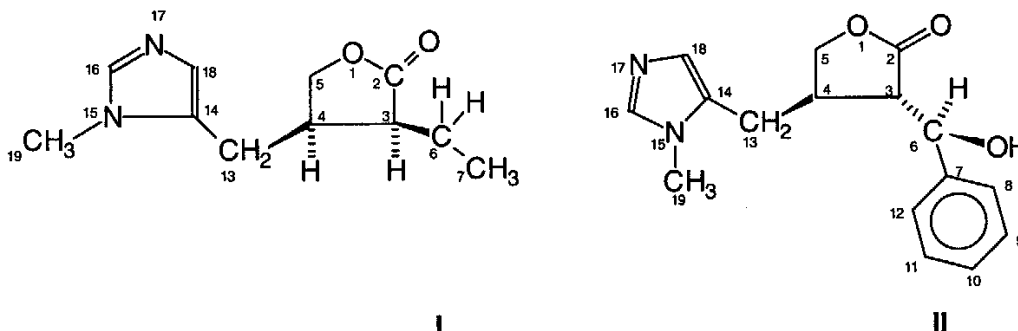
**ABSTRACT:** *Pilocarpus microphyllus* Stapf. (Rutaceae) is a source for industrial isolation of pilocarpine, alkaloid used in the treatment of glaucoma. It contains several secondary alkaloids; one of them being epiisopilosine. Pharmacological evaluation showed DL<sub>50</sub> value of epiisopilosine two times higher than of pilocarpine. Epiisopilosine also showed to be a pilocarpine-like peripheric stimulant of parasympatic nervous system, although in higher dosis.

**Key words:** epiisopilosine, toxicologic evaluation, hipocratic screening, acute toxicity, jaborandi, pilocarpine.

## INTRODUÇÃO

Jaborandi é o nome popular que designa diversas espécies do género *Pilocarpus*, da família das Rutáceas, que compreende treze espécies: *P. microphyllus*, *P. trachylophus*, *P. pennatifolius*, *P. jaborandi*, *P. spicatus*, *P. pauciflorus*, *P. racemosus*, *P. giganteus*, *P. grandiflorus*, *P. goudotianus*, *P. peruvianus*, *P. riedelianus* e *P. demerarae* (Kaastra, 1982). A principal espécie oficial e a única utilizada pela indústria químico-farmacêutica é a *P. microphyllus*, também referida como Jaborandi-do-Maranhão, devido ao seu teor em pilocarpina (I), alcalóide utilizado no tratamento do glaucoma. A forma oral de pilocarpina é utilizada em pacientes com xerostomia, efeito comum em indivíduos submetidos à radioterapia na cavidade oral e regiões do pescoço (Guchelaar et al., 1997).

As folhas do Jaborandi-do-Maranhão contêm, além da pilocarpina, outros alcalóides, em número e concentrações variáveis. Os teores de alcalóides totais variam de 0,6 a 1,8 %, sendo que 60 – 90 % destes valores são representados pela pilocarpina (Benigni et al., 1964). Estudos prévios conduzidos em nosso laboratório da análise de folhas de Jaborandi-do-Maranhão, procedentes da região compreendida pelos municípios de Benedito Leite (MA) e Uruçuí (PI), revelaram teor de 0,61 % de alcalóides totais e teor de pilocarpina extremamente baixo (inferior a 20 % do total), porém rico em alcalóides secundários. Este dado, ainda não registrado na literatura especializada, fez com que estas folhas fossem selecionadas para estudos de isolamento, identificação e testes farmacológicos dos alcalóides secundários, sendo a epiisopilosina (II) o principal componente da fração alcaloídica (Lucio, 1999).



Neste trabalho investigou-se a toxicidade aguda de epiisopilosina em camundongos, além de se submeter os animais ao “*screening* hipocrático” (Malone, 1983) com o alcalóide secundário.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta do material vegetal

As folhas do Jaborandi-do-Maranhão (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) foram colhidas às margens da Represa de Boa Esperança, nos municípios de Benedito Leite (MA) e Uruçuí (PI) nos meses de julho a novembro de 1995.

### Isolamento de epiisopilosina

Dez quilogramas (kg) de folhas secas ao sol foram esgotadas com solução de ácido sulfúrico a 2 % (v/v) e a solução aquosa ácida purificada pelo tratamento com sulfato de alumínio e hidróxido de cálcio (Lucio, 1997, 1998). A solução aquosa ácida purificada foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9,5 e extraída com diclorometano. Após a evaporação do solvente, as bases dos alcalóides foram dissolvidas em mistura acetona/metanol 98:2 (V/V) e transformadas nos respectivos cloridratos pela ação de HCl gasoso. A epiisopilosina foi isolada através de sucessivas recristalizações em metanol. Foram obtidas 20 g de cloridrato de epiisopilosina (faixa de fusão 216-218 °C).

### Identificação da epiisopilosina

A epiisopilosina foi identificada através da comparação dos resultados experimentalmente obtidos de espectrometria do infravermelho, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e faixa de fusão com os dados disponíveis na literatura (Tedeschi et al., 1973).

### Animais

Foram utilizados 10 camundongos (espécie *Mus musculus*) machos, adultos, linhagem Swiss spf, provenientes do CEMIB/UNICAMP e LARA (Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura – Campinas - SP) pesando aproximadamente 30 g, para cada um dos

grupos tratados e para o grupo controle. No período de adaptação, os animais foram mantidos na sala de testes por, pelo menos, 7 dias antes do início do ensaio. Todos os experimentos foram realizados em condições de temperatura ambiente. Utilizou-se um total de 250 animais.

#### **Determinação da DL<sub>50</sub>**

A determinação da DL<sub>50</sub> foi levada a efeito com as amostras de cloridrato de epiisopilosina e cloridrato de pilocarpina (Sigma), servindo este último como parâmetro de comparação. Os animais foram deixados em jejum por 12 horas, antes da administração das substâncias teste por via intraperitoneal. As doses administradas foram: a) para o cloridrato de pilocarpina: 4, 40, 120, 180, 240, 300 e 400 mg/kg de peso corporal; b) para o cloridrato de epiisopilosina: 4, 40, 120, 180, 240, 300, 400, 600, 800 e 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., 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 e Wilcoxon (1949), utilizando o "software" Probit (Fung, 1989). O grupo controle recebeu solução de NaCl 0,9 % (m/v), i.p. no volume de 10 ml/kg de peso corporal.

#### **Screening hipocrático**

A avaliação ou *screening* hipocrático fornece uma estimativa geral de natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida sobre: estado consciente e disposição (I), atividade e coordenação do sistema motor (II), reflexos (III), atividades sobre o sistema nervoso central (IV) e sistema nervoso autônomo (V) (Malone e Robichaud, 1962; Malone, 1983). Foram ensaiados o cloridrato de epiisopilosina e o cloridrato de pilocarpina, servindo este último como parâmetro de avaliação. O ensaio foi realizado em grupos contendo 7 camundongos para cada dose. As amostras foram administradas nas doses descritas acima, por via i.p. As avaliações foram feitas 30 minutos, 1, 2, 4, 24 e 48 horas após a administração das amostras. Os animais sobreviventes da determinação da DL<sub>50</sub> foram pesados e observados a cada 24 horas até o 14º dia após os tratamentos, para verificação de possíveis efeitos tardios da substância e para determinar a evolução da perda ou ganho do peso corporal. Os efeitos médios foram obtidos a partir dos dados anotados individualmente (Araújo et al., 1994).

#### **Análise estatística**

Na determinação da DL<sub>50</sub> o número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado e a DL<sub>50</sub> calculada pelo método de Litchfield e Wilcoxon (1949) utilizando-se o "software" Probit (Fung, 1989). Para a análise estatística de determinação do peso corporal, os animais sobreviventes da DL<sub>50</sub> foram pesados e observados a cada 24 horas até o 14º dia após os tratamentos. Os dados relativos ao peso corporal entre os grupos que receberam cloridrato de pilocarpina, cloridrato de epiisopilosina (teste) e solução de cloreto de sódio a 0,9 % m/V (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., 1995).

## **RESULTADOS**

#### **Determinação da DL<sub>50</sub>**

Os valores da DL<sub>50</sub> para o cloridrato de pilocarpina e cloridrato epiisopilosina encontram-se na Tabela 1.

**TABELA 1.** Valores de Dose Letal 50% ( $DL_{50}$ ), 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 cloridrato de epiisopilosina.

Grupo	Equação	$DL_{50}$ (ip) em mg/kg	Intervalo de Confiança
Cloridrato de Pilocarpina	$23,8 + 11,7 \ln(d)$	253,2 (2,76)	(253,2; 324,9)
Cloridrato de epiisopilosina	$19,3 + 8,8 \ln(d)$	540,9 (3,08)	(470,6; 621,7)

É possível observar que o cloridrato de epiisopilosina, administrado por via i.p. mostrou uma  $DL_{50}$  aproximadamente duas vezes maior do que o cloridrato de pilocarpina, o que significa toxicidade aguda menor de epiisopilosina em relação a pilocarpina.

#### Determinação do peso corporal

Houve ganho de peso em todos os grupos avaliados no período de 14 dias de observação (Tabela 2).

**TABELA 2.** Ganho de peso médio (g) (desvio padrão) dos grupos experimentais que receberam o padrão de cloridrato de pilocarpina e cloridrato de epiisopilosina, após 14 dias de experimento.

Grupos	Ganho de Peso (g)			
	Cloridrato de pilocarpina	$n_p$	Cloridrato de epiisopilosina	$n_p$
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

\* Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,1160$ ) quando comparados na vertical ou na horizontal. Comparação para todos os pares por Anova; Tukey-Kramer – HSD.

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

Não houve diferença estatisticamente significativa quando se analisaram os ganhos de peso entre os animais que receberam cloridrato de pilocarpina e cloridrato de epiisopilosina nas diferentes doses e também quando comparados com o controle. Também não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os ganhos de peso entre os animais que receberam cloridrato de pilocarpina ou cloridrato de epiisopilosina na mesma dose ou ainda entre os grupos controle.

**Screening hipocrático**

Os valores médios observados no *screening* hipocrático do cloridrato de epiisopilosina e do cloridrato de pilocarpina, em várias doses, estão demonstrados nas tabelas 3 a 9.

**TABELA 3.** Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de epiisopilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* – atividade geral.

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.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.		
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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

I - Estado consciente e disposição  
Normal "0" - Escala de 0 a 4

+ = mortos  
Normal "4" - Escala de 0 a 8

**TABELA 4.** Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de episopilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* - atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular .

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.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.		
II Resposta ao Toque	Controle	4	4	2	4	3	4	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	5	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	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	240	4	4	3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4		
	300	4	4	3	3	3	3	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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

II - Atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular  
Normal "0" - Escala de 0 a 4

+ = mortos  
Normal "4" - Escala de 0 a 8

**TABELA 5.** Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de epiisopilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* – atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular.

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.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.		
II Força para agarrar	4	4	4	3	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	1	3	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4		
	240	4	4	2	3	2	3	3	4	3	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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
II Tônus do corpo	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		
	120	4	4	2	3	2	4	3	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	2	3	2	4	3	4	3	4	4	4	4	4		
	300	4	4	2	3	2	3	3	4	5	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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

II- Atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular.  
Normal "0"- Escala de 0 a 4

+ = mortos  
Normal "4"- Escala de 0 a 8

**TABELA 6.** Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de epiisopilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* - Reflexos.

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.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.	c.p.	c.e.		
		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 Comeal	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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

III - Reflexos.

Normal "0" - Escala de 0 a 4

+ = mortos

Normal "4" - Escala de 0 a 8



**TABELA 7.** Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de episipilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* – Sistema Nervoso Central

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.
IV  Tremores	4	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	
	120	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	
	240	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	3	0	3	0	3	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	
	40	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	
	180	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	
	300	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	0	0	4	3	4	3	+	0	+	0	+	0	+	0
	600	-	0	-	4	-	4	-	3	-	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	
	40	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	
	180	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	
	300	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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

V- Sistema Nervoso Central.  
Normal "0"- Escala de 0 a 4

+ = mortos  
Normal "4"- Escala de 0 a 8

**TABELA 8.** Valores médios obtidos para cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de episopilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* – SNA.

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.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.		
V Lacrimação	Controle	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		
	40	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		
	180	0	0	3	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		
	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	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0		
	800	-	0	-	0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
1000	-	0	-	0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+			
V 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			
	40	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			
	180	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
	240	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
	300	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
	400	4	4	5	6	4	4	+	4	+	4	+	4	+	4		
	600	-	4	-	7	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4		
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+			
V Salivação	4	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4			
	40	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4			
	120	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4			
	180	4	4	6	4	6	4	4	4	4	4	4	4	4			
	240	4	4	7	4	7	4	4	4	4	4	4	4	4			
	300	4	4	7	4	7	4	4	4	4	4	4	4	4			
	400	4	4	7	5	7	5	+	4	+	4	+	4	+	4		
	600	-	4	-	7	-	7	-	4	-	4	-	4	-	4		
	800	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
	1000	-	4	-	7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		

V- Sistema Nervoso Autônomo  
Normal "0"- Escala de 0 a 4+ = mortos  
Normal "4"- Escala de 0 a 8

**TABELA 9.** Valores médios obtidos para o cloridrato de pilocarpina (c.p.) e cloridrato de epiisopilosina (c.e.) na avaliação ou *screening* – SNA.

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.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.	c..p.	c.e.
V Micção	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	4	4	4	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4
	40	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	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	

V – Sistema Nervoso Autônomo. + = mortos  
 Normal "0"- Escala de 0 a 4      Normal "4"- Escala de 0 a 8

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do estado consciente e disposição (Tabela 3) mostram que houve uma pequena redução no estado consciente e disposição dos animais que receberam cloridrato de pilocarpina. A administração de cloridrato de epiisopilosina causa uma pequena redução no estado consciente e disposição dose dependente. Esta redução, em ambos os casos diminui com o tempo, provavelmente devido à degradação da pilocarpina a isopilocarpina e ácido pilocárpico e da epiisopilosina a benzaldeído e pilosinina, todos inativos farmacologicamente.

As Tabelas 4 e 5 mostram que houve pequena redução nos cinco parâmetros avaliados de atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular dos animais que receberam cloridrato de pilocarpina, redução 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. Este resultado está de acordo com a literatura e confirma que cloridrato de pilocarpina atua ativando os receptores muscarínicos colinérgicos (Clifford et al., 1987; Patel et al., 1988; Barone et al., 1992; Malanski et al., 1994). O mesmo efeito também foi observado com o cloridrato de epiisopilosina; entretanto, em doses maiores que 300 mg/kg os animais apresentaram tremores leves de cabeça, ocasionando movimentos mioclônicos, ou cabeça girando, coçar ou bater os dentes. Provavelmente, o cloridrato de epiisopilosina atua ativando os receptores colinérgicos centrais de forma semelhante ao cloridrato de pilocarpina, porém com intensidade inferior.

Os reflexos auricular e corneal (Tabela 6) para os animais que receberam cloridrato de pilocarpina foram elevados, dose não-dependente e diminuíram com o tempo. Estes reflexos foram pronunciados em doses acima de 120 mg/kg até 30 minutos para os animais que receberam cloridrato de epiisopilosina.

A Tabela 7 mostra uma excitação nos animais que receberam cloridrato de pilocarpina de forma dose dependente, diminuindo o efeito com o passar do tempo. Nos animais que receberam cloridrato de epiisopilosina verificou-se estimulação (convulsões e Straub) em doses acima de 400 mg/kg, dose dependente e que diminui com o tempo.

A Tabela 8 mostra estimulação nos animais que receberam cloridrato de pilocarpina nos três parâmetros avaliados: lacrimação, respiração e salivação, sendo que a estimulação foi dose dependente para os dois primeiros parâmetros e dose não-dependente para a salivação. A administração do cloridrato de epiisopilosina não provocou lacrimação. Observaram-se, porém, intensa salivação e estimulação respiratória pronunciada, dose dependente, seguida de convulsão, levando os animais à morte.

A Tabela 9 mostra que a administração do cloridrato de pilocarpina causa, dentro de alguns minutos, sinais de estimulação periférica colinérgica, tais como micção, defecação e piloereção, efeitos dose não-dependentes. A administração do cloridrato de epiisopilosina causou estimulação periférica colinérgica dose não-dependente e que diminui com o tempo. O estímulo da defecação foi pronunciado, em forma de diarreia.

## CONCLUSÕES

1. Com base nos valores da DL50 e nos resultados da avaliação ou *screening* Hipocrático pode-se afirmar que o cloridrato de epiisopilosina apresenta menor toxicidade que o cloridrato de pilocarpina.
2. O cloridrato de epiisopilosina apresenta estimulação semelhante à do cloridrato de pilocarpina, sugerem suas atividades farmacológicas sobre os sistemas nervosos central e autônomo parassimpático, cujos efeitos são de intensidade inferior aos do cloridrato de pilocarpina.

**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Phytosul Produtos Naturais Ltda o fornecimento de folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. necessários para a execução do presente trabalho.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ARAÚJO, L.C.L. et al. Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da *Anchietae salutaris* St. Hill.- Violaceae. **Lecta-USF**, Bragança Paulista, 12 (1):7-21, 1994.
- BARONE, P. et al. Dopaminergic regulation of epileptic activity. **Neurochem. Int.**, 20: 245S-249S, [Supplement], 1992.
- BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P.E. Jaborandi. **Pianti Medicinali. Chimica, Farmacologia e Terapia**, 2 (Parte I): 781-787, 1964.
- CLIFFORD, D.B. et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, 23(3): 953-968. 1987.
- FUNG, P.K. Computer program in basic for stimulation of ED 50 and DL 50. **Compt. Biol. Med.**, 19(1): 131-135, 1989.
- GUCHELAAR, H.J.; VERMES, A.; MEERWALD, J.H. Radiation-induced xerostomia; pathophysiology, clinical course and supportive treatment. **Support Care Cancer**, 5(4): 281-288, 1997.
- KAASTRA, R.C. **Pilocarpinae**. Monograph number 33: Flora Neotropica. New York: New York Botanical Garden, 1982.
- LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharm. Exp. Ther.**, 95: 99-13, 1949.
- LUCIO, E.M.R. de A. Estudo químico e farmacológico de alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Tese de doutorado**. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 136p. 1999.
- LUCIO, E.M.R. de A. et al. **Process for the extraction and purification of alkaloids**. U.S.Pat. 5.684.155. 4 Nov. 1997.
- LUCIO, E.M.R. de A. et al. **Process for the extraction and purification of alkaloids**. EP 0 707 589 B1. 7 Oct. 1998.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, 25(4): 320-331, 1962.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natural products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.**, 8: 127-147, 1983.
- MASLANSKI, J.A. et al. Assesment of the muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced seizures in mice. **Neuroscience Lett**, 68(1-2): 225-228, 1994.
- PATEL, S.; MELDRUM, B.S.; FINE, A. Susceptibility to pilocarpine-induced seizures in rats increases with age. **Behav. Brain Res.**, 31: 165-167, 1988.
- SAS Institute Inc. (ed): JMP® user's guide: version 3.1 of JMP. Cary, SAS Institute, 1995.
- TEDESCHI, E.; KAMIONSKI, J.; FALKLER, S., The isolation of pure pilosine and epiisopilosine from leaves of *Pilocarpus jaborandi*. **Israel J. Chem.**, 11(5): 731-733, 1973.

**Autor para correspondência:**

Profª. Drª. Elisabeth Maria Rocha de Albuquerque Lucio  
Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal Fluminense  
Rua Mário Viana 523 - Santa Rosa  
24241-000 – Niterói - RJ  
E-mail: farm@cruiser.com.br