

ISOLAMENTO DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA A PARTIR DA BIOMASSA DO  
JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*) E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES  
ANTIBACTERIANA, ANTILEISHMANIA, ANTIVIRAL, ANTIESQUISTOSOMA E  
SIALAGOGA

LEIZ MARIA COSTA VERAS MIURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

TERESINA  
ESTADO DO PIAUÍ – BRASIL  
OUTUBRO – 2009

ISOLAMENTO DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA A PARTIR DA BIOMASSA DO  
JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*) E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES  
ANTIBACTERIANA, ANTILEISHMANIA, ANTIVIRAL, ANTIESQUISTOSOMA E  
SIALAGOGA

LEIZ MARIA COSTA VERAS MIURA

Bióloga

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza  
Batista

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza  
Almeida Leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal, da Universidade  
Federal do Piauí, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal,  
Área de Concentração: Sanidade e Reprodução  
Animal.

TERESINA  
ESTADO DO PIAUÍ – BRASIL  
OUTUBRO – 2009

ISOLAMENTO DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA A PARTIR DA BIOMASSA DO  
JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*) E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES  
ANTIBACTERIANA, ANTILEISHMANIA, ANTIVIRAL, ANTIESQUISTOSOMA E  
SIALAGOGA

LEIZ MARIA COSTA VERAS MIURA

APROVADO EM 14/10/ 2009

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza Batista

---

Prof. Dr. José Roberto de Souza Almeida Leite

---

Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo

---

Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

*DEDICATÓRIA*

---

*Dedico,*

*A Deus, pela vida e pelas  
oportunidades que me concedeu.*

*AGRADECIMENTOS*

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e meus pais pela minha vida. Ao meu marido pelo amor, dedicação e compreensão pelas minhas ausências. À minha irmã pelo incentivo que também somou-se aos membros das famílias Cabral Veras, Veras Quelemes, Freitas Veras, Costa Machado e Costa Ximenes.

À minha orientadora Dra. Maria do Carmo de Souza Batista pela experiência, sabedoria e firmeza em conduzir nossos trabalhos e por acreditar em um projeto ousado.

Ao meu co-orientador Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, pelo zelo e apreço por detalhes técnicos para o bom desempenho agregado a confiança depositada no desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu grande amigo Bruno Maranhão Diniz pela amizade incondicional, ajudando a conquistar mais uma etapa de vida. À minha amiga Caliandra Bona Nascimento pela amizade e cumplicidade construídas durante o curso de pós-graduação.

Agradeço aos meus amigos que fazem a Biblioteca Candido Athayde, a Direção, aos professores e colaboradores que compõe o *Campus* Ministro Reis Velloso (UFPI – Parnaíba) que sempre acreditaram no meu trabalho, a “professora-amiga” Dra. Carla Eiras pelo incentivo e conhecimento compartilhado.

Aos alunos de PIBIC, BITEC e PIBITI da Universidade Federal do Piauí, pelas ajudas na parte laboratorial, bem como à direção e colaboradores da Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda. por acreditarem no potencial da UFPI e tornar este trabalho um degrau a mais, para nosso conhecimento sobre a ciência.

Ao colega e amigo Biólogo Josué de Moraes pela pronta colaboração do Instituto Butantan (SP) e doação da cepa para o ensaio antihelmíntico que faz parte desta dissertação.

Aos professores Dra. Maria José dos Santos Soares, Dr. Luis Felipe Leomil Coelho, Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho pela gentil doação das cepas de bactérias, vírus e leishmanias que fazem parte desta pesquisa científica, bem como, quero agradecer à doutoranda Sabrina Maria Carneiro Portela pela ajuda e conhecimento transmitido na execução dos trabalhos.

Ao amigo Biólogo Saulo Martins de Sá Mandel pela pronta, e sempre, colaboração a ajudar “lapidar” este trabalho acadêmico-científico.

Aos colegas técnicos, pesquisadores, professores e alunos que fazem a família “Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – CMRV” em especial ao Etielle Barroso de Andrade pelo “carinho” com as estatísticas que compõem este trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Lima Costa, pelo desempenho ideal à frente da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

A todos os docentes que ministraram aulas e compartilharam seus conhecimentos e experiências durante o curso de Mestrado.

Aos servidores Luiz Gomes da Silva, Vicente de Sousa Paulo, Laelma Macedo e Silva, do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela contribuição na bem-feitoria desse trabalho de dissertação e a todos os meus amigos, muito obrigada.





## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
RESUMO .....	xix
ABSTRACT .....	xxi
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	27
2.1 Diversidade da flora brasileira.....	27
2.2 Jaborandi.....	28
2.3 Alcalóides oriundos do Jaborandi .....	29
2.4 Interesses na descoberta de novos antimicrobianos e antiparasitários .....	34
3. CAPÍTULO I .....	38
3.1 Abstract .....	40
3.2 Introdução .....	41
3.3 Material e Métodos .....	43
3.4 Resultados e Discussão.....	48
3.5 Referências .....	52
4. CAPÍTULO II .....	63
4.1 Resumo .....	64
4.2 Abstract .....	65
4.3 Introdução .....	66
4.4 Material e Métodos.....	69
4.5 Resultados e Discussão.....	71
4.6 Conclusões .....	76
4.7 Referências .....	77

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	83
6. REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE.....	101
ANEXOS .....	116

*LISTA DE FIGURAS*

---

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. Planta jovem de jaborandi ( <i>Pilocarpus microphyllus</i> ).....	28
FIGURA 2. Estrutura dos alcalóides encontradas no gênero <i>Pilocarpus</i> .....	31
FIGURA 3. Estrutura química da Pilocarpina. ....	32
FIGURA 4. Estrutura química da Epiisopiloturina.....	34

### CAPÍTULO I

FIGURE 1. (A) ESI+ MS spectra of epiisopiloturin showing the fragmentation from $[M+H]^+ = 287.04$ parent ion. (B) MS/MS the fragment ion $[M - H_2O + H]^+ = 269.04$ . (C) MS <sup>3</sup> the fragments ions are $[M - 2H_2O + H]^+ = 251.08$ , $[M - H_2O - CH_2O_2 + H]^+ = 223.08$ and $M/z = 95.04$ , this ion most probably corresponds to the positively charged (3-methylimidazole)methylene.....	57
--	----

FIGURE 2. Effect of epiisopiloturin on amastigotes of <i>Leishmania amazonensis</i> . (A) Untreated infected macrophages, added with epiisopiloturin at (B) 2 $\mu\text{g/mL}$ , (C) 16 $\mu\text{g/mL}$ , and (D) 128 $\mu\text{g/mL}$ . Results are expressed as Association Index (A.I.) = Percentage of infected macrophages x number of parasites per cell....	58
---	----

FIGURE 3. Effect of epiisopiloturin on macrophage peritoneal cells as measured by MTT assay. Each bar represents standard error of three independent experiments with similar results. The results analyzed by the Kruskal-Wallis test did not show differences between treatments ( $p>0.05$ ).....	59
--	----

FIGURE 4. Confocal fluorescence morphological analysis of <i>S. mansoni</i> after 120 hours. (A) Non-treated with epiisopiloturin (negative control). (C), (E), and (G), morphological structure on the <i>S. mansoni</i> induced by dose-dependent epiisopiloturin concentrations	
--	--

indicated on each inset. **(B)** Higher magnification of negative control. **(D)**, **(F)**, and **(H)** showed higher magnification on the 20.000  $\mu\text{m}^2$  of surface area..... 60

FIGURE 5. Absolute number of undamaged tubers on a surface area of 20,000  $\mu\text{m}^2$  (n=12) on adult *S. mansoni* as a function of epiisopiloturin concentration... ..... 61

## CAPITULO II

FIGURA 1. Efeito do alcalóide Epiisopiloturina sobre a replicação viral mostrando que nenhuma das concentrações testadas diminui o efeito citopático para nas células C6/36 (*Aedes albopictus*) Teste Kruskal-Wallis ANOVA.  $p > 0,05$ ..... 72

FIGURA 2. Efeito do alcalóide epiisopiloturina sobre células C6/36 (*Aedes albopictus*) mostrando que em concentrações acima de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresenta citotoxicidade para esta linhagem celular Teste Kruskal-Wallis ANOVA .  $p < 0,05$ ..... 73

FIGURA 3. Efeito do alcalóide Epiisopiloturina na atividade salivar em ratos machos Winstar com peso (150-180 g). Dados tratados pela ANOVA teste Tukey ( $p > 0.01$ ) mostrando que as médias não são diferentes estatisticamente (n=10)..... 75

*LISTA DE ABREVIATURAS*

---

## ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BOD	Biochemical oxygen demand
CaM	Calmodulina
CBME	Centro de Biologia Molecular Estrutural
CC	Controle de Células
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMNT	Concentração Máxima Não Tóxica
CMRV	<i>Campus</i> Ministro Reis Veloso
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DV	Dengue Vírus
FAA	Formalin-acetic-alcohol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IU	Internacional Unit
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry
mg	Miligramas
MTT	[3 - (4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-difeniltetrazolio bromide ]
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetros
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PBS	Phosphate Buffer Saline
PIB	Produto Interno Bruto
PLC	Fosfolipase C
RMN	Resonância Magnética Nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization





## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1. <i>In vitro</i> effects of Epiisopiloturin against 49-day-old adult <i>Schistosoma mansoni</i> . .....	62
--	----

### CAPÍTULO II

TABELA 1. Efeito do alcalóide epiisopiloturina sobre cepas de bactérias na maior concentração testada – 128 µg/mL, onde valores de absorbância são demonstrados em comparação com os valores de controle negativo, sem valores significativos. Teste Kruskal-Wallis ANOVA. $p > 0,05$ . .....	74
---	----



## RESUMO

As plantas do gênero *Pilocarpus*, conhecidas popularmente como jaborandi, possuem quatorze alcalóides em sua composição, dentre os quais a pilocarpina destaca-se como fitofármaco usado na medicina humana e veterinária com finalidades terapêuticas diversas, tais como: diminuição da pressão intraocular, combate a xerostomia e estímulo da musculatura lisa gastrointestinal para correção da impactação. Alguns dos alcalóides oriundos do jaborandi são estruturalmente semelhantes à pilocarpina, fornecendo bons precedentes para testes farmacológicos. O beneficiamento das folhas do jaborandi para a produção de pilocarpina em escala industrial é feito pela Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda, sediada em Parnaíba, PI. A partir do conhecimento da existência de epiisopiloturina como composto mais abundante nas folhas do jaborandi cultivado, depois da pilocarpina, e havendo disponibilidade de grande quantidade de resíduos dessas folhas, resultante do processo de extração da pilocarpina, realizou-se este estudo, objetivando: isolar o citado composto, bem como, avaliar suas atividades contra bactérias, vírus, protozoário e helminto. Assim, foi feito o isolamento da epiisopiloturina por cromatografia líquida de alta eficiência e comprovado que possui atividade estatisticamente significativa, *in vitro*, contra *Schistosoma mansoni* e forma amastigota de *Leishmania amazonensi*, e apresenta citotoxicidade para células C6/36 (*Aedes albopictus*). Não foram detectadas atividade antibacteriana, para as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, H-111 *S. epidermidis* e *S. epidermidis* ATCC 12228 e nem antiviral para o Dengue Vírus, além de não mostrar toxicidade para células peritoneais de mamíferos e não apresentar atividade sialagoga.

**Palavras-chave:** *Pilocarpus*. Alcalóide. Epiisopiloturina. Análise cromatográfica. Antileishmania. Antiesquistosoma.

*ABSTRACT*

---

## ABSTRACT

The *Pilocarpus* genus, popularly known as jaborandi, has fourteen alkaloids in its composition. Among which pilocarpine stands out as an important phytotherapeutic compound used in human and veterinary medicine, with therapeutic functions as diverse as: reduction of intraocular pressure, combat dry mouth and stimulation of smooth muscle for correction of gastrointestinal impaction. Other alkaloids are structurally very similar to pilocarpine, provide good precedents for pharmacological tests. The processing of jaborandi leaves for the production of pilocarpine on an industrial scale is done by the Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda, headquartered in Parnaíba, PI. Epiisopiloturina is the second most concentrated alkaloid present in the leaves of Jaborandi besides pilocarpine. The availability of large amounts of residues after leave processing and extraction of pilocarpine made this study possible: isolation of this compound as well as the evaluation their activities against bacteria, viruses, protozoa and helminthes. The purification of epiisopiloturina was performed by high performance liquid chromatography. Activity tests showed statistically significant *in vitro* activity against *Schistosoma mansoni*, amastigotes of *Leishmania amazonensis*, and cytotoxicity for C6/36 cells (*Aedes albopictus*). Antibacterial action was not detected against the strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, *Staphylococcus epidermidis* H-111 and *S. epidermidis* ATCC 12228. Finally, no antiviral activity against Dengue Virus, sialogogue activity, neither citotoxicity against peritoneal cells of mammals were detected.

**Key-words:** *Pilocarpus*. Alkaloids. Epiisopiloturine, Chromatographic analysis, Anti-leishmania. Anti-worms.



## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira é uma das maiores do planeta, principalmente em relação à sua flora, podendo ser considerada como uma inesgotável fonte de fármacos. Não só na região amazônica, onde a extensão geográfica já propicia uma idéia do seu poder de diversidade, mas também em outras regiões brasileiras, como a Nordeste, onde existem inúmeros vegetais de interesse medicinal (ABIFISA, 2006).

A expressão “planta medicinal” é utilizada para designar toda planta que administrada ao homem ou aos animais, por qualquer via ou forma, seja capaz de exercer alguma ação terapêutica (OMS, 2002). As plantas medicinais são importantes, tanto por serem utilizadas diretamente como agentes terapêuticos, como também, por possibilitarem a fabricação de fitoterápicos (ZHAN e ZHOU, 2003), fármacos que, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são tecnicamente obtidos e elaborados exclusivamente a partir de matérias primas vegetais, com finalidades profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, em benefício do usuário (BRASIL, 1995).

Como exemplo de planta medicinal de larga ocorrência no território brasileiro ressalta-se o jaborandi (*Pilocarpus* sp), o qual se distribui do extremo norte da região Amazônica até o sul do Rio Grande do Sul (JOSEPH, 1967) e conta com inúmeras espécies de importância econômica e médica, dentre as quais encontram-se *Pilocarpus jaborandi* (Holmes), *P. trachyllophus* (Holmes) e *P. microphyllus* (Stapf, ex Holmes), sendo esta última considerada como o "jaborandi legítimo" (CORRÊA, 1969) e com vasta ocorrência na região meio-norte (estados do Maranhão e Piauí), a partir da qual são extraídos os sais de pilocarpina (PINHEIRO, 1997).

Durante o processo de beneficiamento do jaborandi para a retirada da pilocarpina é gerada uma biomassa contendo outros alcalóides que podem exercer atividade biológica, porém, ainda carecem de estudos mais aprofundados (SANTOS e MORENO, 2004).

Considerado ser missão das Instituições de Ensino e Pesquisa realizarem estudos para atendimento às demandas da sociedade, foi firmada uma parceria entre a UFPI e a empresa VEGEFLORE Extrações do Nordeste Ltda., objetivando a ampliação do conhecimento sobre compostos químicos oriundos da biomassa resultante do processamento



do jaborandi, pois muitas toneladas de seus resíduos são geradas, sem que se tenha conhecimento sobre a sua utilidade.

A existência do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia no *Campus* Ministro Reis Veloso, em Parnaíba e de uma linha de pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPI, vinculada à área de concentração Sanidade e Reprodução Animal, denominada “Estudo farmacológico e toxicológico de plantas como alternativa de tratamento de doenças de animais”, no *Campus* Ministro Petrônio Portela, em Teresina, propiciou a efetivação dessa parceria.

Assim, com base no conhecimento prévio de que, depois da pilocarpina, o alcalóide de maior concentração na biomassa do jaborandi, cultivado aqui na região meio-norte, é a epiisopiloturina, realizou-se este estudo com os seguintes **objetivos**:

- **Geral** – Isolar o alcalóide epiisopiloturina a partir da citada biomassa proveniente das folhas de *P. microphyllus* (Stapf) e estudar suas atividades contra espécies de bactérias, vírus, protozoário e helminto.

- **Específicos**

- Avaliar sua atividade *in vitro* contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* H-111, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* MED-71;

- Determinar a capacidade deste alcalóide em inibir, *in vitro*, a replicação do Dengue Vírus 3;

- Observar se o citado alcalóide possui atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*, cepa IFLA/BR/67/PH-8, nas formas amastigotas e promastigotas;

- Testar a sua atividade antihelmíntica *in vitro* frente ao *Schistosoma mansoni* cepa (BH strain Belo Horizonte, Brazil);

- Averiguar sua ação sialagoga, *in vivo*, utilizando modelo murino.

A estrutura deste trabalho foi organizada em partes: Introdução; Revisão de Literatura; dois Capítulos, Considerações Finais, Referências Gerais e Anexos.

Os capítulos foram organizados na forma de artigos científicos, sendo o primeiro intitulado: “Extraction and purification of the epiisopiloturine alkaloid and activity against

*Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis*”, elaborado de acordo com as normas do periódico “Acta Tropica” (Qualis A-1/CAPES) e o segundo, com o título de “Atividades antimicrobiana e sialogoga do alcalóide epiisopiloturina e avaliação de sua citotoxicidade em células C6/36 (*Aedes albopictus*)” está formatado segundo as normas da ABNT, para que se possa submetê-lo, brevemente, a periódico indexado no Qualis “A-1” da CAPES.

No Apêndice encontra-se um trabalho de revisão, já submetido ao periódico “Diversa”, intitulado: “JABORANDI (*Pilocarpus* sp.): UM ARSENAL DE ALCALÓIDES FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS”.

Parte dos resultados desta dissertação está depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual – INPI sob protocolo 000102, visando à geração de uma patente.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Diversidade da flora brasileira**

O uso das plantas medicinais remonta ao início dos tempos, sendo que na antiguidade existia apenas o conhecimento empírico, enquanto que, na atualidade, muitas pesquisas científicas comprovam as propriedades medicinais de vários vegetais (OLIVEIRA et al., 2006). As informações sobre o uso de plantas medicinais e seu emprego terapêutico foram sendo acumuladas durante séculos e muitos desses conhecimentos já se encontram cientificamente disponíveis (CASTRO, 2004).

O Brasil é detentor de uma mega biodiversidade, com uma flora composta por mais de 55 mil espécies, porém a falta de diretrizes técnicas e conscientização ecológica em sua exploração acarreta sérios problemas ambientais (DÔRES, 2007).

Pelo menos trezentos tipos diferentes de plantas fazem parte do arsenal terapêutico popular e, alguns deles, já são objetos de linhas de pesquisa em universidades e institutos de pesquisa. A Organização das Nações Unidas (ONU) já reconheceu que, pelo menos, dois terços da população da terra utiliza plantas com finalidades medicinais (BARATA, 2004), com o intuito de acalmar a tosse, reduzir a febre, dor e inflamação, combater infecções e parasitos, estimular a expectoração, engordar, emagrecer e muitas outras finalidades (AGRA et al., 2008).

A despeito da velocidade do crescimento da indústria farmacêutica e do avanço das descobertas, a pesquisa acerca de novos fitoterápicos ainda precisa ser acelerada, pois inúmeras doenças continuam carecendo de novas estratégias terapêuticas que sejam mais efetivas e menos tóxicas (NAKAMURA et al., 2006).

Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 1995). Vários deles vêm sendo adotados em protocolos anti-infecciosos considerando-se serem as doenças infecciosas (bacterianas, virais e fúngicas) e parasitárias (incluindo-se protozooses e helmintoses), responsáveis por graves problemas de saúde, tanto na área humana, quanto veterinária.

## 2.2. Jaborandi

Dentre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse mundial destacam-se as plantas conhecidas pela denominação jaborandi, que incluem várias espécies nativas e cultivadas no Brasil, sobretudo a *Pilocarpus microphyllus* (Figura 1), que é utilizada como matéria prima para isolamento de farmoquímicos (SANTOS e MORENO, 2004).



**Figura 1-** Jaborandi jovem (*Pilocarpus microphyllus*). Foto: David Fernandes Lima.

O “jaborandi” tem uma ampla distribuição pela América, partindo do sul da América Central indo até o sul da América do Sul. Já foram descritas 16 espécies desse gênero, das quais 13 são encontrados no Brasil, sendo 11 exclusivos do território brasileiro: *P. alatus* C. J. Joseph ex Skorupa, *P. carajaensis* Skorupa, *P. giganteus* Engler, *P. grandiflorus* Engler, *P. jaborandi* Holmes, *P. pauciflorus* St. Hilaire, *P. pennatifolius* Lemmaire, *P. riedelianus* Engler, *P. spicatus* St. Hilaire, *P. sulcatus* Skorupa, *P. trachyllophus* Holmes, *P. microphyllus* Stapf ex Wardleworth e *P. peruvianus* (Macbride) Kaastra. Deste gênero já foram identificados quatorze tipos de alcalóides, vinte e sete cumarinas, cinco flavonóides e setenta e seis terpenóides. (SKORUPA, 2000; SANTOS E MORENO, 2004).

As plantas conhecidas como jaborandi (gênero *Pilocarpus*) pertencem à família Rutaceae e possuem como características o fato de: serem arbustivas e bastante ramificadas, apresentarem altura média de dois metros, com folhas compostas medindo cerca de 40 cm

quando adultas e folíolos coriáceos, de forma lanceolada, variando com a espécie (HENRIQUES et al., 2000; PAIVA, 2008).

As flores do jaborandi (*P. microphyllus*) são pequenas e arrançadas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso. No Brasil, ocorre principalmente no leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste, com vasta distribuição nativa no Piauí e Maranhão (MARQUES e COSTA, 1994).

Em 1570, Gabriel Soares de Souza, um observador europeu notou que os índios Guaranis usavam plantas do gênero *Pilocarpus* para tratar úlceras de boca e também como um antídoto para vários venenos ou toxinas, devido à sua propriedade de promover sudorese, micção e salivação. A sua utilização terapêutica é conhecida, há séculos, pela tribo indígena Tupi, ao norte do Brasil (VITAL e ACCO, 2006). Em 1888 um médico britânico relatou o caso de uma mulher de 65 anos de idade com queixa de boca seca, a qual foi tratada com tintura de jaborandi por via oral, tendo havido melhora do quadro clínico (VIVINO et al., 1999).

Conhecida por seu intensivo uso na indústria farmacêutica, o jaborandi tem destaque no controle do glaucoma, devido à capacidade da pilocarpina, alcalóide encontrado em suas folhas, produzir aumento na contração da musculatura lisa e relaxamento de esfíncteres de todo organismo animal (VITAL e ACCO, 2006).

A extração do jaborandi é responsável por uma grande massa de recursos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em 2006, movimentou cerca de 220 toneladas no norte e nordeste brasileiro perfazendo aproximadamente R\$ 562.000,00 de um total de R\$ 3,7 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil naquele ano (IBGE, 2006).

O jaborandi é um bom exemplo de uma planta que fez a transição do uso indígena para ciência moderna (PAIVA, 2008).

### **2.3. Alcalóides oriundos do jaborandi**

Alcalóides são substâncias de caráter básico, derivadas principalmente de plantas, mas que também podem ser encontradas em fungos, bactérias e até mesmo em animais, as quais contêm, em sua fórmula, basicamente: nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono, e que podem influenciar o metabolismo destes organismos produtores. Possuem importância política, econômica e social, além da biológica (HENRIQUES et al., 2000).

A palavra alcalóide deriva do árabe *al-quali* que corresponde ao nome vulgar do vegetal onde a soda foi inicialmente extraída (de *álcali*, básico, com o sufixo *-oide*, "-semelhante a"). Este grupo de compostos apresenta difícil definição, devido à grande diversidade de estruturas químicas, propriedades físico-químicas e ações farmacológicas (ROBBERS et al., 1997; HENRIQUES et al., 2000). Podem existir no estado livre nas plantas, bem como, na forma de sais ou óxidos. Eles também correspondem aos principais agentes terapêuticos naturais com ação: anestésica, analgésica, psico-estimulantes e neurodepressores, entre outras atividades farmacológicas (HENRIQUES et al., 2000).

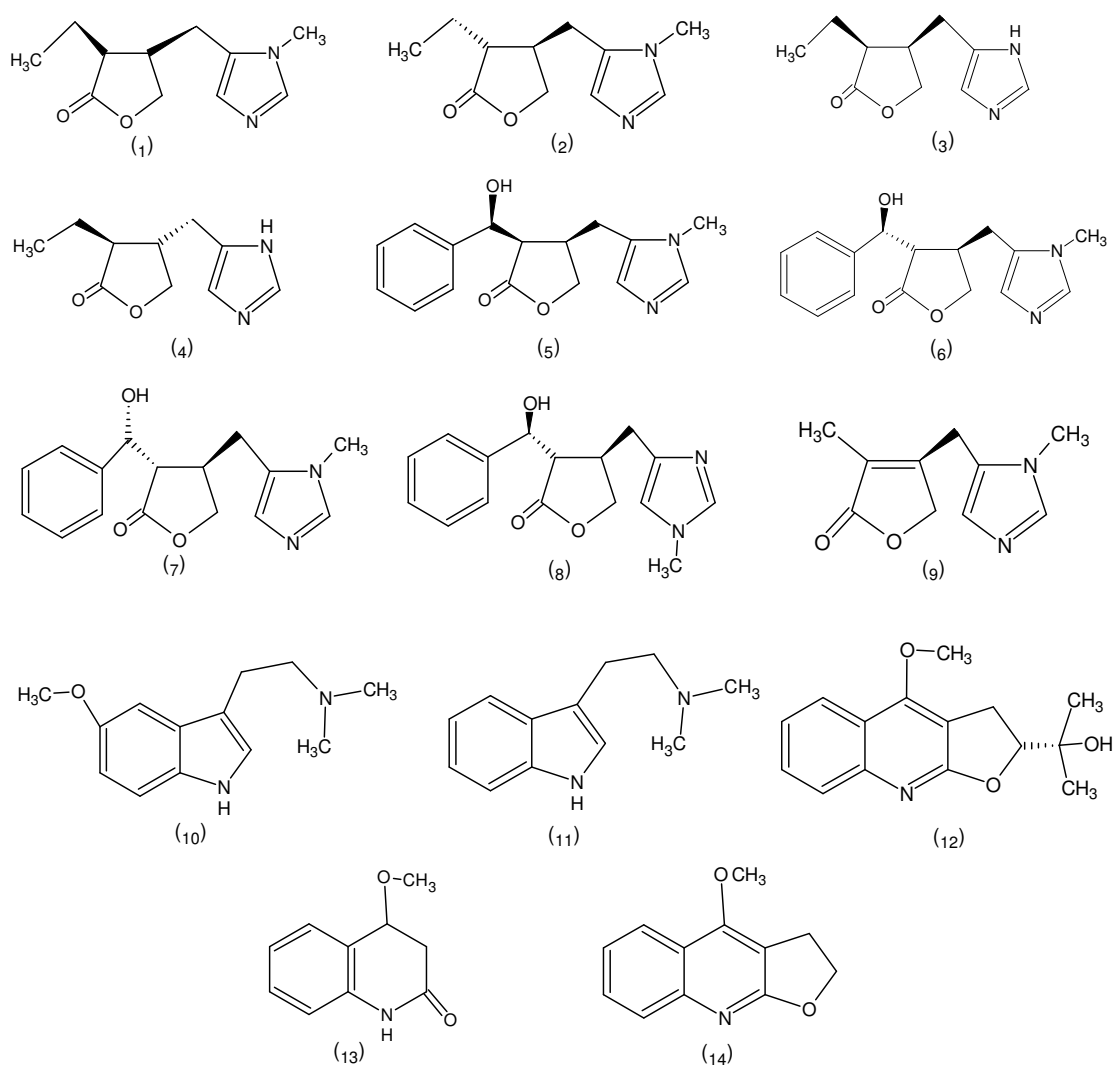
Existe um consenso entre diversos autores e pesquisadores da área de química, de que alcalóides verdadeiros são compostos que possuem um ou mais nitrogênio(s) pertencente(s) a um anel heterocíclico com propriedades básicas, apresentando intensa atividade biológica quando interagem com organismos vivos (COSTA, 1994; ROBBERS et al., 1997; HENRIQUES et al., 2000; LIMA, 2008).

Esta definição exclui os demais compostos nitrogenados como os obtidos por síntese orgânica, aminoácidos, aminas simples, vitaminas, peptídeos, ácidos nucleicos, porfirinas, nucleotídeos e compostos nitro e nitroso (ROBBERS et al., 1997).

A partir de espécies de jaborandi (*Pilocarpus* sp) já foram identificadas as estruturas dos seguintes alcalóides: pilocarpina (1), isopilocarpina (2), pilocarpidina (3), isopilocarpidina (4), pilosina (5), isopilosina (6), epiisopilosina (7), epiisopiloturina (8), 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina (9), *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina (10), *N,N*-dimetil-triptamina (11), plastidesmina (12), (1*H*)-4-metoxi-2-quinolone (13) e dictamina (14) (Figura 2). Alguns deles já tiveram as suas estruturas determinadas por RMN (Ressonância Magnética Nuclear), porém ainda não possuem atividade farmacológica descrita, podendo ser promissores como o objetivo da pesquisa, para a medicina humana e veterinária (ANDRADE-NETO et al., 1994; SANTOS e MORENO, 2004).

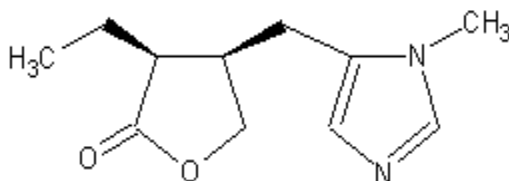
Vários azóis, semelhantes aos identificados no jaborandi, são antimicóticos clássicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras. Apresentam um anel imidazólico livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. Atualmente dispõe-se de vários derivados imidazólicos para uso sistêmico ou tópico no tratamento de diversas infecções micóticas, sendo a ação fungistática ou fungicida, dependente da concentração (SANDE e MANDELL, 1987).

O principal mecanismo de ação dos azóis é a inibição da síntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos microorganismos, sobretudo os fungos. Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a enzima lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, causando alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em morte celular (RICHARDSON e WARNOCK, 1993; ALVES et al., 1999; FARIAS et al., 2008).



**Figura 2** - Estrutura dos alcalóides encontrados no gênero *Pilocarpus*: (1) pilocarpina, (2) isopilocarpina, (3) pilocarpidina, (4) isopilocarpidina, (5) pilosina, (6) isopilosina, (7) episopilosina, (8) episopiloturina, (9) 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina (10) *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina, (11) *N,N*-dimetil-triptamina, (12) plastidesmina, (13) (1*H*)-4-metoxi-2-quinolone e (14) dictamina (SANTOS e MORENO, 2004).

A pilocarpina (Figura 3) é considerada como protótipo dentre os compostos oriundos do jaborandi, sendo o agente mais concentrado nas folhas da planta. Trata-se de um alcalóide colinérgico com estrutura de uma amina terciária, que apresenta ações nicotínicas e muscarínicas, com predominância das últimas. Possui efeitos discretos sobre o coração e o trato gastrointestinal (VITAL e ACOO, 2006).



**Figura 3-** Estrutura química da Pilocarpina.

Seu mecanismo de ação está relacionado à ligação reversível do fármaco aos receptores muscarínicos subtipo 3 (M3). Sua ação hipotensora ocular decorre do fato desse alcalóide colinomimético de ocorrência natural produzir contração do músculo liso do esfíncter da íris (resultando em miose) e do músculo ciliar (resultando em acomodação). Esta ação facilita o processo de drenagem do humor aquoso para o canal de *Schlemm*, que drena a câmara anterior, uma vez que a contração do esfíncter da íris a afasta do ângulo da câmara anterior e a retração do músculo ciliar ocasiona abertura das lâminas da rede trabecular (COSTA e NASCIMENTO NETO, 2006; PAPPANO, 2006).

O somatório dessas ações resulta na ampliação do ângulo de drenagem do humor aquoso, fluido que preenche as câmaras oculares (anterior e posterior), o que é importante para a terapêutica do glaucoma, doença caracterizada pelo aumento da pressão intra-ocular, que provoca lesão no nervo óptico, produzindo cegueira, se não for adequadamente tratada (PETERSEN-JONES, 2001; LARSSON et al., 2008).

Dentre os animais domésticos, os cães, gatos e equinos são os que mais utilizam hipotensores, sendo que no cão há mais casos de glaucoma de ângulo fechado, em felinos e equinos é mais comum haver glaucoma secundário a outras enfermidades, como: a uveíte, traumas, luxações lenticulares e neoplasias (LARSSON et al., 2008).



O glaucoma é visto com maior frequência em humanos, seguidos de cães. Em aves, é raro de ser encontrado e, em répteis, ainda não foi relatado. Já em animais exóticos como coelhos-brancos da Nova Zelândia e hamsters russos, é verificado com certa frequência (MONTIANI-FERREIRA, 2007).

Preparados oftálmicos contendo pilocarpina a 1% e a 2% constituem-se nos recursos terapêuticos mais efetivos na terapia do glaucoma (LARSSON et al., 2008). Ao contrário de outras substâncias que visam o controle do glaucoma, a pilocarpina topicamente não apresenta efeitos colaterais significativos (TAYLOR e AL-HASHIMI, 1996; SABÁ et al., 2002).

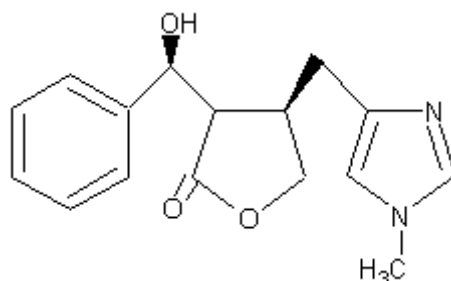
Por ser uma substância estimuladora de receptores colinérgicos, a pilocarpina apresenta outras ações: estimulantes de glândulas secretoras, relaxamento de esfíncteres, estimulante da peristalse, dentre outras. Quando os receptores muscarínicos são ativados ocorrem vários eventos celulares, podendo um ou mais deles atuar como segundos mensageiros para a ativação muscarínica. Como esses receptores se acoplam à proteína G, a ligação de agonistas muscarínicos ativa a cascata do inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), o que provoca abertura dos canais de cálcio nos músculos lisos (PAPPANO, 2006).

Por estimulação das glândulas salivares, a pilocarpina induz ao aumento da saliva do tipo serosa. O efeito tem início nos primeiros sessenta minutos a partir da ingestão do medicamento, perdurando por até três horas (BAPTISTA NETO, 2003). Estimula também outras glândulas secretoras, como as sudoríparas termorreguladoras, lacrimais e nasofaríngeas, motivo pelo qual está sendo também indicada em pacientes com câncer de boca e pescoço, para o tratamento de xerostomia (HAMLAR et al., 1996; WYNN, 1996; PAPPANO, 2006).

Em medicina veterinária, a pilocarpina é também utilizada no tratamento de disfunções gastrointestinais de ruminantes e meteorismo dos eqüinos, objetivando a estimulação da musculatura lisa do trato gastroentérico, a fim de produzir catarse (LARSSON et al., 2008).

A estrutura química da epiisopiloturina (Figura 4) difere da pilocarpina pela presença de um grupamento hidrobenzílico ao invés de um etílico, e assemelha-se a ela por sua estrutura formada pela presença de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico através de uma ligação C-C. A similaridade entre as estruturas destes dois

compostos torna a epiisopiloturina um alcalóide promissor quanto as suas propriedades biologicamente ativas.



**Figura 4-** Estrutura química da Epiisopiloturina.

#### 2.4. Interesses na descoberta de antimicrobianos e antiparasitários

Antimicrobianos são compostos de ocorrência natural ou sintetizados em laboratório que, em concentrações adequadas, inibem de maneira reversível ou irreversível a proliferação microbiana. Os antimicrobianos de uso clínico determinam uma “toxicidade seletiva”, que é a capacidade de ser tóxico para o agente causador da infecção e o mais inócuo possível para organismo afetado (BOXALL et al., 2004).

Vários antimicrobianos estão disponíveis para uso clínico, nos dias atuais. Porém, muitos deles têm preço elevado e, se não utilizados em esquemas posológicos apropriados, podem induzir ao aparecimento de resistência (RODRIGUES, 2008).

Assim, no meio científico, existe uma freqüente procura por compostos efetivos no combate a microorganismos, sejam bactérias, fungos, vírus, ou outras categorias, pois o desenvolvimento de compostos antimicrobianos representa um dos mais importantes avanços na área de farmacologia clínica, tanto para o controle ou cura de infecções graves, quanto para a prevenção e terapia combinada de outras doenças, como a quimioterapia do câncer (LAMPİRIS e MADDIX, 2006).

Dentre as espécies de bactérias causadoras de infecção no homem e nos animais ressaltam-se a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus* sp., sendo que esta última é um coco gram-positivo e possui como espécies principais o *Staphylococcus aureus*, agente

responsável por processos supurativos superficiais ou profundos e que é também responsável pela produção de vários tipos de toxinas e o *Staphylococcus epidermidis*, considerado como um agente convencionalmente saprófita, mas que pode proliferar de forma patogênica, sob condições adequadas (NAHID e SUGII, 2006).

A *E. coli* é considerada uma enterobactéria, enquadrada na categoria das gram-negativas, responsável pela maioria dos casos de gastroenterites em humanos, sobretudo em crianças e em animais recém-nascidos, embora possa apresentar também localização extra-intestinal e causar infecções urinárias, colecistite, peritonite e septicemia, além de produzir exotoxinas (CAMPANHÃ et al., 1999; CEZÁRIO et al., 2004).

Presentes na terra por milhares de anos, os parasitas (para= ao lado; sitos= hospedeiro) se classificam, conforme a sua atuação seja no interior ou no exterior do organismo, em dois grandes grupos: os endo e ectoparasitos. Dentre os endoparasitas, ressaltam-se os helmintos e os protozoários, como agentes causadores de doenças graves no homem e nos animais (ALMEIDA e AYRES, 2006).

Os helmintos são conhecidos como “vermes cilíndricos” e se subdividem em: nematódeos, parasitas de corpo cilíndrico-alongado; cestódeos, que são vermes de corpo achatado e segmentado, chamados de tênias; e os trematódeos, aqueles de corpo achatado e não segmentado (ROSENTAL e GOLDSMITH, 2006).

A esquistossomose é uma trematodiose produzida por espécies de *Schistosoma*, como o *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* que acomete, somente nas Américas, mais de 200 milhões de pessoas e põe em risco o triplo desse número. Nessa enfermidade, caramujos de água doce, quando infectados, agem como hospedeiros intermediários na transmissão da infecção, que continua a se disseminar à medida em que aumenta o desenvolvimento dos recursos hídricos e agrícolas. Caracteriza-se por distúrbios hepáticos, esplênicos, gastro-intestinais e gênito-urinários, podendo o agente etiológico estar associado ao carcinoma de células escamosas da bexiga (LOUKAS e HOTEZ, 2006).

Poucos fármacos são eficazes no tratamento da esquistossomose, sendo que apenas dois grupos de fármacos têm sido considerados efetivos, o praziquantel e a oxamniquina, sendo o primeiro considerado, atualmente, o agente de eleição (ROSENTAL e GOLDSMITH, 2006), embora possua custo relativamente alto.

Os protozoários podem ser transmitidos por insetos, vetores, adquiridos de outros mamíferos (reservatórios) ou transmitidos de um ser humano a outro ou de um animal a outro, ou, ainda, entre ser humano e animal e vice-versa (PHILIPS e STANLEY JR, 2006).

Dentre os protozoários de grande importância médica, cita-se a *Leishmania*, que é agente da leishmaniose, zoonose endêmica em 88 países, que acomete mais de 14 milhões de pessoas em todo o mundo, com cerca de dois milhões de novos casos por ano (WHO, 2007). Os fármacos até agora disponíveis para a terapêutica da leishmaniose, além de apresentarem limitação relacionada à eficácia, são portadores de efeitos colaterais significativos (FNS, 2003), o que justifica a procura de agentes que possam exercer atividade inibitória sobre parasitos desse gênero.

No que se referem a compostos antivirais, os protocolos terapêuticos ainda são bastante restritos, se comparados aos disponíveis para os outros agentes infecciosos.

Na atualidade, tem sido observado que muitas plantas possuem compostos com potencial para a produção de pesticidas (CICCIA et al. 2000). Elas têm sido consideradas alternativas de alto interesse para o combate aos mosquitos, que são os principais transmissores de muitas doenças tropicais (AUTRAN et al., 2009).

Diversos problemas são relatados por Ansari et. al. (2000) em relação à toxicidade de muitos inseticidas manufaturados, juntamente com o aumento da resistência de insetos a esses agentes. Por isso, a identificação de novos compostos ativos e eficazes contra mosquitos e larvas que possam substituir inseticidas sintéticos, dispendiosos e de grande potencial tóxico, como organoclorados, organofosforados e piretróides, reveste-se de importância clínica e econômica (SHAALAN et al., 2005).

O mosquito *Aedes aegypti* é o alvo principal das pesquisas relacionadas à descoberta de inseticidas, pois ele é o vetor de doenças graves como a dengue hemorrágica e febre amarela (OLIVEIRA et al., 2006, AUTRAN et al., 2009). Extrato de quatorze plantas do cerrado brasileiro apresentaram atividade larvicida de *A. aegypti*. Naftoquinonas naturais e sintéticas também têm atividade larvicida para esta espécie de inseto (RODRIGUES, et al., 2006).

O esforço para encontrar substâncias que tenham atividade contra larvas de mosquito do gênero *Aedes* já tem produzido resultados promissores, como o óleo essencial de *Lippia gracilis* (*Verbenaceae*) HBK, que possui o carvacrol como componente majoritário, o qual

vem demonstrando ação larvicida (SILVA et al., 2007). No entanto, há ainda um vasto caminho a ser percorrido na busca de larvicidas que possam vir a ser utilizados, em larga escala, com essa finalidade.

Considerando-se: a) os relatos da existência do alcalóide epiisopiloturina nas folhas do jaborandi e a existência de um vasto material oriundo do processamento de suas folhas para a extração da pilocarpina; b) a similaridade estrutural entre pilocarpina e epiisopiloturina; c) o fato da pilocarpina ser um agente imidazólico, grupo a que pertencem muitos antifúngicos, antibacterianos e ectoparasitos; d) a pilocarpina possuir atividade sialogoga, há justificas suficientes para a realização das pesquisas componentes desta Dissertação.



**Evaluation of the activity of Epiisopiloturin Alkaloid against *Schistosoma mansonii* and *Leishmania amazonensis***

Leiz Maria Costa Veras Miura<sup>1,2</sup>, Maria do Carmo de Souza Batista<sup>2</sup>, José Roberto de Souza Almeida Leite<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, *Campus* Ministro Reis Velloso, CMRV, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, Piauí, PI, Brasil;

<sup>2</sup>Programa de Mestrado em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, CCA, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, PI, Brasil;

**Abstract**

Neglected tropical diseases such as schistosomiasis and leishmaniasis continue to cause significant morbidity and mortality in the developing countries, reinforcing the demand for the development of novel drugs. Here we report the schistosomicidal and leishmanicidal activities of epiisopiloturin, an imidazolic alkaloid extracted from the leaves of *Pilocarpus microphyllus*, known as jaborandi. This compound was isolated by high performance liquid chromatography (HPLC) and had its chemical structure confirmed by ion-trap mass spectrometry. It had significant *in vitro* activity against adult *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis* amastigotes and no detectable cytotoxicity to peritoneal macrophage cells. It is the first time that epiisopiloturin is reported as a promising schistosomicidal and leishmanicidal agent.

**Key words:** Epiisopiloturin; Alkaloid; *Leishmania amazonensis*; *Schistosoma mansoni*.



## 1. Introduction

*Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae family) is originally from the Amazon and Cerrado regions of Brazil where it is known as *jaborandi*. This plant is a rich source of imidazole alkaloids such as pilocarpine, isopilocarpine (the C[3]-epimer of pilocarpine), pilosinine (2*R*,3*R*,6*S*), isopilosine (2*S*,3*R*,6*R*), epiisopilosine (2*S*,3*R*,6*S*) and epiisopiloturin. Pilocarpine is the best known of the *jaborandi* alkaloids and the only one with commercial value, used both as a miotic and diaphoretic agent due to its action as a peripheral stimulant of the parasympathetic system (Davies et al., 2009; Abreu et al., 2005; Sawaya et al., 2008). However, from this set of structurally related molecules, only pilocarpine has a defined biological activity (Voigtlander et al., 1978; Davies et al., 2009). Imidazole alkaloids display a wide range of pharmacological activities (Barradas et al., 2008). They have been used as antiparasitic, antibacterial, antimicrobial, antitumoral, antioxidant and antifungal agents (Khabnadideh et al., 2003, Walczak et al., 2004; Mallia et al., 2006; Hadj-Esfandiari et al., 2007; Olender et al., 2009). This indicates that the alkaloid extract of *jaborandi* leaves harbor a still unexplored set of molecules with potential application in human health, such as putative antimicrobial compounds that can be further developed in alternative treatments for infectious diseases. There is an increasing demand for novel drugs in developing countries, especially for the treatment of neglected diseases, known to affect more than 11 million people, most of them in Africa (Camargo, 2008).

Leishmaniasis is a neglected tropical parasitic disease characterized by the infection of macrophages by obligate intracellular parasites of the genus *Leishmania*. It has been considered a major health problem worldwide, especially in

developing nations (Rocha et al., 2005; WHO, 2008). This disease currently threatens about 350 million women, men and children in 88 countries around the world, with about 2 million affected annually. In Brazil, studies report the occurrence of about 20.000 new cases of the illness annually (Carvalho and Ferreira, 2001).

The inexistence of a vaccine places an urgent demand for more effective drugs to replace/supplement those in current use. Most of the clinically used drugs for the treatment of leishmaniasis are based on pentavalent antimony compounds and were developed before 1959. Generally, these drugs have one or more limitations, like unaffordable cost, difficulty in administration, toxicity or more importantly the development of resistant parasites. Alternative drugs, such as amphotericin B and pentamidine, also have unpleasant side effects (Carvalho et al., 2000).

Schistosomiasis also represents a serious health problem in tropical countries. It is estimated that 200 million people are infected by schistosome worms and that more than 600 million people are at risk (Araújo et al., 2007). Two alkaloids were developed in the 1970s for treatment of *S. mansoni* infestations: oxamniquine and praziquantel. Oxamniquine, a synthetic tetrahydroquinoline [1,2,3,4-tetrahydro-2-[[1-methylethyl- amino]methyl]-7-nitro-6-quinolinomethanol] is highly effective against *S. mansoni* and was used in the large-scale treatment of schistosomiasis in Brazil (Katz, 2008; Penido et al., 2008).

The development of resistance to these alkaloids and toxicity to the host have been reported (Melo et al., 2003). In addition, the existence of resistant strains reinforces the need to develop new safe and effective schistosomicidal drugs (Ribeiro-dos-Santos et al., 2006). Plant extracts or plant-derived compounds are

likely to provide a valuable source of novel medicinal agents (Kayser and Kiderlen, 2001).

The present work describes the potential application of the alkaloid epiisopiloturine, extracted from jaborandi leaves, as a leishmanicidal and schistomicidal agent. It had significant *in vitro* activity against adult *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis* amastigotes and no detectable cytotoxicity to peritoneal macrophage cells.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Extraction and purification of alkaloid Epiisopiloturine**

The alkaloid epiisopiloturine was purified from the biomass generated by the production of pilocarpine held by VEGEFLOA Extrações do Nordeste Ltda. The biomass was subjected to an extraction process for alkaloids based on acidification and filtration of industrial waste followed by the alkalization and filtering of the solution to obtain concentrated epiisopiloturine (Costa, 1999). Solutions were filtered with 0.45 µm pore membranes and injected into a high performance liquid chromatographer, HPLC (Shimadzu Prominence, AUTOSAMPLER SIL-10AF, CTO-20A, LC-6AD, CBM-20A, SPD-20A). The column used was Merck LiChrospher 60 RP Select B (5 µm) and mobile phase consisted of 5% (v/v) potassium phosphate at pH 2.5 at a flow rate of 1 mL/min at 50 °C. HPLC detector was set to 216 nm.

Mass spectrometry was used to evaluate the purity and monoisotopic molecular mass of epiisopiloturine (HCT Ultra PTM ETD II from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). Mass spectra were acquired in a mass range of m/z 70 to 300 Da. MS<sup>2</sup> was carried out in manual mode with fragmentation of the precursor ion by CID using He as the collision gas. Precursor ions were selected within an isolation

width of 2 u and scans were accumulated with variable RF signal amplitudes. The m/z scale of the mass spectrum was calibrated using the external calibration standard G2421A electrospray “tuning mix” from Agilent Technologies (Santa Rosa, CA, USA).

## **2.2. Anti-leishmania assay**

### **2.2.1. Leishmania promastigotes**

The IFLA/BR/67/PH-8 strain of *Leishmania amazonensis*, originally isolated from a human case of diffuse cutaneous leishmaniasis, was used in the present study. This strain has been maintained in Warren’s medium (brain–heart infusion plus haemin and folic acid) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen Corporation, New York, U.S.A) at 28°C in a tissue flask, as previously described by Lima et al., 2000.

*Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67/PH-8 was cultivated in 96 well microplates in the presence of serial dilutions (ranging from 2 to 128 µg/mL) of the epiisopiloturin alkaloid diluted in Shineider medium (Sigma MRC) enriched with 2% dimethyl sulfoxide (DMSO). As negative and positive controls, respectively, were used DMSO at 2% and amphotericin B at 3% in culture medium. The concentration of promastigotes placed on each well was  $10^6$  cells. Microplates were incubated in the Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) at 26°C and cell counts were performed after 24 and 48 hours in hemocytometer (Neubauer, improved double, Superior Ltd, Germany).

### **2.2.2. Peritoneal macrophages**

Macrophages were removed from the peritoneum of Swiss female mice, after the inoculation of 10 mL sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) followed by abdominal massage. Macrophages were collected and washed three times with sterile PBS, centrifuged at 1000 rpm for ten minutes and then resuspended in culture medium (RPMI 1640 from Sigma). Subsequently,  $5 \times 10^5$  cells were seeded to adhere to a 24 wells culture plate and left overnight at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, followed by the addition of 500 µL of RPMI 1640 on each well. Roughly  $5 \times 10^6$  promastigotes were added to each well, resulting in 1:10 macrophages/leishmania and incubated for 4 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Wells were then washed with PBS to remove the free parasites. Epiisopiloturin in RPMI medium was added to wells containing infected macrophages at 128, 16 and 2 µg/mL in triplicate and incubated for 48 hours. After incubation, the samples were aspirated, washed in PBS and the cover slip were stained by panotic method (Laborclin). After the treatment with epiisopiloturin, the number of infected macrophages and the number of parasites per macrophage were calculated, using a sample size of 100 macrophages. The total number of associated amastigotes (association index) and total number of internalised amastigotes (phagocytic index) by 100 macrophages were quantified. The percentage of associated amastigotes that are also internalized was determined (Escaron et al., 2007).

### **2.3. Citotoxic effects of epiisopiloturin to peritoneal cells**

The toxicity of epiisopiloturine to mammalian cells was estimated using peritoneal mice cells, predominantly macrophages. Cells were obtained by washing the peritoneal cavity of mice with 10 mL cold sterile PBS at pH 7.2 followed by centrifugation at 1000 rpm at 4°C for 10 minutes and quantification with trypan blue

in PBS pH 7.2 in hemocytometer (viability above 95%). Viable cells ( $2.5 \times 10^4$ ) were cultured in 96 well microplates for 1 hour with different concentrations of epiisopiloturine (from 1 to 128  $\mu\text{g/mL}$ ) at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . Cell viability was assessed using the method of Mosmann (1983), which is based on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells to cleave the pale yellow tetrazolium rings of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) producing dark blue crystals. The release of crystals was obtained by adding 50  $\mu\text{L}$  10% sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) and quantification was carried out by colorimetric spectrophotometry assay at 550 nm.

## **2.4. Anti-helminthes assay**

### **2.4.1 Parasite**

*Schistosoma mansoni* (BH strain Belo Horizonte, Brazil) is routinely maintained using *Biomphalaria glabrata* snails and hamsters hosts at the Parasitology Laboratory of Instituto Butantan from São Paulo, Brazil. Female hamsters (weighting 20 to 22 g) were infected by subcutaneous injection of 150 cercariae. After 9 weeks, adult *S. mansoni* were recovered from hamsters by perfusion (Yolles et al., 1947). The experimental protocols were authorized by Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of São Paulo (USP).

### **2.4.2. In vitro studies with *Schistosoma mansoni***

*Schistosoma mansoni* worms harvested from hamsters were washed in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 200  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, and 200

IU/ml of penicillin (Invitrogen). Two adult male and two female parasites were incubated in 24-well culture plate (Techno Plastic Products, TPP) containing 2 mL of the same medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37°C and at 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (Xiao et al., 2007). After 2 hours, episopiloturine was added to the culture, from 50 to 200 µg/mL (Shuhua and Catto, 1989). The experiments were carried out in triplicates. The parasites were kept for 120 h and monitored every 24 h and the effects of the drugs on *S. mansoni* were assessed qualitatively with an emphasis on changes in worm motor activity, tegumental alterations and/or occurrence of death. All experiments were carried using RPMI 1640 medium and RPMI 1640 with 2.0% DMSO as negative control groups and 10 µM praziquantel (PQZ) as positive control group. Worm motility, tegumental alterations, and the survival of the parasites were monitored for 5 days under an inverted microscope and confocal microscopy (SMZ 1000, Nikon).

#### **2.4.3. Tegumental changes**

Quantification of the number of tubercles of helminthes was performed using confocal microscopy. After established times of 120 h (150 µg/mL) or in the occurrence of death, parasites were fixed in Formalin-Acetic-Alcohol solution (FAA) and analyzed under confocal microscopy (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Zeiss) at 488 nm (exciting) and 505 nm (emission) as described by Moraes et al. (2009). A minimum of three random areas (20,000 µm<sup>2</sup>) of the tegument each parasite was assessed. Numbers of intact tubers was noted and calculated with the LSM Image software (Zeiss).

#### **2.5. Statistical Analysis**

ANOVA and Kruskal–Wallis tests were used to compare multiple normal or non-normal samples, respectively. Student's *t*-test and Mann–Whitney test were used to

compare two normal or non-normal samples, respectively. The BioEstat 5.0 software package (Belém, Brasil, 2007) was used for performing the statistical tests and for graphical representations.

### 3. Results and Discussion

The RP-HPLC (High Performance Liquid Chromatography) purification of the alkaloid extract of jaborandi leaves resulted in several fractions, one of them identified by electrospray ion trap mass spectrometry as epiisopiloturin ( $[M+H^+] = 287.061$ ). The fragmentation pattern of this molecule confirmed its structure as identical to that described by Voigtlander et al. 1978 using  $^{13}\text{C}$ -RMN (**Figure 1**).

*In vitro* assays revealed that epiisopiloturin has significant leishmanicidal activity to the amastigote form of *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67/PH-8. Epiisopiloturin at a concentration of 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lowered the association index between peritoneal macrophages and *L. amazonensis* to less than half of the control (**Figure 2 A, 2B, 2C, and 2E**). However, it did not produce detectable mortality to the promastigote form in the assayed concentrations (data not shown). This is probably due to the morphological and biochemical plasticity of the two forms presented by the parasite, including a differential energy metabolism and transport across membranes (Killick and Rioux, 1991). Most of the drug-screening experiments against *Leishmania* have been performed on promastigotes and not on the amastigotes, which is the actual parasitic phase that causes the infection in humans and dogs (Baneth and Shaw, 2002; Ordóñez-Gutiérrez et al., 2007). It is not possible at the moment to determine the reason for the epiisopiloturin selectivity, due to its unknown mechanism of action. However, azoles are known to



inhibit the growth of *Leishmania* amastigotes by preventing the cytochrome P-450-mediated 14- $\alpha$ -demethylation of lanosterol, blocking ergosterol synthesis and causing accumulation of 14- $\alpha$ -methyl sterols (Srinivas et al., 2009). Sterol biosynthesis inhibitors offer an attractive possibility, as *Leishmania* parasites synthesize specific sterols which seem to be essential for cell proliferation and viability (Chance, 1995).

The cytotoxicity of epiisopiloturin to peritoneal macrophage cells was evaluated. The number and viability of macrophage peritoneal cells adhered to sample wells after incubation with the alkaloid up to a concentration of 128  $\mu\text{g/mL}$  did not differ significantly to the control (**Figure 3**). This is in agreement with other imidazole compounds that did not demonstrate strong toxic actions to mammalian cells (acute toxicity and cytotoxicity) (Kowalska-Pylka et al., 2001). However, some azoles have high toxicity to the kidneys and liver, such as ketoconazole, a typical azole compound binds to mammalian P450 enzymes, including P4503A4 and several steroid hydroxylases (Billaud et al., 2009).

A number of side-effects are associated with ketoconazole as a result of inhibition of these mammalian enzymes (Venkatakrisnan et al., 2000). Ketoconazole leads to liver damage due to its ability to inhibit P4503A4, the major P450 isoform of the liver (Cupp-Vickery et al., 2001). Considering its innocuousness to mammalian cells, epiisopiloturin might also have potential as an orally administered drug for the treatment of other neglected diseases, such as schistosomiasis.

The best control to schistosomiasis continues to be prophylaxis, by the improvement of public health with basic sanitation and the treatment of water for home use (Penido et al., 2008). Infected individuals are treated with albendazole and mebendazole, anti-helminthic drugs already used in human and veterinary

medicine. Interestingly, these two drugs belong to the same chemical group of the alkaloid epiisopiloturine.

The effect of epiisopiloturin on adult *S. mansoni* worms was studied by measuring alterations in motor activity and in the tegument of the helminthes after incubation with increasing concentrations of the alkaloid, as shown in **Table 1**. After 120 h of incubation, the worms of the control groups maintained normal movement with no detectable alterations. Reduction in worms' motility could be detected at 100 µg/mL of the drug, and dead male worms were detected at 150 µg/mL (**Table 1**).

Worms incubated with epiisopiloturin at 150 µg/mL showed decreased motor activity without tegumental alterations in many individuals after an incubation time from 48 to 72 h. However, the group treated with 2.0% DMSO, did not significantly decrease the worm viability (according to parameters proposed by Xiao et al., 2007) in comparison with the negative control group.

Changes in *S. mansoni* worms surface morphology were detected at an epiisopiloturin concentration of 200 µg/mL. A pattern consisting of a combination of changes in surface morphology were detected and correlated to the death of the worms (**Figure 4**). For the extraction of quantitative parameters, an area of 20,000 µm<sup>2</sup> was demarcated and healthy tubers were counted and evaluated as intact, altered or damaged (**Figure 5**). Even at concentrations that induced the parasites death, motility and morphological changes in the surface could be detected.

The **confocal** laser scanning **microscopy** was efficient to detect alterations in the surface of the parasite, in the right column of **Figure 4**, we can see in detail the changes in seed coats associated with increasing concentrations of the alkaloid. In previous works, similar techniques were used to evaluate effects of drugs.

Penido et al. (2008) showed the integrity of the membrane of *S. mansoni* worms after incubation with cationic nanoemulsions containing selected drugs by confocal fluorescence probe. This probe is hydrophilic and fluoresces when bound to DNA, thus indicating the degree of damage to the worm's membrane. These results are interesting, because Penido et al. (1995) demonstrated that some aminoalkanethiosulfuric acids (at concentrations of 0.25-1mM), many times larger than the alkaloid of this paper caused lesions to the tegument. They were also effective in causing paralysis and lesions to the tegument of the schistosomula (Penido et al., 2008).

The mechanism by which epiisopiloturin imidazole alkaloid exerts its *in vitro* schistosomicidal effect is not clear, but our results indicate that epiisopiloturin possesses activity against adult worms. Then, this alkaloid isolated from jaborandi is a promising lead compound for the development of new schistosomicidal agents.

It has been suggested that different therapeutic strategies involving combinations of drugs need to be investigated (Ribeiro-dos-Santos et al., 2006). And, even if vaccines are to be developed, they should work better when administered together with drugs in an integrated approach to of schistosomiasis (Penido et al., 2008; Sayed et al., 2008). The use of epiisopiloturin could be a viable alternative for future studies in the area of parasitic diseases.

## **Acknowledgments**

The authors thank EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pós-Graduação em Ciência Animal (Universidade Federal do Piauí - UFPI), VEGEFLORA Extrações do Nordeste LTDA and FINEP *Campus Regionais* 2007

programs for partially funding the project. We are grateful to Alexander Seixas de Souza, for excellent technical assistance; to Saulo Martins de Sá Mandel for the valuable comments on the manuscript.

## References

Abreu, I.N., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Mazzafera, P., 2005. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph.). *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 41, 806- 811.

Araújo, S.C., Mattos, A.C.A., Teixeira, H.F., Coelho, P.M.Z., Nelson, D.L., Oliveira, M.C., 2007. Improvement of *in vitro* efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. *Int. J. Pharm.* 337, 307–315.

Barradas, J.S., Errea, M.I., D´Accorso, N.B., Sepúlveda, C.S., Talarico, L.B., Damonte, E.B., 2008. Synthesis and antiviral activity of azoles obtained from carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 2468–2474.

Baneth, G., Shaw, S.E., 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 106, 315–24.

[Billaud](#), E.M. [Antoine](#), C. Berge, M. Abboud, I. Lefevre, S. [Benammar](#), M. [Glotz](#), D., 2009. Management of Metabolic Cytochrome P450 3A4 Drug-Drug Interaction between Everolimus and Azole Antifungals in a Renal Transplant Patient. *Clin. Drug Invest.*, 29, 481-486.

Camargo, E.P., 2008. *Doenças Tropicais. Estud. Av.*, 22(64), 95-110.

Carvalho, P.B., Arribas, M.A.G., Ferreira, E.I., 2000. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 36, 69–96.

Carvalho, P.B., Ferreira, E.I., 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature’s leadership against an ancient disease—review. *Fitoterapia.* 72, 599–618.

Chance, M.L., 1995. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 89, S37-43

Costa, P.V. Processo de obtenção e purificação de pilocarpina e seus sais. BR Pat. PI9203183, 1999-07-06. p.8.

Cupp-Vickery, J.R., Garcia, C., Hofacre, A., McGee-Estrada, K., 2001. Ketoconazole-induced Conformational Changes in the Active Site of Cytochrome P450eryF. *J. Mol. Biol.* 311, 101-110.

Davies, S.G., Roberts, P.M., Stephenson, P.T., Thomson, J.E., 2009. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosinine. *Tetrahedron Lett.* 50, 3509–3512.

Escaron, C.J., Lees, D.M., Tewari, R., Smith, D.F., Caron, E., 2007. A simple, robust and versatile method to characterise intracellular parasitism. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153, 72-76.

Hadj-esfandiari, N., Navidpour, L., Shadnia, H., Amini, M., Samadi, N., Faramarzi, M.A. and Shafiee, A., 2007. Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure–activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolylmethylene)-3(2H)-benzofuranone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6354–6363.

Katz, N., Coelho, P.M.Z., 2008. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. *Acta Trop.* 108, 72–78.

Kayser, O., Kiderlen, A.F., 2001. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother. Res.* 15, 148–152.

Khabnadideh, S., Rezaei, Z., Khalafi-Nezhad, A., Bahrinajafi, R., Mohamadi, R., Farrokhrooz, A.A., 2003. Synthesis of N-Alkylated derivatives of imidazole as antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2863–2865.

Killick-Kendrick R., Rioux J.A. 1991. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol. Hum. Comp.* 66(Suppl. 1), 71–74.

Kowalska-Pylka, A.H., Mayer-Dziedzic, B., Niewiadomy, A., Matysiak, J., 2001. Evaluation of substituted benzthioanilides toxicity using in vitro tests. *ATLA.* 29, 547-556.

Lima, C.C., Criddle, D.N., Coelho-de-Souza, A.N., Monte, F.J., Jaffar, M., Leal-Cardoso, J.H., 2000. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. *Planta Med.* 66, 408-411.

Mallia, M.B., Subramanian, S., Banerjee, S., Sarma, H.D, Venkatesh, M., 2006. Evaluation of  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  complex of 2-methyl-5-nitroimidazole as an agent for targeting tumor hypoxia. *Bioorg. Med. Chem.* 14, p. 7666–7670.

Melo, A.L., Barcellos, N.M.S., Demicheli, C., Frezard, F., 2003. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. *Int. J. Pharm.* 255, 227–230.

Moraes, J., Silva, M.P.N., Ohlweiler, F.P., Kawano, T., 2009. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 51, 77-82.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55.

Olender D., Żwawiak, J., Lukianchuk, V., Lesyk, R., Kropacz, A., Fojutowski, A., Zaprutko, L., 2009. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* 44, p.645-652.

Ordóñez-Gutiérrez, L., Espada-Fernández, R., Dea-Ayuela, M. A., Torrado, J. J., Bolás-Fernandez, F., Alunda, J. M., 2007. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30, 325–329.

Penido, M.L.O., Nelson, D.L., Viera, L.Q., Watson, D.G., Kusel J.R., 1995. Metabolism by *Schistosoma mansoni* of a new schistosomicide: 2-[(1-methylpropyl)- amino]-1-octanesulphuric acid. *Parasitol.* 111, 177–185.

Penido, M.L.O., Coelho, P.M.Z., Mello, R.T., Piló-Veloso, D., Oliveira, M.C., Kusel, J.R., Nelson, D.L., 2008. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. *Acta Trop.* 108, 249–255.

Ribeiro-dos-Santos, G., Verjovski-Almeida, S., Leite, L.C., 2006. Schistosomiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitol. Res.* 99, 505–521.

Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macêdo, R.O., Barbosa-Filho, J.M., 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 12, 514–535.

Sawaya, A.C.H.F., Abreu, I.N., Andreazza, N.L., Eberlin, M.N., Mazzafera P., 2008. HPLC-ESI MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules.* 13, 1518-1529.

Sayed, A.A., Simeonov, A., Thomas, C.J., Inglese, J., Austin, C.P., Williams, D.L., 2008. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nat. Med.* 14, 407–412.

Shuhua, X., Catto, B.A., 1989. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1557-1562.

Srinivas, N., Palne, S., Nishi, Gupta, S., Bhandari., 2009. Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 324-327.

Venkatakrisnan, K., Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., 2000. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. *Clin. Pharmacokinet.* 38(2), 111-80.

Voigtlander, H.W., Balsam, G., Engelhardt, M., 1978. Epiisopiloturin, ein Neues *Pilocarpus*-Alkaloid. *Arch. Pharm.* 311, 927-935.

Walczak K., Gondela A., Suwiński J., 2004. Synthesis and anti-tuberculosis activity of N-aryl-C-nitroazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 39, p. 849–853.

World Health Organization (WHO), 2008. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis (<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>).

Xiao, S.H., Keiser, J., Chollet, J., Utzinger, J., Dong, Y., Endriss, Y., Vennerstrom, J.L., Tanner, M., 2007. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1440-1445.

Yolles, T.K., Moore, D.V., De Guisti, D.L., Ripsom, C.A. and Meleney, H.E., 1947. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. *J. Parasitol.*, 33, 419-426.

## Legends

### Figures

**Figure 1.** (A) ESI+ MS spectra of epiisopiloturin showing the fragmentation from  $[M+H]^+ = 287.04$  parent ion. (B) MS/MS the fragment ion  $[M - H_2O + H]^+ = 269.04$ . (C) MS<sup>3</sup> the fragments ions are  $[M - 2H_2O + H]^+ = 251.08$ ,  $[M - H_2O - CH_2O_2 + H]^+ = 223.08$  and  $M/z = 95.04$ , this ion most probably corresponds to the positively charged (3-methyl-imidazole)methylene.

**Figure 2.** Effect of epiisopiloturin on amastigotes of *Leishmania amazonensis*. (A) Untreated infected macrophages, added with epiisopiloturin at (B) 2 µg/mL, (C) 16 µg/mL, and (D) 128 µg/mL. Results are expressed as Association Index (A.I.) = Percentage of infected macrophages x number of parasites per cell.

**Figure 3.** Effect of epiisopiloturin on macrophage peritoneal cells as measured by MTT assay. Each bar represents standard error of three independent experiments with similar results. The results analyzed by the Kruskal-Wallis test did not show differences between treatments ( $p > 0.05$ ).

**Figure 4.** Confocal fluorescence morphological analysis of *S. mansoni* after 120 hours. (A) Non-treated with epiisopiloturin (negative control). (C), (E), and (G), morphological structure on the *S. mansoni* induced by dose-dependent

epiisopiloturin concentrations indicated on each inset. **(B)** Higher magnification of negative control. **(D)**, **(F)**, and **(H)** showed higher magnification on the 20.000  $\mu\text{m}^2$  of surface area.

**Figure 5.** Absolute number of undamaged tubers on a surface area of 20,000  $\mu\text{m}^2$  (n=12) on adult *S. mansoni* as a function of epiisopiloturin concentration.

## Tables

**Table 1.** *In vitro* effects of Epiisopiloturin against 49-day-old adult *Schistosoma mansoni*.



Figure 1

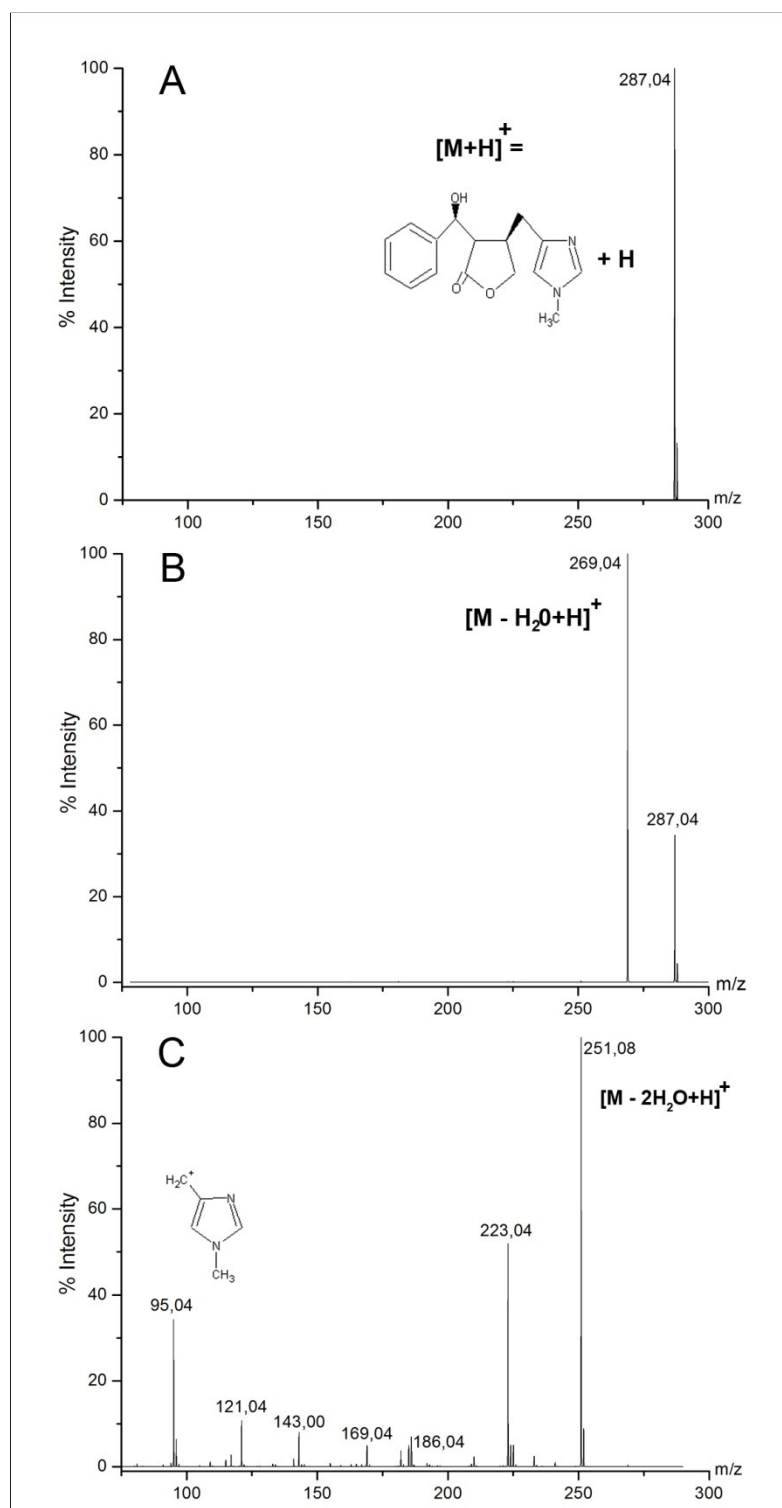


Figure 2.

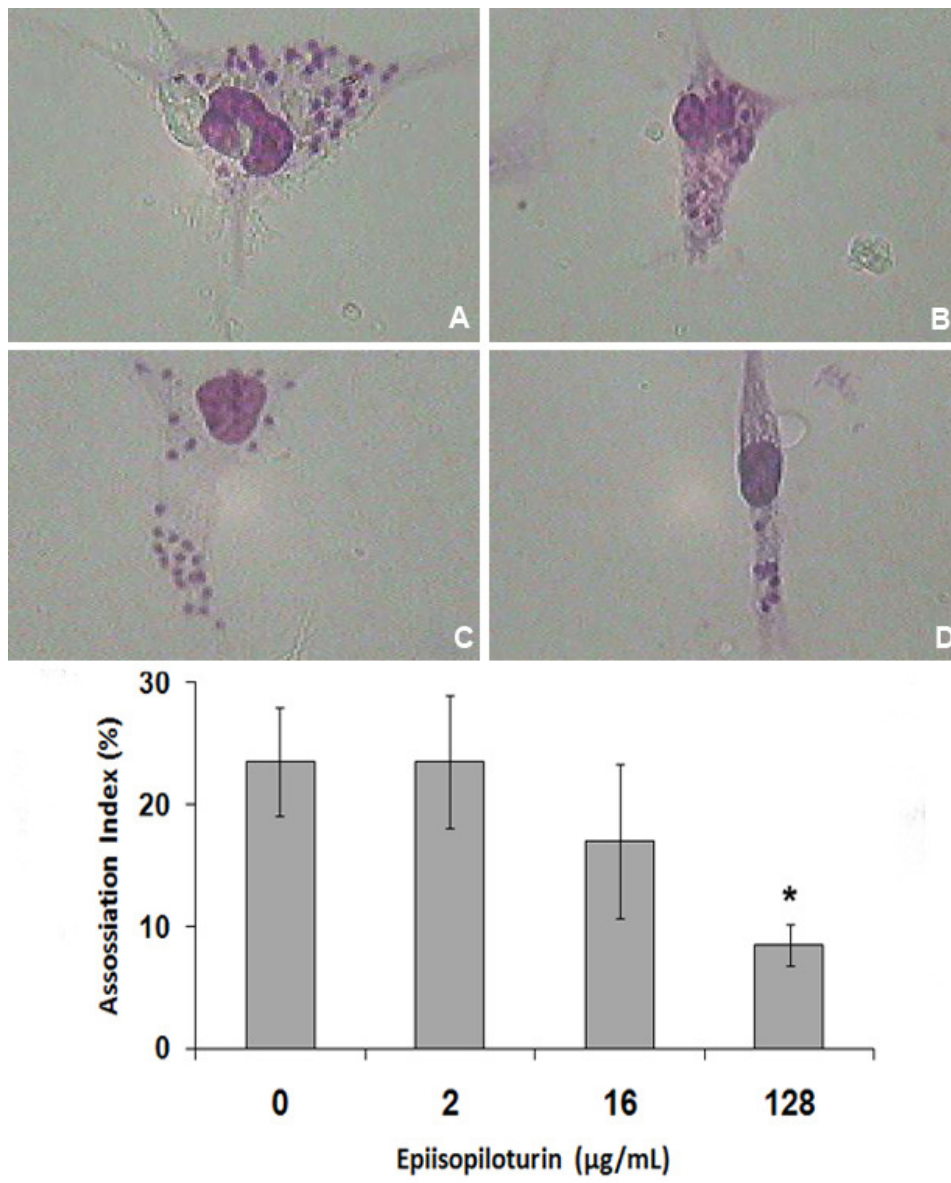


Figure 3.

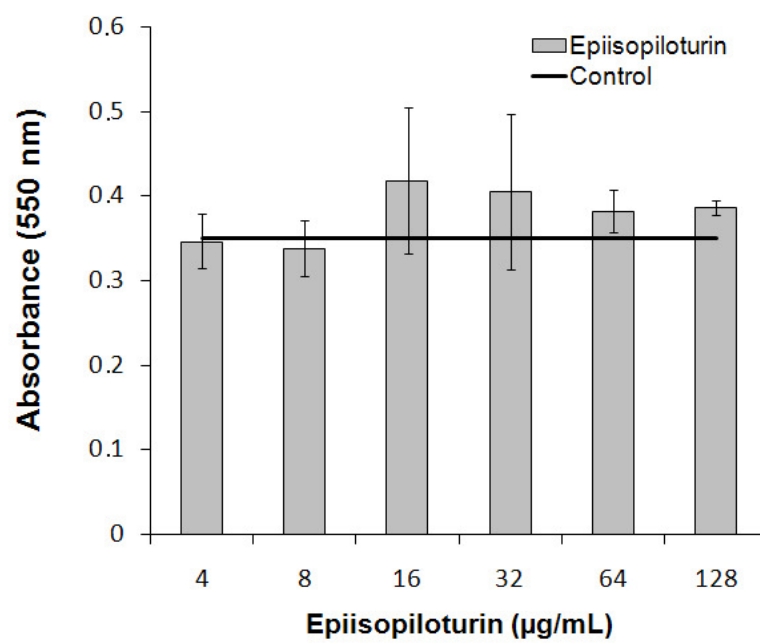


Figure 4.

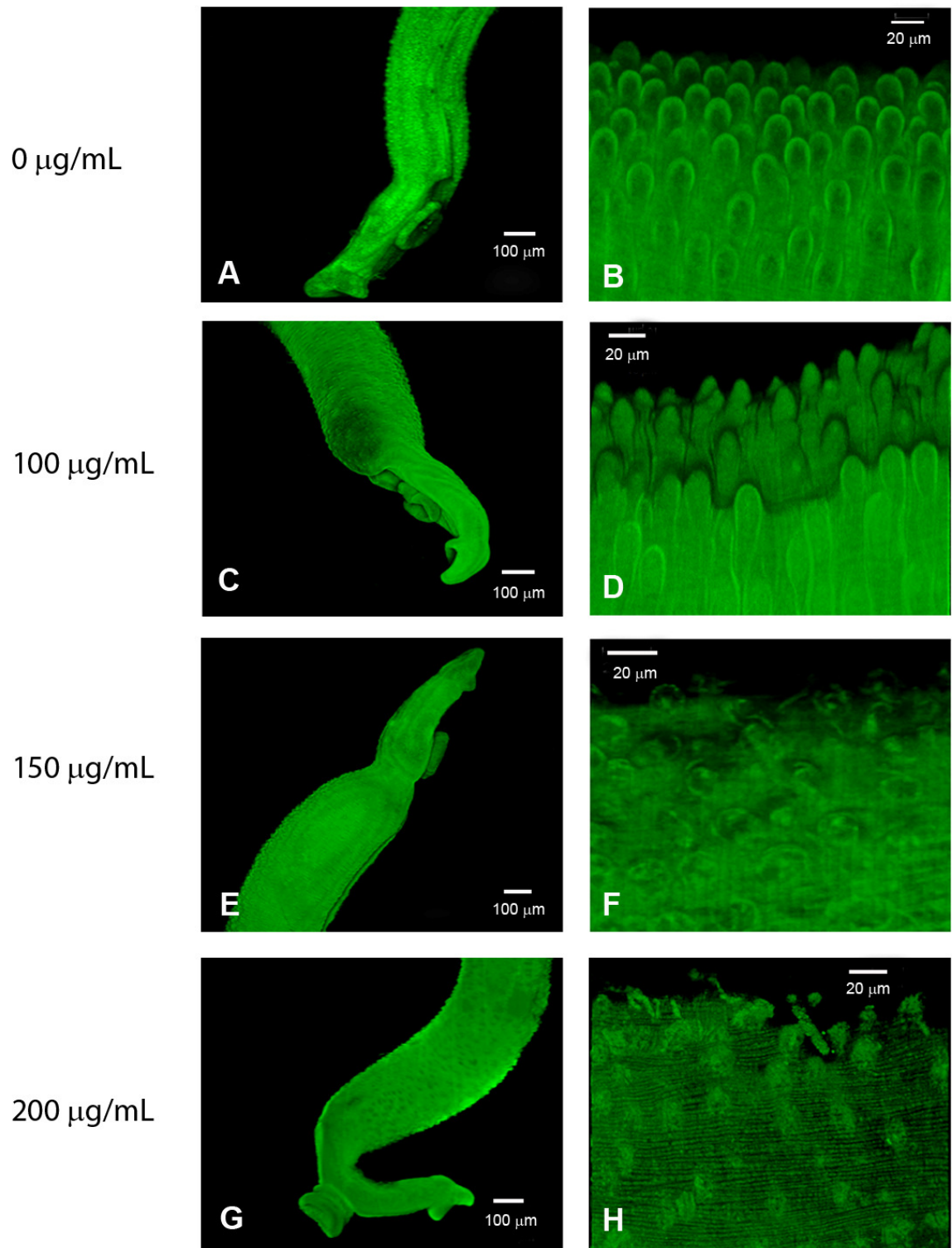
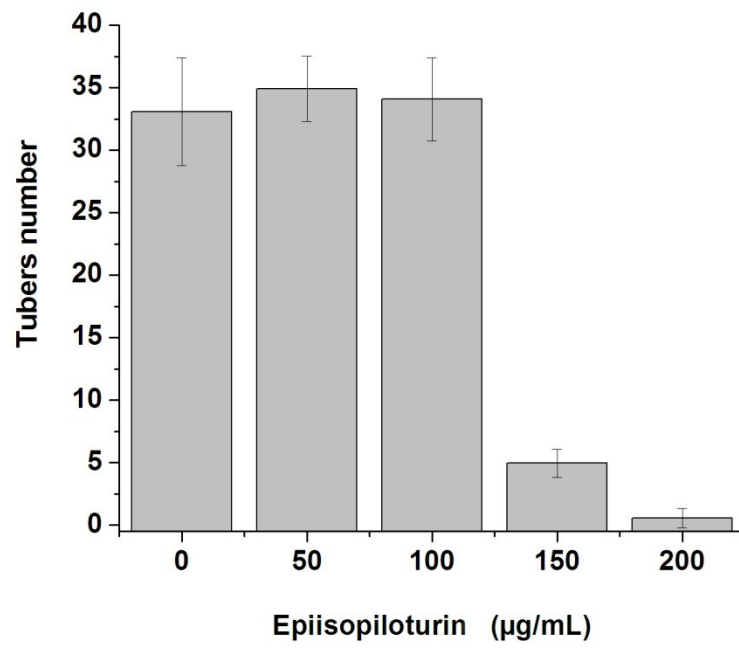


Figure 5.



**Table 1.** *In vitro* effects of Epiisopiloturin against 49-day-old adult *Schistosoma mansoni*.

Epiisopiloturin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Number of worms investigated	Incubation of period (h)	Number of dead worms	Motor activity reduction		Number of worms with tegumental alterations	
				Slight	Significant	Partial	Extensive
0 <sup>a</sup>	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	0	0	0	0
	12	96	0	0	0	0	0
	12	120	0	0	0	0	0
25	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	0	0	0	0
	12	96	0	0	0	0	0
	12	120	0	0	0	0	0
50	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	0	0	0	0
	12	96	0	0	0	0	0
	12	120	0	0	0	0	0
100	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	2	0	0	0
	12	96	0	4	2	0	0
	12	120	0	6	4	0	0
150	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	4	2	0	0
	12	72	0	8	4	2	0
	12	96	0	2	10	3	1
	12	120	12	0	12	0	6
200	12	24	0	6	0	2	0
	12	48	0	6	6	3	0
	12	72	12	0	12	0	6
	12	96	12	0	12	0	6
	12	120	12	0	12	0	6

<sup>a</sup> 2% DMSO in an RPMI 1640 medium.



## ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E SIALAGOGA DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS C6/36 (*Aedes albopictus*)

### Resumo

Com o objetivo de estudar a atividade antimicrobiana, a citotoxicidade e a atividade sialagoga do alcalóide epiisopiloturina foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*. A epiisopiloturina é um alcalóide imidazólico extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus*, conhecido popularmente como jaborandi. Para comprovar a existência desse alcalóide na biomassa gerada pela produção de pilocarpina foi feita a sua extração primária e purificação, a fim de torná-lo mais concentrado. Esta etapa foi seguida da purificação propriamente dita por cromatografia líquida de alta eficiência. Após a realização de ensaios antibacterianos, antiviral e de citotoxicidade *in vitro*, verificou-se que a epiisopiloturina possui atividade significativa de citotoxicidade para células C6/36 (*Aedes albopictus*) em concentrações iguais e superiores a 100 µg/mL e não possui ação inibitória para as bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, *S. epidermidis* H-111 e *S. epidermidis* ATCC 12228, e nem para Dengue Vírus. O teste de atividade sialagoga *in vivo* mostrou que, nas concentrações testadas, não apresenta aumento dos teores de saliva quando comparado ao alcalóide pilocarpina.

Palavras-chave: *Pilocarpus*. Antibacteriana. Antiviral. Colinomimético.



## Abstract

In order to study the antimicrobial, cytotoxicity and sialagogue activity of the alkaloid epiisopiloturine, tests were performed *in vitro* and *in vivo*. Epiisopiloturine is an imidazole alkaloid extracted from the leaves of *Pilocarpus microphyllus*, popularly known as Jaborandi. Its purification was made from the biomass generated during the production of pilocarpine. After a primary extraction, the alkaloid suffered proper purification by high performance liquid chromatography in order to achieve ideal purity and concentration. The tests showed significant cytotoxicity activity against C6/36 cells (*Aedes albopictus*) in concentrations equal to and greater than 100 µg/mL, however no action was observed against the following bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, *S. epidermidis* H-111 and *S. epidermidis* ATCC 12228. Antivirus activity using Dengue virus as target was also not detected. Finally, sialagogue activity showed that the concentrations tested do not present significant activity when compared to the alkaloid pilocarpine.

Key-words: *Pilocarpus*. Antibacterial. Antiviral. Colinomimetic.

## 1. Introdução

### Jaborandi e alcalóides

O arbusto *Pilocarpus microphyllus* conhecido como “jaborandi”, pertencente à família *Rutacea*, apresenta altura média de 2 m, com folhas compostas medindo cerca de 40 cm, quando adulta, e folíolos coriáceos de forma lanceolada. As flores são pequenas e dispostas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso (JOSEPH, 1967).

O jaborandi figura entre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse mundial, pois é utilizado como matéria prima para a fabricação de diversos fármacos. De suas folhas são extraídos os sais de pilocarpina, alcalóide utilizado na fabricação de colírios indicados para o controle do glaucoma (SANTOS et al., 1988).

Possui ampla distribuição nas Américas, partindo do sul da América Central indo até o sul da América do Sul. Estão descritas 16 espécies desse gênero *Pilocarpus*, das quais 13 são encontradas no Brasil, sendo que 11 exclusivas do território brasileiro: *P. alatus* C. J. Joseph ex Skorupa, *P. carajaensis* Skorupa, *P. giganteus* Engler, *P. grandiflorus* Engler, *P. jaborandi* Holmes, *P. pauciflorus* St. Hilaire, *P. pennatifolius* Lemmaire, *P. riedelianus* Engler, *P. spicatus* St. Hilaire, *P. sulcatus* Skorupa, *P. trachyllophus* Holmes, *P. microphyllus* Stapf ex Wardleworth e *P. peruvianus* (Macbride) Kaastra. A partir deste gênero já foram identificados quatorze tipos de alcalóides, vinte e sete cumarinas, cinco flavonóides e setenta e seis terpenóides (SKORUPA, 2000; SANTOS e MORENO, 2004).

No Brasil, ocorre principalmente na região Leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste, com distribuição nativa para o Piauí e Maranhão (MARQUES e COSTA, 1994). O estado do Maranhão é o principal produtor de folhas de “jaborandi” no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 95% da produção nacional (PINHEIRO, 1997).

### Vegetais versus gênero *Aedes*

Alguns compostos oriundos de plantas vêm sendo usados como matéria prima para a produção de pesticidas (CICCIA et al., 2000). Eles têm sido considerados alternativas de

grande interesse para o combate aos mosquitos, que são os principais transmissores de muitas doenças tropicais (AUTRAN et al., 2009).

Inseticidas sintéticos têm sido usados ao longo dos anos, em vários países, desde a década de sessenta (BRAGA et al., 2004), porém ainda existem problemas quanto à toxicidade para os humanos e também aumento da resistência de insetos (ANSARI et al., 2000). A identificação de novos compostos ativos e eficazes contra mosquitos e larvas que possam substituir inseticidas sintéticos e dispendiosos (como organoclorados, organofosforados e piretróides), reveste-se de importância (SHAALAN et al., 2005).

O mosquito *Aedes aegypti* é o alvo principal das pesquisas acerca de inseticidas, pois ele é o vetor de doenças como a dengue hemorrágica e febre amarela (OLIVEIRA et al., 2006, AUTRAN et al., 2009). Extratos de plantas do cerrado brasileiro têm apresentado atividade larvicida para *A. aegypti*. Naftoquinonas naturais e sintéticas também têm atividade larvicida para esta espécie de inseto (RODRIGUES et al., 2006). Outras substâncias como o óleo essencial de *Lippia gracilis* (Verbenaceae) HBK, que tem o Carvacrol como componente majoritário, também já demonstrou ação larvicida (SILVA et al., 2007), porém os estudos voltados para a descoberta de substâncias que possam ser utilizados em larga escala, revertem-se de importância econômica e sanitária.

### Imidazóis versus bactérias

Imidazóis são compostos químicos que têm demonstrado atividade antibacteriana e antifúngica. A cadeia de carbonos ligada ao anel imidazólico é fator decisivo para sua atividade biológica. 1-Alquilimidazóis requerem uma cadeia de hidrocarbonetos de comprimento adequado, geralmente de 12 carbonos para demonstrar a atividade antifúngica e citotóxica (KHABNADIDEH et al, 2003).

Análogos imidazólicos como o 2-(substituted phenyl)-1H-imidazole e substituted phenyl-[2-(substituted phenyl)-imidazol-1-yl]-methanone, têm atividade antimicrobiana contra algumas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e espécies de fungos (SHARMA et al., 2009). A atividade dos compostos imidazólicos contra algumas bactérias deve-se ao fato de haver alterações na permeabilidade da membrana, quando estas são incubadas em altas concentrações desses imidazóis, o que gera interferência no funcionamento da

membrana celular pela passagem de  $K^+$  (extravasamento), ocasionando a morte celular (SIMONETTI et al., 2001).

### Jaborandi versus sistema colinérgico

Os relatos de propriedades colinérgicas do jaborandi datam de 1888 quando um médico britânico confirmou, através de um relato de caso, a efetividade do jaborandi no tratamento da xerostomia, mediante a utilização da tintura por via oral. Essa atividade terapêutica do jaborandi já era conhecida pelos índios Tupi, no norte do Brasil, há séculos (VIVINO et al., 1999). Do jaborandi são extraídos os sais de pilocarpina, descritos como agonistas colinérgicos muito utilizados nas medicinas veterinária e humana. Quando usados por via parental seu efeito é percebido pela estimulação parassimpática. O aumento das secreções salivares, gástricas e pancreáticas é consequência de sua atividade colinomimética (ANDRADE et al., 2008).

Agonistas colinérgicos muscarínicos como a pilocarpina têm sido muito utilizados como agentes terapêuticos nos casos de xerostomia (boca seca), visto ser capaz de induzir a salivação, por ativação de receptores muscarínicos nas glândulas salivares (RENZI et al., 1993; WEBSTER e KOCH, 1996; ALMEIDA et al., 2006).

A salivação é o resultado da ação do sistema nervoso autônomo sobre as glândulas salivares, pois tanto o sistema simpático como parassimpático inervam as glândulas salivares, o que pode gerar salivação. Boca seca ou xerostomia é um sintoma freqüente relacionado com o baixo funcionamento das glândulas salivares induzido por estágio fisiológico transitório, condições patológicas ou efeitos de quimioterapia ou radioterapia (BUTT, 1991). A xerostomia crônica compromete a deglutição e a fala, além de predispor a cavidade oral a uma variedade de processos patológicos como úlceras e infecções fúngicas. Todos estes sintomas podem trazer uma baixa qualidade de vida para pacientes com este tipo de enfermidade (FOX et al., 1991; JOHNSON et al., 1993; OXHOLM e SCHIØDT, 1998).

### Objetivos

Considerando-se a semelhança estrutural do alcalóide epiisopiloturina com a pilocarpina, visto que ambos possuem um anel imidazólico ligado a um ciclopentano

heterocíclico através de uma ligação C-C, em sua estrutura (SANTOS e MORENO, 2004), sem que se conheçam as suas propriedades farmacológicas, realizou-se este trabalho objetivando estudar as suas atividades antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, *S. epidermidis* H-111 e *S. epidermidis* ATCC 12228; contra o Dengue Vírus tipo 3; a sua citotoxicidade em células C6/36, *in vitro*, bem como, observar se possui atividade sialagoga *in vivo*.

## **2. Material e métodos**

### Ensaio antiviral

Para o ensaio antiviral contra o Dengue Vírus com base em Figueiredo et al. (2008) o alcalóide epiisopiloturina foi ressuspendido em dimetilsulfóxido (DMSO) e as células C6/36 (*Aedes albopictus*) foram aderidas em microplaca de 24 poços, formando uma monocamada, para receber o alcalóide em diferentes concentrações, depois de serem infectadas por Dengue Vírus, em diferentes diluições (100, 10 e 1 µg/mL). Foram utilizadas como controles, neste ensaio, as culturas de: células C6/36 em meio L15, suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% adicionado de gentamicina, de C6/36 com Dengue Vírus e de C6/36 adicionado de DMSO, nas mesmas concentrações do alcalóide. O Dengue Vírus foi adicionado à microplaca preparada, a qual foi agitada em intervalos de 15 minutos por 1 hora, a 27 °C, para adsorção viral. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e substituído por meio L15 com epiisopiloturina. A incubação da microplaca durou 7 dias com observações diárias a fim de verificar o aparecimento de efeito citopático.

### Ensaio citotoxicidade em C6/36

O ensaio de citotoxicidade em células C6/36 foi realizado através da determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT), utilizando-se placas de 96 poços contendo células C6/36. O alcalóide foi ressuspenso em DMSO e foi aplicado na primeira câmara da microplaca. Este, então foi diluído em série (500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 e 1µg/mL), utilizando-se uma câmara por diluição. Esta placa foi então incubada a 27 °C por 24 horas.

O teste foi realizado através da observação da morte celular e alterações morfológicas das células (SIMONI et al., 1999).

#### Ensaio antibacteriano

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) segundo o protocolo NCCLS M7-A6 (2003) com as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, *S. epidermidis* H-111 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Como controles foram utilizados DMSO, os antibióticos: imipenem, ampicilina, oxacilina e vancomicina, além de somente bactérias em estudo e do caldo Mueller Hinton. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez coincidissem com a da solução padrão McFarland de 0,5, resultando em uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL/poço. As concentrações do alcalóide foram de 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, obtidas por diluição seriada em microplacas, as quais foram incubadas por 24 horas a 35 °C. A verificação do CIM foi feita com o uso de espectrofotômetro com filtro de 630nm.

#### Ensaio de atividade sialagoga em modelo murino

O ensaio foi realizado utilizando ratos machos Wistar, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias da UFPI, de três meses de idade, com 150 g de peso médio, mantidos sob um fotoperíodo de 12 horas com alternâncias de luminosidade e escuridão, em gaiolas coletivas, com água e comida *ad libitum*. Houve suspensão da oferta alimentar 24 horas antes do início dos tratamentos.

A metodologia embasou-se no método citado por Takakura (2009), ou seja, com as observações realizadas no período de 8:00 e 12:00 h, havendo modificação quanto à sua operacionalização. Os animais foram divididos em quatro grupos de 10, sendo os tratamentos: DMSO e solução salina (como controles negativos), epiisopiloturina (teste) e pilocarpina (como controle positivo). Em intervalos de 72 de horas, os animais dos grupos tratados com os dois alcalóides receberam quantidades crescentes das respectivas substâncias, totalizando em três aplicações nas dosagens de 2, 4 e 14 µM/kg, via intraperitoneal, precedidas de injeções de seus respectivos veículos.

Após anestesia dissociativa à base de cetamina (5 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) foram introduzidas bolas de algodão com peso padrão de 40 mg dentro da cavidade oral dos ratos, para a monitoração da quantidade de saliva eliminada, a qual foi mensurada pela pesagem das bolas de algodão, 20 minutos depois da aplicação das substâncias em teste, em balança analítica.

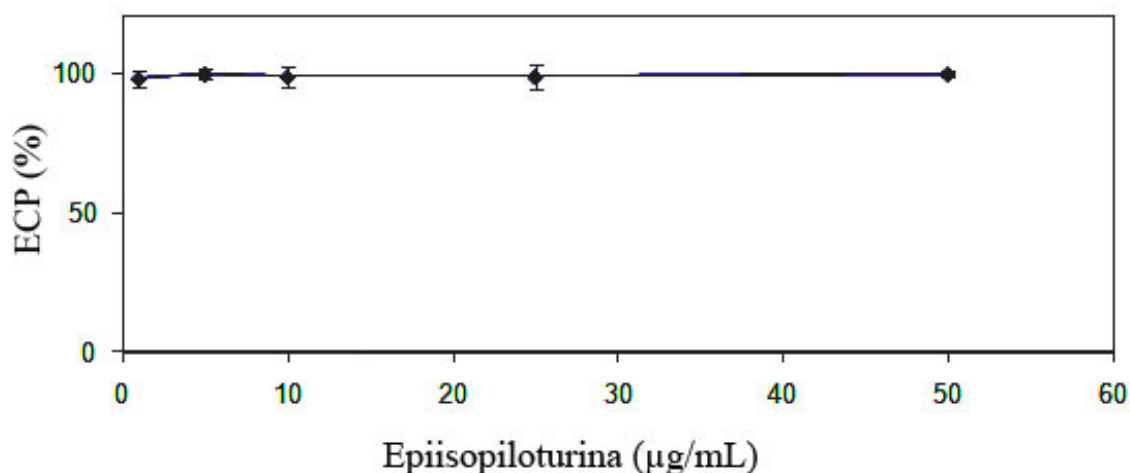
Os dados obtidos foram tratados utilizando o modelo estatístico ANOVA pelo programa Bioestat 5.0 (AYRES, 2007).

### 3. Resultados e discussão

A replicação viral do Dengue Vírus está baseada em: reconhecimento da célula alvo, ligação do vírus à célula por adsorção, penetração, perda do capsídeo ou "despir" o vírus, síntese de macromoléculas podendo agir no RNA<sub>m</sub> e síntese protéica, na replicação do genoma e no RNA<sub>m</sub> tardio modificando proteínas estruturais (SANTOS et al. 2002; BECK, et al. 2007).

Diferentemente do imidazol [2,1-b] tiazol que inibe a replicação do Dengue vírus (BARRADAS et al., 2008) o ensaio da atividade contra vírus da dengue tipo 3 mostrou a inefetividade do alcalóide epiisopiloturina em inibir a replicação desse vírus, sugerindo assim que não houve qualquer prejuízo nas etapas de replicação viral.

O efeito citopático é visto como uma formação de sincícios, células gigantes multinucleadas e fagocitose, infectadas pelo vírus, que geralmente acontece até o sétimo dia depois da infecção indicando a atividade de replicação viral ativa (CASTRO, 2004). Com base na observação deste efeito pode-se considerar que durante o ensaio de atividade antiviral para o Dengue Vírus tipo 3, o alcalóide epiisopiloturina não inibiu qualquer etapa de replicação viral fazendo com que pudéssemos observar este efeito no 7º dia depois da infecção em todas as concentrações testadas (Figura 1). Os imidazóis têm seu mecanismo de ação baseado no bloqueio da síntese de ergosterol, constituinte da membrana celular, pela inibição da enzima 14  $\alpha$ -demetilase (RICHARDSON e WARNOCK, 1993; ALVES et al., 1999; LEPESHEVA e WATERMAN, 2007). A não atividade do alcalóide epiisopiloturina, que é imidazol, para a atividade antiviral provavelmente decorre do fato de que os vírus não apresentam ergosterol em sua composição, e assim não tenha receptores específicos para este alcalóide.

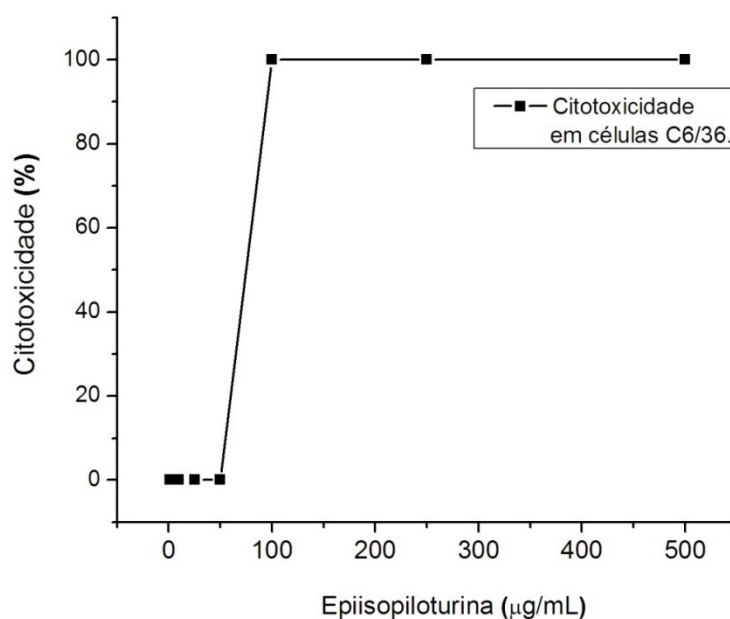


**Figura 1.** Efeito do alcalóide Epiisopiloturina sobre a replicação viral mostrando que em nenhuma das concentrações testadas diminui o efeito citopático nas células C6/36 (*Aedes albopictus*). Teste Kruskal-Wallis ANOVA.  $p > 0,05$ .

No que se refere à pesquisa de citotoxicidade, a epiisopiloturina mostrou atividade citotóxica contra células C6/36 (*Aedes albopictus*) nas concentrações de 100 µg/mL (Figura 2), atividade também vista com naftoquinonas naturais (RIBEIRO et al., 2009) bem como, quando usadas lectinas solúveis em água de sementes de *Moringa oleifera* (COELHO et al., 2009) contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Cabe ainda ressaltar que terpenos também apresentam atividade larvicida para este grupo de células (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Os gêneros *Azadiracta* e *Melita* têm sido investigados e verificada a sua ação tanto utilizando extratos como em moléculas isoladas, contra larvas de *Aedes aegypti* (SIDDIQI et al., 2000, WANDSCHEER et al., 2004). Na composição química da célula do gênero *Aedes* é encontrado ergosterol, onde pode ser sugerida que a citotoxicidade encontrada seja por conta do prejuízo na síntese de ergosterol feita pelo alcalóide imidazólico epiisopiloturina.





**Figura 2.** Efeito do alcalóide epiisopiloturina sobre células C6/36 (*Aedes albopictus*) mostrando que em concentrações acima de 100 µg/mL apresenta citotoxicidade para esta linhagem celular. Teste Kruskal-Wallis ANOVA .  $p < 0,05$ .

Alguns imidazóis têm atividade antimicrobiana caracterizada por alterações na membrana, pelo contato direto destes, que interagem com a dupla camada lipídica, provavelmente por pontes de gordura insaturada de fosfolípido contidos na membrana (SIMONETTI et al., 1993; DUQUENOY e RUYSSCHAERT, 1993), revertendo assim resistências de bactérias como a *E. coli*, quando utilizados em altas concentrações em um período muito curto, sem qualquer dependência em relação ao tipo de meio de cultivo (SIMONETTI et al., 2001).

Quanto ao ensaio antibacteriano contra as cepas de bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, *S. epidermidis* H-111 e *S. epidermidis* ATCC 12228, não se verificou nenhuma atividade nas doses testadas (Tabela 1). Sugere-se que pelas baixas concentrações, testadas, não houve atividade antibacteriana, uma vez que somente em altas concentrações e em apenas em

grupos muito restritos de bactérias Gram-negativas estes imidazóis possam ter atividade significativa.

Cepas bacterianas	Teste 128 µg/mL (Absorbância)	Controle negativo (Absorbância)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,7	0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,4	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,3	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> MED-71	0,4	0,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0,2	0,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H-111	0,4	0,3

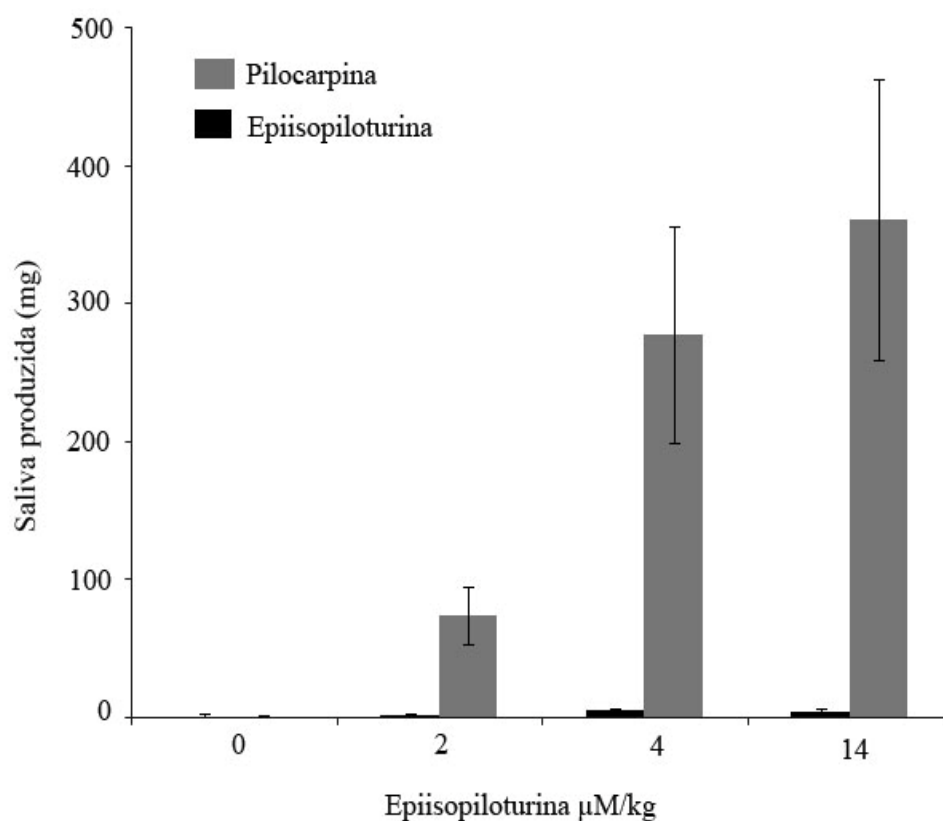
**Tabela 1.** Efeito do alcalóide epiisopiloturina sobre cepas de bactérias na maior concentração testada – 128 µg/mL, onde valores de absorvância são demonstrados em comparação com os valores de controle negativo, sem valores significativos. Teste Kruskal-Wallis ANOVA.  $p > 0,05$ .

Considerando-se ser o alcalóide epiisopiloturina pertencente ao grupo químico imidazólico e ter demonstrado atividade citotóxica em células C6/36, que possuem ergosterol na constituição, somado ao fato de não ter demonstrado atividade sobre a replicação de Dengue vírus e bactérias testadas (que não possuem esse constituinte), pode-se sugerir uma hipótese de mecanismo de ação, na qual a epiisopiloturina possa interferir a síntese do ergosterol.

A pilocarpina age nos receptores colinérgicos das glândulas para estimular a salivação (FERGUSON, 1993; WISEMAN e FAULDS, 1995). Estudos recentes sugerem que a salivação seja também devida a sua ação no sistema nervoso central (MOREIRA et al., 2002). É um dos colinérgicos muscarínicos mais utilizados no tratamento da xerostomia. Uma vez que age em receptores muscarínicos de subtipo M3 onde se localizam em grande maioria no sistema digestório. Quando os receptores muscarínicos são ativados ocorrem vários eventos celulares, podendo um ou mais deles atuar como segundos mensageiros para a ativação muscarínica. Como esses os receptores se acoplam à proteína G, a ligação de

agonistas muscarínicos ativa a cascata do inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG), o que provoca abertura dos canais de cálcio nos músculos lisos (PAPPANO, 2006).

Quanto à avaliação da atividade sialagoga, foi verificado que houve diferença significativa entre o grupo tratado com epiisopiloturina e o seu controle positivo – pilocarpina (Figura 3), em todas as concentrações testadas. Embora as moléculas de pilocarpina e epiisopiloturina sejam estruturalmente semelhantes, esta última não apresenta atividade sialagoga. Isso sugere que este último alcalóide não interfira nos canais de cálcio dos músculos lisos que ativam a salivação.



**Figura 3-** Efeito do alcalóide epiisopiloturina na atividade salivar em ratos machos Wistar com peso (150-180 g) tendo pilocarpina como controle positivo. Dados tratados pela ANOVA teste Tukey ( $p > 0.01$ ) mostrando que as médias não são diferentes estatisticamente ( $n=10$ ).

## Conclusões

O alcalóide epiisopiloturina nas concentrações iguais e acima de 100 µg/mL tem efeito citotóxico para células C6/36 e não tem efeito sobre a replicação viral do Dengue vírus tipo 3.

Em concentrações de 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL o alcalóide estudado não apresenta atividade antibacteriana para as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED-71, H-111 *S. epidermidis* e *S. epidermidis* ATCC 12228.

Nas concentrações de 2, 4 e 14 µM/kg a epiisopiloturina não apresenta atividade sialagoga em modelo murino.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. L.; DE LUCA JR, L. A.; COLOMBARI, A. D. S.; MENANI, J. V.; RENZI, A. Damage of the medial preoptic area impairs peripheral pilocarpina induced salivary secretion, **Brain research**, n. 1085, p. 144–148. 2006.

ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; CURY, A. E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar**, 1999. Disponível em: <<http://www.newslab.com.br/antifung.htm>>. Acesso em: 05 abr. 1999.

ANDRADE, S. F.; FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. ; ANDRADE NETO, J. P.; KANASHIRO, G. P. Terapêutica do sistema nervoso. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 492-513.

ANSARI, M. A., RAZDAN, R. K., TANDON, M., VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 207-211. 2000.

AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; DA SILVA, C. S. B.; SANTOS, G. K. N.; DA CÂMARA, C. A. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284-2288. 2009.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; LIMA, D.; SANTOS, A. A.S. BioEstat 5.0: **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamiraná, 2007.

BARRADAS, J. S.; ERREA, M. I.; D'ACCORSO, N. B.; SEPÚLVEDA, C. S.; TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Synthesis and antiviral activity of azoles obtained from carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2468–2474. 2008.

BECK, P. A.; BRANDÃO, C. F.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Caracterização de Anticorpos Monoclonais Contra Rotavírus Bovino e suas Aplicações como Ferramenta de Diagnóstico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 551-557. 2007.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. D.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203. 2004.

BUTT, G. M. Drug-induced xerostomia. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 57, p. 391-393. 1991.

CASTRO, J. N. C. **Aspectos Viroológicos do Dengue no Estado do Amazonas**. 2004. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Amazonas da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2004.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p.185-189. 2000.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934–938. 2009.

DUQUENOY, P.; RUYSSCHAERT, J. M. Interaction between lipids and miconazole sulfosalicylate and econazole sulfosalicylate. **European Bulletin Drug Research**, v. 2, p. 129–134. 1993.

FERGUSON, M. M. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction, **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 75, p. 186–191. 1993.

FIGUEIREDO, L. B.; CECÍLIO, A. B.; FERREIRA, G. P.; DRUMOND, B. P.; OLIVEIRA, J. G.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, 2008.

FOX, P. C.; ATKINSON, J. C.; MACYNSKI, A. A.; WOLFF, A.; KUNG, D. S.; VALDEZ, I. H.; JACKSON, W.; DELAPENHA, R. A.; SHIROKY, J.; BAUM, B. J. Pilocarpine

treatment of salivary gland hypofunction and dry mouth (xerostomia). **Archives of Internal Medicine**, v. 151, p. 1149-1152. 1991.

JOHNSON, J. T.; FERRETTI, G. A.; NETHERY, J.; VALDEZ, I. H.; FOX, P. C.; NG, D.; MUSCOPLAT, C. C.; GALLAGHER, S. C. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 390 – 395. 1993.

JOSEPH, C. J. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras). **Mecânica Popular**, v. 40, p. 1-9. 1967.

KHABNADIDEH, S.; REZAEI, Z.; KHALAFI-NEZHAD, A.; BAHRINAJAFI, R.; MOHAMADI, R.; FARROKHROZ, A. A. Synthesis of N-Alkylated derivatives of imidazole as antibacterial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters.**, v. 13, p. 2863–2865. 2003.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P-450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 467–477. 2007.

MARQUES, M. E. T.; COSTA, J. P. C. **Jaborandi** (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPA-CPATU, 4. 1994.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C. T.; LUCA JR. L. A.; RENZI, A.; MENANI, J. V. Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 429-434. 2002.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, A.; LONGHI, J.; ANDRADE, C.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M. A. Normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v.7, n. 2. 2006.

OXHOLM, P.; PRAUSE, J. U.; SCHIØDT, M. Rational drug therapy recommendations for the treatment of patients with Sjögren's syndrome. **Drugs**, v. 56, p. 345-353. 1998.

PAPPANO, A. J. Drogas ativadoras dos receptores colinérgicos e inibidores da colinesterase. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kppgan, 2006. p. 79-90.

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.

RENZI, A.; COLOMBARI, E.; MATTOS FILHO, T. R.; SILVEIRA, J. E. N.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; DE LUCA JR., L. A.; DERÓBIO, J. G.; MENANI, J. V. Involvement of central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats, **Journal Dental Research**, v. 72, p. 1481–1484. 1993.

RIBEIRO, K. A. L.; CARVALHO, C. M.; MOLINA, M. T.; LIMA, E. P.; LÓPEZ-MONTERO, E.; REYS, J. R. M. ; OLIVEIRA, M. B. F.; PINTO, A.V.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 44–50. 2009.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection – Diagnosis and management**. London: Blackwell, p.17-43, 1993.

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314–317. 2006.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n. 2, p. 115 – 137. 2004.

SANTOS, J. H. R.; GADELHA, J. W. R.; CARVALHO, M. L.; PIMENTEL, J. V. F.; JÚLIO, P. V. M. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Fortaleza: EUFC, 1988. 216.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 59-63.



SHAALAN, E. A.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149 – 1166. 2005.

SHARMA, D.; NARASIHMAN, B.; KUMAR, P.; JUDGE, V.; NARANG, R.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J. Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 2347-2353. 2009.

SIDDIQUI, B. S.; AFSHAN, F.; GHIASUDDIN; FAIZI, S.; NAQVI, S. N. H.; TARIQ, R. M. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 371 – 376. 2000.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255. 2007.

SIMONETTI, N.; D'AURIA, F. D.; STRIPPOLI, V. Short term contact activity of miconazole sulfosalicylate and econazole sulfosalicylate. **European Bulletin Drug Research**, v. 2(Sup. 1), p. 123–128. 1993.

SIMONETTI, G.; BAFFA, S.; SIMONETTI, N. Contact imidazole activity against resistant bacteria and fungi. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 389–393. 2001.

SIMONI, I. C.; FERNANDES, M. J. B.; CUSTÓDIO, R. M.; MADEIRA, A. M. B. N.; ARNS, C. W. Susceptibility of cell lines to avian viruses. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 30, p. 373-376. 1999.

SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v. 30, p.59 – 70. 2000.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Activation of  $\alpha 2$ -adrenoceptors in the lateral hypothalamus reduces pilocarpine-induced salivation in rats. **Neuroscience Letters**, v. 450, p. 225–228. 2009.

VEIGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390 – 400. 2003.

VIVINO, F. B.; AL-HASHIMI, I.; KHAN, Z.; LEVEQUE, F. G.; SALISBURY, P. L.; TRAN-JOHNSON, T. K.; MUSCOPLAT, C. C.; TRIVEDI, M.; GOLDLUST, B.; GALLAGHER, S. C. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 2, p. 174-81. 1999.

WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E., DA SILVA, M. A. N.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J. L.; ALDEMANN, J.; FONTANA, J. D. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 44, p. 829 – 835. 2004.

WEBSTER, J.; KOCH, H. F. Aspects of tolerability of centrally acting antihypertensive drugs. **Journal of cardiovascular pharmacology**, n.27, p.49-54. 1996.

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.

*CONSIDERAÇÕES FINAIS*

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é resultante de uma parceria firmada entre a Universidade Federal do Piauí – UFPI, através do seu Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (Campus de Parnaíba) e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Campus de Teresina) e a Indústria Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda (localizada na cidade de Parnaíba-PI) objetivando descobrir a utilidade de uma biomassa oriunda do processamento de folhas do jaborandi para a extração da pilocarpina.

Trabalhos preliminares mostraram que, depois da pilocarpina, o alcalóide epiisopiloturina se faz presente em maior quantidade nessa biomassa, que os outros. Devido à semelhança estrutural com a pilocarpina, pensou-se em testar a epiisopiloturina quanto às propriedades colinérgicas próprias dos alcalóides colinomiméticos, porém, os pré-testes direcionaram a pesquisa para outras atividades. Ao se conseguir o isolamento da epiisopiloturina por HPLC, e confirmar a massa molecular por espectrometria de massa, foi comprovado tratar-se de um composto azólico, fato que intencionou a busca por propriedades antimicrobianas. No “dia-à-dia” dos trabalhos até agora realizados, foi possível efetivar os testes de atividades antimicrobianas, antiviral, anti-esquistossoma e anti-protozoária e *in vitro*, bem como, a atividade sialagoga *in vivo*.

Os resultados evidenciaram a atividade trematodocida *in vitro* para *Schistosoma mansoni* (BH strain Belo Horizonte, Brazil) e leishmanicida para *Leishmania amazonensis* na forma amastigota (cepa IFLA/BR/67/PH-8) e a toxicidade para células C6/36 (*Aedes albopictus*), porém não mostraram atividade antibacteriana nem antiviral, para as espécies testadas.

Estes achados são promissores para a continuidade dos estudos com este alcalóide, com o intuito de averiguar outras propriedades farmacológicas, seu mecanismo de ação e, sobretudo, para investigar a possibilidade de seu uso, isolado ou associado a outros compostos, na terapêutica da leishmaniose e esquistossomose, bem como, o seu papel como inseticida, uma vez que demonstrou citotoxicidade *in vitro* para a linhagem de células C6/36 que são provenientes de *Aedes albopictus*.

Está aberta, pois, uma larga janela para o campo da pesquisa científica a partir dos alcalóides oriundos do jaborandi!

*REFERÊNCIAS*

---

## REFERÊNCIAS

- ABDLEY, H.M., GRAYBILL, J.R., LOEBENNERG, D., MELBY, P.C., EFFICACY OF THE TRIAZOLE SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 2910. 1999.
- ABIFISA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO). **Uma legislação justa para os produtos de origem natural**, 2006. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>. Acesso em: 21 ago. 2008.
- ABREU, I.N., SAWAYA, A.C.H.F., EBERLIN, M.N., MAZZAFERA, P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph.). **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, p. 806- 811. 2005.
- AGRA, M.F; SILVA, Q.N.; BASÍLIO, I.J.L.B.; FREITAS, P.S.; BARBOSA FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.3, 2008.
- ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C. Considerações gerais sobre os helmintos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIARK, S. L; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.519-550.
- ALMEIDA, R. L.; DE LUCA JR, L. A.; COLOMBARI, A. D. S.; MENANI, J. V.; RENZI, A. Damage of the medial preoptic area impairs peripheral pilocarpina induced salivary secretion, **Brain research**, n. 1085, p. 144–148. 2006.
- ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; CURY, A. E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar**, 1999. Disponível em: <<http://www.newslab.com.br/antifung.htm>>. Acesso em: 05 abr. 1999.
- ANDRADE, S. F.; FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. ; ANDRADE NETO, J. P.; KANASHIRO, G. P. Terapêutica do sistema nervoso. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 492-513.

ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; GAMBARDELA, M.T.P.; SANTOS, R.H.A. 24-methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p.739-743. 1994.

ANSARI, M. A., RAZDAN, R. K., TANDON, M., VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 207-211. 2000.

ARAÚJO, S.C., MATTOS, A.C.A., TEIXEIRA, H.F., COELHO, P.M.Z., NELSON, D.L., OLIVEIRA, M.C., Improvement of *in vitro* efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International journal of pharmaceutics**, v. 337, p. 307–315. 2007.

AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; DA SILVA, C. S. B.; SANTOS, G. K. N.; DA CÂMARA, C. A. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284-2288. 2009.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; LIMA, D.; SANTOS, A. A.S. BioEstat 5.0: **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamiraná, 2007.

BANETH, G.; SHAW, S. E., Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 106, p. 315–24. 2002.

BAPTISTA NETO, C. **Avaliação do uso da pilocarpina em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço para controle da xerostomia**. 2003. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) – Programa de Pós-graduação em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BARATA, L. S. Fitoterápicos *on line* - 2004. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagem/farmacos/farmal6/htm>>. Acesso em: 14 set. 2008.

BARRADAS, J. S.; ERREA, M. I.; D'ACCORSO, N. B.; SEPÚLVEDA, C. S.; TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Synthesis and antiviral activity of azoles obtained from carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2468–2474. 2008.

BECK, P. A.; BRANDÃO, C. F.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Caracterização de Anticorpos Monoclonais Contra Rotavírus Bovino e suas Aplicações como Ferramenta de Diagnóstico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 551-557. 2007.

BENKO, I.; HERNÁDI, F.; MEGYERI, A.; KISS, A., SOMOGYI, G.; TEGYEY, Z.; KRAICSOVITS, F.; KOVÁCS, P. Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte -macrophage progenitor cells *in vitro*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 675-681.1999.

BOXALL, A.A.; FOGG, A.L.; BLACKWELL, P.A.; KAY, P.; PEMBERTON, E.J.; CROXFORD, A. Veterinary medicines in the environment. **Reviews Environmental Contamination & Toxicology**, v.180, p. 1-91. 2004.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. D.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria n. 6 de 31 de janeiro de 1995**. Diário Oficial da União de 31 de Janeiro de 1995. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 21 ago.2008.

BUTT, G. M. Drug-induced xerostomia. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 57, p. 391-393. 1991.

CAMPANHÃ, M. T. N.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MARTINEZ, M. B. Urinary tract infection: detection of *Escherichia coli* antigens in human urine with an ELIEDA immunoenzymatic assay. **Revista Panamericana de Salud Publica**, n. 6, p. 89-94. 1999.

CAMARGO, E. P. Estudos avançados. **Tropical diseases**, v. 22, p. 95-110. 2008.



CARVALHO, P.B., ARRIBAS, M.A.G., FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, p. 69–96. 2000.

CARVALHO, P.B., FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease—review. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599–618. 2001.

CASTRO, D.M. Homeopatia, plantas medicinais e ambiente. **Revista de Ação Ambiental**, v.10. n. 1. 2004.

CASTRO, J. N. C. **Aspectos Viroológicos do Dengue no Estado do Amazonas**. 2004. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Amazonas da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2004.

CEZÁRIO, R.C.; RIBAS, R.M.; ABDALLAH, V.O.S.; CARNEIRO, C.L.; GONTIJO FILHO, P.P. Infection and colonization by Gram-negative bacilli in neonates hospitalized in High Risk Nursery at Uberlandia Federal University Hospital: etiology, resistant phenotypes and risk factors. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.35, p. 193-198. 2004.

CHANCE, M.L. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 89, p. 37-43. 1995.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p.185-189. 2000.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934–938. 2009.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v. 4, p. 360-369. 1969.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. p. 370-722.

COSTA, M. C. B.; NASCIMENTO NETO, O. C. Aspectos básicos da farmacoterapia ocular. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.1190-1201.

COSTA, P.V. Processo de obtenção e purificação de pilocarpina e seus sais. BR Pat. PI9203183, 1999-07-06. p.8.

CUPP-VICKERY, J. R., GARCIA, C., HOFACRE, A., MCGEE-ESTRADA, K. Ketoconazole-induced Conformational Changes in the Active Site of Cytochrome P450eryF. **Journal of molecular biology**, v. 311, p.101-110. 2001.

DAVIES, S.G., ROBERTS, P.M., STEPHENSON, P.T., THOMSON, J.E. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosinine. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p.3509–3512. 2009.

DÔRES, R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d’anta (*Dimorphandra mollis* Benth)**. 2007. 374f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Viçosa, 2007.

DUQUENOY, P.; RUYSSCHAERT, J. M. Interaction between lipids and miconazole sulfosalicylate and econazole sulfosalicylate. **European Bulletin Drug Research**, v. 2, p. 129–134. 1993.

ESCARON, C. J., LEES, D. M., TEWARI, R., SMITH, D. F., CARON, E. A simple, robust and versatile method to characterise intracellular parasitism. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, p. 72-76. 2007.

FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 73-90.

FERGUSON, M. M. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction, **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 75, p. 186–191. 1993.

FIGUEIREDO, L. B.; CECÍLIO, A. B.; FERREIRA, G. P.; DRUMOND, B. P.; OLIVEIRA, J. G.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, 2008.

FOX, P. C.; ATKINSON, J. C.; MACYNSKI, A. A.; WOLFF, A.; KUNG, D. S.; VALDEZ, I. H.; JACKSON, W.; DELAPENHA, R. A.; SHIROKY, J.; BAUM, B. J. Pilocarpine treatment of salivary gland hypofunction and dry mouth (xerostomia). **Archives of Internal Medicine**, v. 151, p. 1149-1152. 1991.

FRICCIUS, H.; POHLA, H.; ADIBZADEH, M.; SIEGELS-HÜBENTHAL, P.; SCHENK, A.; PAWELEC, G. The effects of the antifungal azoles itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on cytokine gene expression in human lymphoid cells. **International journal of immunopharmacology**, v. 14, p. 791–799. 1992.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FNS). **Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Visceral (Calazar)**; Normas técnicas, Brasília, 49 p, 2003.

HADJ-ESFANDIARI, N.; NAVIDPOUR, L., SHADNIA, H., AMINI, M., SAMADI, N., FARAMARZI, M.A.; SHAFIEE, A. Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure–activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolylmethylene)-3(2H)-benzofuranone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, p. 6354–6363. 2007.

HAMLAR, D. D.; SCHULLER, D. E.; GAHBAUER, R. A.; BUERKI, R. A.; STAUBUS, A. E.; HALL, J.; ALTMAN, J. S.; ELZINGA, D. J.; MARTIN, M. R. Determination of the efficacy of topical oral pilocarpine for postradiation xerostomia in patients with head and neck carcinoma. **Laryngoscope**, v. 106, n. 8, p. 972-976. 1996.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO,

J.C.P.; MENTEZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2000. p.641-656.

IBGE, **Prod. Extr. veg. e Silvíc.**, Rio de Janeiro, 2006. v.21, p.1-45.

JOHNSON, J. T.; FERRETTI, G. A.; NETHERY, J.; VALDEZ, I. H.; FOX, P. C.; NG, D.; MUSCOPLAT, C. C.; GALLAGHER, S. C. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 390 – 395. 1993.

JOSEPH, C. J. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras). **Mecânica Popular**, v. 40, p. 1-9. 1967.

KATZ, N., COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. **Acta Tropica**, v. 108, p. 72–78. 2008.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy research: PTR.** , v. 15, p. 148–152. 2001.

KHABNADIDEH, S.; REZAEI, Z.; KHALAFI-NEZHAD, A.; BAHRINAJAFI, R.; MOHAMADI, R.; FARROKHROZ, A. A. Synthesis of N-Alkylated derivatives of imidazole as antibacterial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, p. 2863–2865. 2003.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 66(Suppl. 1), p. 71–74. 1991.

KOWALSKA-PYLKA, A. H.; MAYER-DZIEDZIC, B.; NIEWIADOMY, A.; MATYSIAK, J. Evaluation of substituted benzthioanilides toxicity using in vitro tests. **Atla**, v. 29, p. 547-556. 2001.

LAMPIRIS, H. W; MADDIX, D. S. Uso clínico dos fármacos antimicrobianos. In: KATZUNG, B.G. (Ed). **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, Cap. 51, p. 699-711.

LARSSON, C. E.; LARSSON JR., C. E.; LEITE, C. A. L.; ANDRADE, S. F.; BRITO, A. F., Terapêuticas Tópica e Sistêmica: Pele, Ouvido e Olho. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca , 2008. p. 179-186.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P-450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 467–477. 2007.

LIMA, C. C.; CRIDDLE, D. N.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MONTE, F. J.; JAFFAR, M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta medica**, v. 66, p. 408-411. 2000.

LIMA, D.F. **Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos**. 2008. 56 f. Monografia (Especialização em Plantas Mediciniais) – Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J. Quimioterapia das infecções por helmintos. In: BRUNTON, L. L.(Ed.) GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, 2006. p. 963-981.

MALLIA, M.B.; SUBRAMANIAN, S.; BANERJEE, S.; SARMA, H.D; VENKATESH, M.,. Evaluation of  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  complex of 2-methyl-5-nitroimidazole as an agent for targeting tumor hypoxia. **Bioorg. Med. Chem.** 2006. 14, p. 7666–7670.

MARQUES, M.E.T.; COSTA, J.P.C. **Jaborandi** (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1994. p.4.

MEEKER, T. C.; SIEGEL, M. S.; SHIOTA, F. M.; CROWLEY, J. J.; MCGUFFIN, R. W. Toxicity of amphotericin B, miconazole and ketoconazole to human granulocyte progenitor cells *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, p. 169–71. 1983.

MELO, A. L.; BARCELLOS, N. M. S.; DEMICHELI, C.; FREZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International journal of pharmaceutics**, v. 255, p. 227–230. 2003.

MONTIANI-FERREIA, F. Oftalmologia. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAZ, J. L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. v. 1, p. 1092-1104.

MORAES, J.; SILVA, M. P. N.; OHLWEILER, F. P.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (*Planorbidae*) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 77-82. 2009.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C. T.; LUCA JR. L. A.; RENZI, A.; MENANI, J. V. Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 429-434. 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55. 1983.

NAHID, A.M.; SUGII, S. Binding of porcine ficolin- $\alpha$  to lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria and lipoteichoic acids from Gram-positive bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v.30, p. 335-343. 2006.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 16(1), p. 61-66. 2006.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLENDER D.; ŻWAWIAK, J.; LUKIANCHUK, V.; LESYK, R.; KROPACZ, A.; FOJUTOWSKI, A.; ZAPRUTKO, L. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. **Eur. J. Med. Chem.**, 2009. 44, p.645-652.

OLIVEIRA, A.; LONGHI, J.; ANDRADE, C.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M. A. Normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v.7, n. 2. 2006.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005**. Ginebra, 2002. p.66.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M. A.; TORRADO, J. J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUNDA, J. M. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, p. 325–329. 2007.

OXHOLM, P.; PRAUSE, J. U.; SCHIØDT, M. Rational drug therapy recommendations for the treatment of patients with Sjögren's syndrome. **Drugs**, v. 56, p. 345-353. 1998.

PAIVA, P. **Extrato de Jaborandi**. [São Paulo]. 2008. Disponível em: <[http://www.peterpaiva.com.br/extratos/extrato\\_jaborandi/extrato\\_jaborandi.php](http://www.peterpaiva.com.br/extratos/extrato_jaborandi/extrato_jaborandi.php)>. Acesso em: 12 set. 2008.

PAPPANO, A. J. Drogas ativadoras dos receptores colinérgicos e inibidores da colinesterase. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kppgan, 2006. p. 79-90.

PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; MELLO, R. T.; PILÓ-VELOSO, D.; OLIVEIRA, M. C.; KUSEL, J. R.; NELSON, D. L. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Tropica**. v. 108, p. 249–255. 2008.

PENIDO, M. L. O.; NELSON, D. L.; VIERA, L. Q.; WATSON, D. G.; KUSEL J. R. Metabolism by *Schistosoma mansoni* of a new schistosomicide: 2-[(1-methylpropyl)-amino]-1-octanesulphuric acid. **Parasitology**, v. 111, p. 177–185. 1995.

PETERSEN-JONES, S.M. Ofalmopatias. In: DUNN, JK. **Tratado de Medicina de Pequenos Animis**. São Pualo: Rocca, 2001. p. 814-863.

PHILIPS, M. A.; STANLEY JR, S. L. Quimioterapia das infecções por protozoários. In: BRUNTON, L. L.(Ed.) GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, 2006. p. 941-961.

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.

RENZI, A.; COLOMBARI, E.; MATTOS FILHO, T. R.; SILVEIRA, J. E. N.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; DE LUCA JR., L. A.; DERÓBIO, J. G.; MENANI, J. V. Involvement of central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats, **Journal Dental Research**, v. 72, p. 1481–1484. 1993.

RIBEIRO, K. A. L.; CARVALHO, C. M.; MOLINA, M. T.; LIMA, E. P.; LÓPEZ-MONTERO, E.; REYS, J. R. M. ; OLIVEIRA, M. B. F.; PINTO, A.V.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 44–50. 2009.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. Schistosomiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**, v. 99, p. 505–521. 2006.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection – Diagnosis and management**. London: Blackwell, p.17-43, 1993.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocologia**. Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: Ed. Premier, 1997. p.163-208.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514–535. 2005.

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314–317. 2006.



RODRIGUES, P. P. Detecção da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de casos clínicos ocorridos em animais de companhia. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.2, p. 506-508. 2008.

ROSENTAL, P. J.; GOLDSMITH, R. S. Farmacologia clínica dos anti-helmínticos. In: KATZUNG, B.G. (Ed). **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.741-750.

SABÁ, R. T; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.106-109. 2002.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1987. p.799-807.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n. 2, p. 115 – 137. 2004.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2. 2004.

SANTOS, J. H. R.; GADELHA, J. W. R.; CARVALHO, M. L.; PIMENTEL, J. V. F.; JÚLIO, P. V. M. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Fortaleza: EUFC, 1988. 216.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 59-63.

SAWAYA, A. C. H. F.; ABREU, I. N.; ANDREAZZA, N. L.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. HPLC-ESI MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. **Molecules**. v. 13, p.1518-1529. 2008.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of oxadiazoles as newdrug leads for the control of schistosomiasis. **Nature medicine**, v. 14, p. 407–412. 2008.

SHAALAN, E. A.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149 – 1166. 2005.

SHARMA, D.; NARASIHMAN, B.; KUMAR, P.; JUDGE, V.; NARANG, R.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J. Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 2347-2353. 2009.

SHUHUA, X., CATTO, B.A., *In vitro* and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, p. 1557-1562. 1989.

SIDDIQUI, B. S.; AFSHAN, F.; GHIASUDDIN; FAIZI, S.; NAQVI, S. N. H.; TARIQ, R. M. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 371 – 376. 2000.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255. 2007.

SIMONETTI N, D'AURIA F. D.; STRIPPOLI, V. Short term contact activity of miconazole sulfosalicylate and econazole sulfosalicylate. **European Bulletin Drug Research**, v. 2(Sup. 1), p. 123–128. 1993.

SIMONETTI, G.; BAFFA, S.; SIMONETTI, N. Contact imidazole activity against resistant bacteria and fungi. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 389–393. 2001.

SIMONI, I. C.; FERNANDES, M. J. B.; CUSTÓDIO, R. M.; MADEIRA, A. M. B. N.; ARNS, C. W. Susceptibility of cell lines to avian viruses. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 30, p. 373-376. 1999.

SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v. 30, p.59 – 70. 2000.

- SRINIVAS, N.; PALNE, S.; NISHI, GUPTA .S; BHANDARI, K . Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 324-327. 2009.
- TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Activation of  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the lateral hypothalamus reduces pilocarpine-induced salivation in rats. **Neuroscience Letters**, v. 450, p. 225–228. 2009.
- TAYLOR S. E.; AL-HASHIMI, I. Pilocarpine, an old drug; a new formulation. **Texas Dental Journal**, v.113, p.10-12, 1996.
- VEIGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390 – 400. 2003.
- VENKATAKRISHNAN, K.; MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. **Clinical pharmacokinetics**, v. 38(2), p. 111-80. 2000.
- VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.67-79,
- VIVINO, F. B.; AL-HASHIMI, I.; KHAN, Z.; LEVEQUE, F. G.; SALISBURY, P. L.; TRAN-JOHNSON, T. K.; MUSCOPLAT, C. C.; TRIVEDI, M.; GOLDLUST, B.; GALLAGHER, S. C. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 2, p. 174-181. 1999.
- VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M. Epiisopiloturin, ein Neues *Pilocarpus*-Alkaloid. **Archiv der Pharmazie**, v. 311, p. 927-935. 1978.
- WALCZAK, K.; GONDELA, A.; SUWIŃSKI, J. Synthesis and anti-tuberculosis activity of N-aryl-C-nitroazoles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 39, p. 849–853. 2004.
- WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E., DA SILVA, M. A. N.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J. L.; ALDEMANN, J.; FONTANA, J. D. Larvicidal action of ethanolic extracts

from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 44, p. 829 – 835. 2004.

WEBSTER, J.; KOCH, H. F. Aspects of tolerability of centrally acting antihypertensive drugs. **Journal of cardiovascular pharmacology**, n.27, p.49-54. 1996.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), **Programme for the surveillance and control of leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em: 07 ago. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Division of control of tropical disease. Leishmanioses control. Geographical distribution**. 2007. Disponível em [http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA60/A60\\_10-en.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_10-en.pdf).> Acesso em 30.out.2008.

WYNN, R. L. Oral pilocarpine (salagen): a recently approved salivary stimulant. **General dentistry**, v. 44(1), p. 29-30, 1996.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRISS, Y.; VANNERSTROM, J. L.; TANNER, M. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1440-1445. 2007.

YOLLES, T. K.; MOORE, D. V.; DE GUISTI, D. L.; RIPSOM, C. A.; MELENEY, H. E. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **Journal Parasitology**, v. 33, p. 419-426. 1947.

ZHAN, J.; ZHOU, P. A. Simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. **Toxicology**, v.186, p.119-123, 2003.



JABORANDI (*PILOCARPUS SP.*): UM ARSENAL DE ALCALÓIDES  
FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS.

JABORANDI (*Pilocarpus sp.*): AN ARSENAL OF ALKALOIDS  
PHARMACOLOGICALLY ACTIVE.

**Resumo**

O gênero *Pilocarpus* conhecido popularmente como jaborandi apresenta quatorze alcalóides dos quais a pilocarpina destaca-se como fitofármaco usado na medicina humana e veterinária com funções que variam da diminuição da pressão intraocular, passando pelo combate a xerostomia indo até o estímulo da musculatura lisa intestinal aliviando disfunções como o meteorismo. Outros alcalóides que foram identificados no Jaborandi, sendo que alguns destes ainda sem atividade farmacológica descrita são: isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, ipopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina, N,N-dimetil-triptamina, plastidesmina, (1H)-4-metoxi-2-quinolone e dictamina. Alguns destes são estruturalmente muito semelhantes à pilocarpina fornecendo bons precedentes para testes farmacológicos. O beneficiamento das folhas do jaborandi para a produção de pilocarpina em escala industrial é feito pela Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda situada em Parnaíba, PI.

Palavras-chave:

Pilocarpina. Alcalóides. *Pilocarpus sp.*

**ABSTRACT**

The genus *Pilocarpus* popularly known as jaborandi presents fourteen alkaloids of which stands out as pilocarpine phytopharmaceuticals used in human and veterinary medicine with functions ranging from the reduction of intraocular pressure through the combat xerostomia by going to the stimulation of intestinal smooth muscle dysfunction relieving such as meteors. Other alkaloids that found in the Jaborandi chemically with some of these even without pharmacological activity are described: isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, ipopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7 (11)-dehidro-pilocarpine, N,N-dimethyl -5-methoxy-tryptamine, N,N-dimethyl-tryptamine, plastidesmina, (1H)-4-methoxy-2-quinolone and dictamnine. Some of these are structurally very similar to pilocarpine providing good precedents for pharmacological tests. The treatment of leaves of jaborandi for the production of pilocarpine on an industrial scale is done by Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda located in Parnaiba, PI.

Key-words:

Pilocarpine. Alkaloids. *Pilocarpus sp.*

O presente artigo de revisão é parte da introdução da dissertação de mestrado da aluna Leiz Maria Costa Vêras Miura. Título da dissertação: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL, ANTI-LEISHMANIA E SIALAGOGA DA EPIISOPILOTURINA.

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Orientadora: Dra. Maria do Carmo de Souza Batista.

Co-orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

## 1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é detentora da maior biodiversidade do planeta, possuindo mais de 55 mil espécies de vegetais e constituindo-se numa vasta fonte de fármacos. A região amazônica, pela sua extensão, é um dos maiores reservatórios brasileiros de espécies de interesse medicinal, porém nas distintas regiões do Brasil, sobretudo no Nordeste, há um grande número de vegetais empregados com essa finalidade pelas comunidades tradicionais (ABIFISA, 2006).

A expressão “planta medicinal” corresponde a toda planta que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica (OMS, 2002). As plantas medicinais são importantes tanto por serem utilizadas como agentes terapêuticos, como por fornecerem matérias-primas para a fabricação de medicamentos fitoterápicos (ZHAN e ZHOU, 2003), que segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), correspondem a todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se, exclusivamente, matérias primas ativas vegetais com a finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário, caracterizada pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade; é o produto final acabado, embalado e rotulado (BRASIL, 1995).

O uso das plantas medicinais remonta ao início dos tempos, sendo que na antiguidade existia apenas o conhecimento empírico e, na atualidade, muitas pesquisas científicas comprovam as propriedades medicinais de vários vegetais (OLIVEIRA, 2006).

## 2. JABORANDI

Dentre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse mundial destacam-se as plantas cujo nome usual são denominadas como jaborandi (*Pilocarpus* sp.) (Figura 1), que é utilizado como matéria prima para isolamento de diversos farmoquímicos.



Figura 1. Planta jovem de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). Foto: David Fernandes Lima

As plantas conhecidas como jaborandi (gênero *Pilocarpus*) possuem como características o fato de serem arbustivas e bastante ramificadas, pertencentes à família Rutaceae, apresentando altura média de 2 m, com folhas compostas medindo cerca de 40 cm quando adulta e folíolos coriáceos, de forma lanceolada (variando com a espécie).

As flores são pequenas e dispostas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso. No Brasil, ocorre principalmente na região Leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste, com distribuição nativa para o Piauí e Maranhão (MARQUES e COSTA, 1994).

Em 1570, Gabriel Soares de Souza, um observador europeu notou que os índios Guaranis usavam a planta para tratar úlceras de boca e também como um antídoto para vários venenos ou toxinas devido à sua propriedade de promover sudorese, micção e salivação. Jaborandi é um bom exemplo de uma planta que fez a transição do uso indígena para ciência moderna (PAIVA, 2008).



A capacidade terapêutica da planta é conhecida há séculos pela tribo indígena Tupi, ao norte do Brasil. Em 1888 um médico britânico relatou caso sobre uma mulher de 65 anos de idade com queixa de boca seca, a mesma foi tratada com tintura de jaborandi via oral e subcutânea (VIVINO et al., 1999) tendo melhora do quadro clínico.

Conhecida por seu intensivo uso na indústria farmacêutica, o jaborandi tem destaque no controle do glaucoma, devido à pilocarpina, alcalóide encontrado em suas folhas, produzir aumento na contração da musculatura lisa e relaxamento de esfíncteres de todo organismo animal (VITAL e ACCO, 2006).

A extração do jaborandi movimenta uma grande massa de recursos nas regiões norte e nordeste do Brasil, sendo que movimentou cerca de 220 toneladas perfazendo aproximadamente R\$ 562.000,00 de um total de R\$ 3,7 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil no ano de 2006 (IBGE, 2006).

### 3. ALCALÓIDES: EXEMPLOS DE MOLÉCULAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS

Alcalóides são substâncias de caráter básico, derivadas principalmente de plantas (mas não somente, podendo também ser encontrados em fungos, bactérias e até mesmo animais) que contêm, em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono, e apresentam grande influência e importância política, econômica e social (HENRIQUES et al., 2000).

A palavra alcalóide deriva do árabe *al-quali* que corresponde ao nome vulgar do vegetal onde a soda foi inicialmente extraída. Este grupo de compostos apresenta difícil definição, devido à grande diversidade de estruturas químicas, propriedades físico-químicas e ações farmacológicas (ROBBERS et al., 1997; HENRIQUES et al., 2000). Existe um consenso entre diversos autores e pesquisadores da área onde os mesmos definem como alcalóides verdadeiros os compostos que possuem um ou mais nitrogênio(s) pertencente a um anel heterocíclico com propriedades básicas que apresentam intensa atividade biológica quando em contato com organismos vivos (COSTA, 1994; ROBBERS et al., 1997; HENRIQUES et al., 2000; LIMA, 2008).

Esta definição exclui os demais compostos nitrogenados como os obtidos por síntese orgânica, aminoácidos, aminas simples, vitaminas, peptídeos, ácidos nucleicos, porfirinas, nucleotídeos e compostos nitro e nitroso (ROBBERS et al., 1997).

Nos últimos cento e cinquenta anos isolaram-se milhares de alcalóides (COSTA, 1994), onde atualmente devido aos avanços das técnicas de avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas (pré-clínica e clínica) foi possível descobrir novas aplicações de alcalóides centenários como no caso da pilocarpina, isolada em 1875 do jaborandi, e utilizado há décadas para o tratamento do glaucoma, sendo hoje utilizada também em casos de xerostomia ou boca seca (LIMA, 2008).

#### 4. PILOCARPINA *VERSUS* GLAUCOMA

Das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) são extraídos os sais de pilocarpina (SANTOS et al., 1988). A pilocarpina é uma amina terciária que apresenta tanto ações muscarínicas quanto nicotínicas, entretanto atua predominantemente em receptores muscarínicos. Possui efeitos discretos sobre o coração e o trato gastrointestinal (VITAL e ACOO, 2006).

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a pilocarpina é o composto (3S,4R)-3-etil-4- [(3-metilimidazol-4-il) metil]oxolan-2-ona (Figura 2). Constituído de uma lactona do ácido pilocárpico que tem como núcleo fundamental um anel imidazólico.

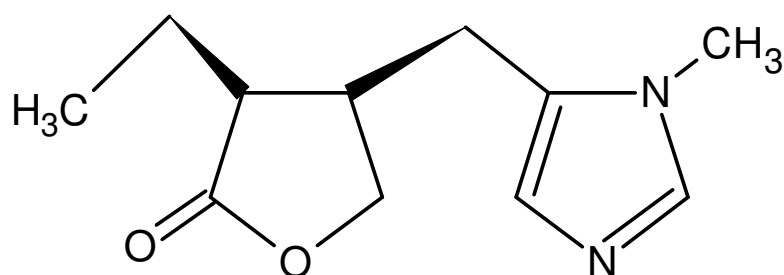


Figura 2 - Estrutura química em projeção de Fischer da pilocarpina (adaptado de DAVIES et. al, 2009)

A pilocarpina é produzida no Brasil, em escala industrial, a partir do *P. microphyllus* Stapf, nativa do Estado do Maranhão e Piauí, mas existem espécies taxonomicamente

relacionadas como a *P. pennatifolius* Lem. As suas folhas contêm pilocarpina e alcalóides secundários, entre os quais a isopilocarpina, esta inativa farmacologicamente. A área de ocorrência de *P. pennatifolius* compreende os estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PINHEIRO, 1997).

O mecanismo de ação da pilocarpina no tratamento do glaucoma está relacionado à ligação reversível do fármaco aos receptores muscarínicos subtipo 3 ( $M_3$ ), funcionando como agonista colinérgico. Estes receptores são metabotrópicos ligados a proteínas G que quando estimulados pela acetilcolina, desencadeia uma cascata intracelular que é responsável pelas respostas conhecidas por “muscarínicas”. A origem deste nome deve-se à muscarina, um fármaco presente no cogumelo *Amanita muscaria* que seletivamente liga-se aos receptores (MARGOTTO, 2007).

Estes receptores M ( $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$ ) são acoplados à proteína  $G_{q/11}$  e sua ativação promove a atividade da fosfolipase C (PLC) e aumento de íons cálcio no espaço intracelular, causando em regra aumento da função do órgão a que estão acoplados, cruciais na ativação de processos como a contração de musculatura lisa (muscarínica) e efeito vasodilatador pela ligação deste agonista colinérgico a receptor específico em células endoteliais (COTTON, 2009).

O paradoxo causado pela vasodilatação mediada por agonistas muscarínicos, contrária à esperada vasoconstrição por ação na musculatura da parede vascular, pode ser explicada pela ação das células endoteliais. A ativação da proteína  $G_q$  induz aumento da concentração de  $Ca^{+2}$ , pelo mesmo mecanismo descrito acima. Na célula endotelial, que não possuiu um mecanismo contráctil, o papel do  $Ca^{+2}$  é ligar à calmodulina (CaM), ativando a sintetase do óxido nítrico (NO). O NO difunde-se facilmente para a musculatura vascular, onde vai induzir uma ativação da guanilciclase e conseqüente aumento da concentração intracelular de GMPc, um potente relaxador da musculatura lisa (ROBERTS-CROWLEY, 2009).

O efeito hipotensor ocular da pilocarpina decorre do fato desse alcalóide colinomimético de ocorrência natural produzir contração do músculo liso do esfíncter da íris (resultando em miose) e do músculo ciliar (resultando em acomodação). Este processo facilita a drenagem do humor aquoso para o canal de Scheleman, que drena a câmara anterior, uma vez que a contração do esfíncter da íris a afasta do ângulo da câmara anterior e a retração do músculo ciliar ocasiona abertura das lâminas da rede trabecular (PAPPANO, 2006; COSTA e NASCIMENTO NETO, 2006).

O somatório dessas ações resulta na ampliação do ângulo de drenagem do humor aquoso, fluido que preenche as câmaras oculares (anterior e posterior), o que é importante para a terapêutica do glaucoma, doença caracterizada pelo aumento da pressão intra-ocular, que provoca lesão no nervo óptico, produzindo cegueira, se não for adequadamente tratada (PETERSEN-JONES, 2001; ANDRADE et al., 2002).

O glaucoma inclui um grupo de condições oculares caracterizado pela perda do campo visual e freqüentemente atribuído a um aumento da pressão intra-ocular, caracterizado como um problema de saúde pública e uma das mais importantes causas de cegueira no Brasil e no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de glaucoma no mundo é estimada em 2,4 milhões de casos por ano, e a prevalência de cegueira por glaucoma é de 5,2 milhões de pessoas, representando a terceira causa de cegueira (SOUZA FILHO et al., 2003).

O glaucoma é visto com maior freqüência em humanos, mas existe também em cães. Em aves é raro, e em répteis e anfíbios ainda não foi relatado. Animais exóticos como coelhos-brancos da Nova Zelândia e *hamsters* russos são verificados com certa freqüência (MONTIANI-FERREIRA, 2007).

Preparados oftálmicos contendo pilocarpina de 1 a 2% constituem-se nos recursos terapêuticos mais efetivos na terapia do glaucoma (ANDRADE et al., 2002). Ao contrário de outras substâncias, a pilocarpina na forma farmacêutica de uso tópico não apresenta efeitos colaterais significativos (TAYLOR e AL-HASHIMI, 1996; SABÁ et al., 2002).

A pilocarpina por se tratar de uma substância estimuladora de receptores colinérgicos e apresenta outras ações: estimulantes de glândulas secretoras, relaxamento de esfíncteres, estimulante dos movimentos peristálticos, dentre outras. Quando os receptores muscarínicos são ativados ocorrem vários eventos celulares, podendo um ou mais deles atuar como segundos mensageiros para a ativação muscarínica (PAPPANO, 2006).

A estimulação das glândulas salivares, pela pilocarpina, induz ao aumento da saliva do tipo serosa. O efeito tem início nos primeiros sessenta minutos a partir da ingestão do medicamento, perdurando por até três horas (BAPTISTA NETO, 2003). Neste caso, estimula também outras glândulas secretoras, como as sudoríparas termorreguladoras, lacrimais e nasofaríngeas, motivo pelo qual também é indicada a pacientes com câncer de boca e pescoço e tratamento de xerostomia (também conhecida como boca seca ou *secura da boca*), muito comum em diabéticos (HAMLAR et al., 1996; WYNN, 1996; PAPPANO, 2006).

Na medicina veterinária, a pilocarpina é também utilizada no tratamento de disfunções gastrointestinais de ruminantes e meteorismo dos equinos (timpatismo agudo ou crônico), objetivando a estimulação da musculatura lisa do trato gastroentérico, a fim de produzir catarse (retirada dos sintomas) (ANDRADE et al., 2002).

## 5. ARSENAL DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS NO JABORANDI

Vários alcalóides já foram identificados a partir do gênero *Pilocarpus* (Figura 3), porém a maioria está, ainda, em fase de testes e/ou ainda não possui aplicação farmacológica conhecida (SANTOS e MORENO, 2004).

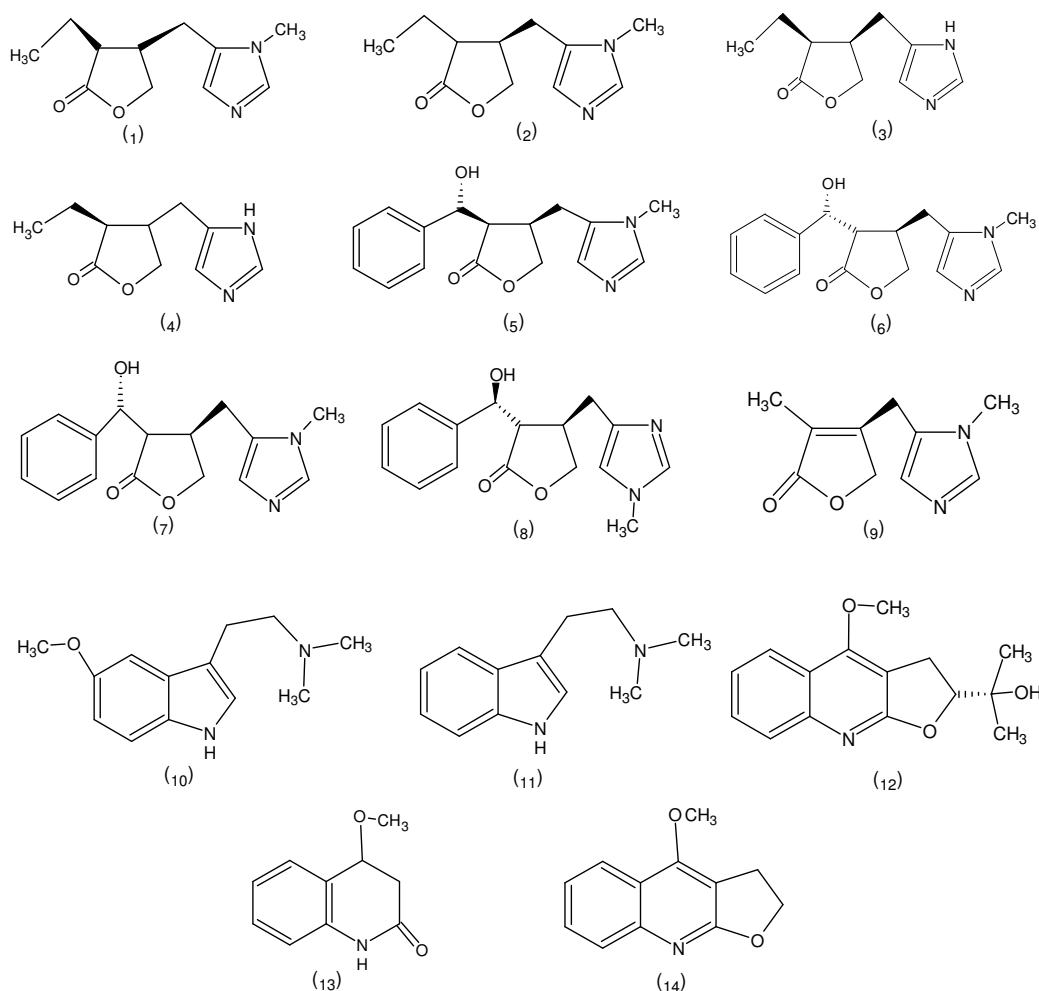


Figura 3. Estrutura dos alcalóides encontradas no gênero *Pilocarpus*: (1) pilocarpina, (2) isopilocarpina, (3) pilocarpidina, (4) isopilocarpidina, (5) pilosina, (6) ipilosina, (7) epiisopilosina, (8) epiisopiloturina, (9) 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina (10) N,N-dimetil-

5-metoxi-triptamina, (11) N,N-dimetil-triptamina, (12) plastidesmina, (13) (1H)-4-metoxi-2-quinolone e (14) dictamina (adaptado SANTOS e MORENO, 2004).

Desde 1876, o jaborandi vem sendo produzido em grandes quantidades para uso no tratamento do glaucoma, e em 1997 foi transformada em especialidade farmacêutica (Salegen) indicada para pacientes com dificuldade de salivar (PAIVA, 2008).

Alguns agentes imidazólicos, identificados a partir do jaborandi, como a isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (ANDRADE-NETO, 1997), já possuem as suas estruturas determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN), porém nenhum deles possui ainda atividade farmacológica descrita, podendo ser promissores para a medicina humana e veterinária (ANDRADE-NETO et al., 1994).

Vários alcalóides azóis e seus derivados, como os identificados no jaborandi, são antimicóticos clássicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e bolores. Esta classe de molécula apresenta um anel imidazólico livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. Atualmente dispõe-se de vários derivados imidazólicos para uso sistêmico ou tópico no tratamento de diversas infecções micóticas, sendo a ação fungistática ou fungicida, dependente da concentração (SANDE e MANDELL, 1987). Recentemente, os triazólicos têm recebido maior destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, ambos com largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos. A freqüente utilização destes medicamentos levou à formação de resistência a algumas leveduras, principalmente por espécies do gênero *Candida* (LACAZ e NEGRO, 1991; ARENAS, 1993; ALVES, et al., 1999).

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da síntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana citoplasmática dos fungos. Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P450 da levedura, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento, originando alterações morfológicas que resultam em morte celular (RICHARDSON e WARNOCK, 1993; ALVES et al., 1999).

## 6. IMPACTOS SOCIAIS

Segundo o Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME) do Instituto de Física da USP (IFSC), o setor produtivo brasileiro que envolve a indústria de produtos farmacêuticos, medicinais e veterinários movimenta anualmente recursos da ordem de US\$ 10 bilhões, sendo hoje a 4<sup>a</sup> indústria farmacêutica mundial em volume de produção, atrás dos Estados Unidos, França e Itália.

Além disso, o mercado mundial da bioindústria, onde a biotecnologia é um instrumento fundamental, movimenta anualmente recursos estimados de 50 a US\$ 100 bilhões. No Brasil, segundo estudo da Associação Brasileira de Bioindústria, os setores que utilizam a biotecnologia abrangem cerca de 5 a 6% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro.

O uso sustentável da biodiversidade, como ocorre no caso do jaborandi para a produção dos sais de pilocarpina, além do impacto para a saúde, pois é utilizado como medicamento para o tratamento de doenças com grande repercussão como o glaucoma e xerostomia, possui impacto sócio-ambiental no que se refere ao extrativismo vegetal. Neste contexto, medidas conservacionistas ligadas ao meio ambiente podem estar consonantes com a geração de empregos e formação de mão-de-obra especializada para o crescimento do setor farmacêutico nacional.

No município de Parnaíba, Piauí, existe uma indústria farmoquímica, que purifica os sais de pilocarpina a partir de folhas de jaborandi, além de comercializar esses fitofármacos para o exterior, possui um departamento de pesquisa e desenvolvimento (P&D) para estudos em parceria com Universidades, onde outras aplicações farmacológicas são prospectadas a partir de subprodutos desta planta medicinal.

O impacto da descoberta de novos alcalóides com atividade farmacológica a partir da biomassa gerada na produção de pilocarpina pode significar avanço para a descoberta de quimioterapia de baixo custo, além de aproveitar de forma mais ecológica e racional, os resíduos da indústria farmacêutica de processamento do jaborandi.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a VEGEFLOA Extrações do Nordeste Ltda. na pessoa de Paulo Robério Pinho pelas informações e sugestões do trabalho e também à Universidade Federal

do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Reis Velloso (CMRV) pelo apoio logístico para a elaboração do trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

ABIFISA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO). **Uma legislação justa para os produtos de origem natural**. 2006. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>>. Acesso em: 21 ago. 2008.

ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; CURY, A. E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar**. 1999. Disponível em: <<http://www.newslab.com.br/antifung.htm>>. Acesso em: 05 abr. 1999.

ANDRADE, S. F.; FANTONI, D.T.; CORATASSI, S.R.G. ; ANDRADE NETO, J.P. Terapêutica do sistema nervoso. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, cap. 17, p. 346-435.

ANDRADE-NETO, M. **Contribuição ao Conhecimento Químico de *Pilocarpus* spp.** Tese (Doutorado em Química Orgânica). 1997. Programa de Pós-graduação em Química Orgânica – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Ceará, 1997.

ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; GAMBARDELA, M. T. P.; SANTOS, R. H. A. 24-methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 739-743, 1994.

ARENAS, R. **Micologia medica ilustrada**. México: Nueva editorial interamericana, 1993. Cap. 34.: Antimicóticos; p.359-376.

BAPTISTA NETO, C. **Avaliação do uso da pilocarpina em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço para controle da xerostomia**. 2003. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) – Programa de Pós-graduação em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, fo-usp, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria n. 6 de 31 de janeiro de 1995**. Diário Oficial da União de 31 de Janeiro de 1995. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 21ago.2008.

CEZÁRIO, R.C.; RIBAS, R.M.; ABDALLAH, V.O.S.; CARNEIRO, C.L.; GONTIJO FILHO, P.P. Infection and colonization by Gram-negative bacilli in neonates hospitalized in High Risk Nursery at Uberlândia Federal University Hospital: etiology, resistant phenotypes and risk factors. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.35, p. 193-198. 2004.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 2 v. cap. 4, p. 370-722.



COSTA, M. C. B.; NASCIMENTO NETO, O. C. Aspectos básicos da farmacoterapia ocular. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1190 – 1201.

COTTON, M.; CLAING A. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. **Cellular Signalling**. vol. 21, feb. 2009.

DAVIES, S.G., ROBERTS, P.M., STEPHENSON, P.T., THOMSON, J.E. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosinine. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p.3509–3512. 2009.

HAMLAR, D. D. et al. Determination of the efficacy of topical oral pilocarpine for postradiation xerostomia in patients with head and neck carcinoma. **Laryngoscope**, v. 106, n. 8, p. 972-976, 1996.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.RH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTEZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: UFSC, 2000. 641-656.

IBGE, **Prod. Extr. veg. e Silvíc.**, Rio de Janeiro, v. 21, p.1-45, 2006.

LACAZ, C. S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo : Savier, 1991. p.616-651.

LIMA, D. F. **Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos**. 2008. 56 f. Monografia (Especialização em Plantas Mediciniais) – Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MARGOTTO, Paulo R. **Uso do curare na UTI neonatal**. Brasília, out. de 2007. Disponível em: [www.paulomargotto.com.br/documentos/Curare\\_UTI\\_Neo.doc](http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curare_UTI_Neo.doc). Acesso em: 05 de jun. 2009.

MARQUES, M. E. T.; COSTA, J. P. C. **Jaborandi** (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1994. 4 p.

MONTIANI-FERREIA, F. Oftalmologia. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAZ, J. L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

OLIVEIRA, A.; LONGHI, J.; ANDRADE, C.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M. A. Normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 2, 2006.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005**. Ginebra, 2002. 66 p.

PAIVA, P. **Extrato de Jaborandi.** Disponível em: [www.peterpaiva.com.br/extratos/extrato\\_jaborandi/extrato\\_jaborandi.php](http://www.peterpaiva.com.br/extratos/extrato_jaborandi/extrato_jaborandi.php) Acesso em: 12 set. 2008.

PAPPANO, A.J. Drogas ativadoras dos receptores colinérgicos e inibidores da colinesterase. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 7, p. 79-90.

PETERSEN-JONES, S. M. Ofalmopatias. In: DUNN, JK. Tratado de Medicina de Pequenos Animis. São Paulo: Rocca, 2001, Cap. 46, p. 814-863.

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

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection – Diagnosis and management.** London: Blackwell, 1993. p.17-43.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia.** Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: Ed. Premier, 1997. p. 163-208. Título original: Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology.

ROBERTS-CROWLEY, M. L; MITRA-GANGULI, T.; RITTENHOUSE, A. R., Regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by lipids. **Cell Calcium**, v.45, p. 589-601. 2009.

SABÁ, R. T; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.106-109, março 2002.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.799-807.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n. 2, p. 115 – 137. 2004.

SANTOS, J. H. R.; GADELHA, J. W. R.; CARVALHO, M. L.; PIMENTEL, J. V. F.; JÚLIO, P. V. M. **Controle alternativo de pragas e doenças.** Fortaleza: EUFC, 1988. 216 p.

SOUZA FILHO, J. P.; DIAS, A. B. T.; LIMA FILHO, A. A. S.; SARTORI, M. F.; MARTINS, M. C. A evolução do mercado farmacêutico brasileiro no tratamento do glaucoma nos últimos 30 anos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 811-817. 2003.

TAYLOR S. E., AL-HASHIMI, I. Pilocarpine, an old drug; a new formulation. **Texas Dental Journal**, v. 113, p. 9-13. 1996.

VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 67-79 p, 2006.

VIVINO FB, AL-HASHIMI I, KHAN Z, LEVEQUE FG, SALISBURY PL 3RD, TRAN-JOHNSON TK, MUSCOPLAT CC, TRIVEDI M, GOLDLUST B, GALLAGHER SC. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome. **Archives of internal medicine**, v. 159, p. 174-181. 1999.

WYNN R. L. Oral pilocarpine (salagen): a recently approved salivary stimulant. **General dentistry**, v. 44, p. 29-30. 1996.

ZHAN, J., ZHOU, P.A. Simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. **Toxicology**, v.186, p.119-123, 2003.



## ANEXO I

**Diretrizes para Autores****Da Estrutura dos Textos****a) ARTIGOS E ENSAIOS**

Os artigos e ensaios devem ser apresentados em conformidade com as seguintes normas da Associação Brasileira de

Normas Técnicas (ABNT):

- a) Apresentação de Artigos em Publicações Periódicas, NBR 6022/03;
- b) Resumos, NBR 6028/03
- c) Referências, NBR 6023/02;
- d) Citações, NBR 10520/02;
- e) Numeração Progressiva das Seções de um Documento, NBR 6024/03.

A apresentação dos textos deve obedecer a seguinte ordem:

**1 Elementos Pré-Textuais:****1.1 Folha de rosto identificada**

- Título em português, e em língua estrangeira (inglês, francês ou espanhol).
- Nome do(s) autor(es).
- Afiliação institucional do(s) autor(es) (formação profissional, cargo/função, titulação),
- Endereço completo do(s) autor(s) para correspondência com o Conselho Editorial (incluir CEP, telefone, fax e e-mail).

**1.2 Folha de rosto sem identificação**

- Título do artigo ou ensaio em português e na língua estrangeira.
- Resumo informativo em língua portuguesa, contendo de 100 a 250 palavras, indicando ao leitor finalidades, metodologia, resultados e conclusões do artigo, de tal forma que possa dispensar a consulta ao original. Deve ser constituído de uma seqüência de frases concisas e objetivas.
- Três palavras-chave em português, separadas entre si por ponto, representando o conteúdo do texto.
- Versão do resumo e das palavras-chave na língua estrangeira. Deve ser fiel ao original em português.

**2 Elementos Textuais:****2.1 Corpo do Texto**

Esta parte deve estar constituída de introdução, desenvolvimento e conclusão.

As palavras Figura, Tabela, Anexo que aparecerem no texto devem, sempre, ser escritas com a primeira letra em maiúscula

e vir acompanhadas do número (Figuras e Tabelas) ou letra (Anexos) respectivos ao qual se referem. No caso de se utilizar tabelas e figuras de outra autoria mencionar a fonte abaixo da mesma. A utilização de expressões como “a Tabela acima”

ou a “Figura abaixo” não devem ser utilizadas porque no processo de editoração a localização das mesmas pode ser

alterada. Os manuscritos nas demais categorias editoriais deverão apresentar títulos e subtítulos de acordo com o caso.

No corpo do trabalho deve-se aplicar a legenda e o crédito de cada imagem na posição sugerida para aplicação, precedendo a palavra Figura, a numeração seriada e dois pontos. Ex.: Figura 3: Mona Lisa, 1506, Leonardo da Vinci

(Louvre, Paris). Os arquivos de imagens devem ter o mesmo nome utilizado para o texto, seguido da abreviação -fig e o

número correspondente (Ex.: maria-fig4.tif).

As tabelas devem ser apresentadas segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Normas de

Apresentação Tabular, 1993. Toda tabela tem por finalidade a síntese de dados numéricos, para informar a quantificação de

um fato específico observado de um modo geral com tratamento estatístico. Deve conter um título indicando a natureza e abrangências geográfica e temporal dos dados numéricos, sem abreviações, por extenso, de forma clara e concisa. Deve ter um número (algarismos arábicos, crescente) sempre que o documento apresentar duas ou mais tabelas. Deve ter no mínimo três traços horizontais paralelos e ser produzidos em preto e branco, em tamanho máximo de 14 x 21 cm. A moldura não deve ter traços verticais que a delimitem à esquerda e à direita. Recomenda-se que seja elaborada de forma a ser apresentada em uma única página e que apresente uniformidade gráfica (fonte, corpo, uso de maiúsculas e minúsculas). A formatação dos quadros, que tem por finalidade a síntese de elementos textuais, exige limitação externa por uma moldura, podendo ser utilizadas linhas e/ou colunas. O título deve estar localizado na sua parte superior. O título do quadro bem como a sua legenda (se houver) devem ser digitados em fonte Times New Roman, corpo 10. Sugere-se que os quadros sejam organizados utilizando-se o Menu Tabela do editor de texto Word. Os quadros devem ser encaminhados, ao final do trabalho, em folha à parte com suas respectivas numerações, em ordem de citação no texto, constituindo lista independente. Recomenda-se que seja elaborada de forma a ser apresentada em uma única página e que apresente uniformidade gráfica (fonte, corpo, uso de maiúsculas e minúsculas). As imagens digitais, além de estarem inseridas no texto (.doc ou .rtf) serão encaminhadas em separado (como documentos suplementares). Especificações: resolução de 400 dpi, até 18 x 24 cm, gerados em programas de imagem (corel draw ou photoshop) ou arquivo TIFF ou JPEG, preto e branco ou tons de cinza. As legendas ou títulos devem acompanhar as imagens inseridas no corpo do texto. As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) serão consideradas figuras. Devem ser numeradas, consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Os trabalhos devem ser digitados no Programa Word (versão 6.0, no mínimo), em fonte Times New Roman, corpo 12, espaço entre linhas 1,5, margens superior e esquerda 3 cm, margens inferior e direita 2 cm, alinhamento justificado, com páginas numeradas consecutivamente, em algarismos arábicos, no canto superior direito da página. O tamanho final do texto, incluindo referências, deve ter até 35.000 caracteres (com espaço), no máximo. Sugere-se que o número total de páginas não ultrapasse 17, incluindo figuras, tabelas, gráficos e referências bibliográficas. A página de entrada do artigo, com elementos pré-textuais incluídos, conta à parte. O itálico no corpo do texto deve ser usado somente para estrangeirismos e títulos de obras (livros, filmes, poemas, etc.). Com exceção do título do artigo, não há palavra em negrito no projeto gráfico da revista. Destaques de palavras ou expressões deve ser sempre entre aspas e não itálico ou negrito. O sistema de chamada das citações deve ser o alfabético (autor/data). As citações devem ser indicadas no texto, informando o sobrenome do autor citado, em caixa alta dentro de parênteses ou caixa alta e baixa quando fizerem parte do texto, o ano e a página onde se encontra a informação na obra consultada. Citações no corpo do texto (até três linhas): sem itálico (bold) e aspeadas. Após a citação indicar, entre parênteses, sobrenome do autor em maiúsculo; ano da publicação seguido da página, separadas por hífen quando indicado continuidade de páginas. Recomenda-se ponderação no uso de citações de modo a não violar leis de direitos autorais.

Ex.: (BRANDÃO, 2002, p. 38); (BRANDÃO, 2002, p.38-39)

Citação fora do texto (mais de três linhas): corpo 10, sem aspas, espaço simples, margem esquerda recuada 4 cm, obedecendo ao alinhamento do parágrafo. Observar: se for continuação da frase, iniciar citação com reticências entre colchetes e letra minúscula; se for início de frase, usar maiúscula. No final da citação, indicar a referência tal como citada no item anterior.

Os intertítulos para separação do assunto ao longo do texto devem ser numerados e escritos em vernáculo (caixa alta).

Notas de rodapé devem ser evitadas sempre que possível e deverão se restringir a comentários estritamente necessários

ao desenvolvimento da exposição. O texto da nota não deve exceder cinco linhas.

### **3 Elementos Pós-Textuais:**

A lista de referências bibliográficas deve ser ordenada alfabeticamente, segundo a autoria dos documentos.

As referências devem ser relacionadas em lista própria, constando todas as fontes citadas no artigo,

obedecendo a uma

ordem alfabética única de sobrenome de autor e título para todo o tipo de material consultado, resguardando as exceções

por entradas pela obra (textos sem autoria) e pelo local (legislação), obedecendo a NBR 6023/02. Trabalhos com o mesmo

autor(es) e mesma data devem ser distinguidos por letras minúsculas logo após a data.

Para a melhor compreensão e visualização, a seguir são transcritos exemplos de referências de diversos tipos de materiais.

Livros com 1 autor:

AUTOR (SOBRENOME, Nome). Título. Edição. Local: Editora, data.

Livros com 2 autores:

AUTORES (SOBRENOME, Nome) separados por ponto e vírgula. Título. Edição. Local: Editora, data.

Livros com 3 autores:

Dar entrada pelos três autores (SOBRENOME, Nome), separados por ponto e vírgula. Título. Local: Editora, data.

Livros com mais de 3 autores:

Entrada pelo nome do primeiro autor (SOBRENOME, Nome), seguido da expressão et al. Título. Local: Editora, data.

Livros com organizadores, coordenadores:

(SOBRENOME, Nome) seguido da definição (Org.) ou (Coord.). Título. Local: Editora, data.

Partes de livros com autoria própria:

AUTOR da parte referenciada (SOBRENOME, Nome). Título da parte referenciada. Referência da publicação no todo

precedida de In: Localização da parte referenciada.

Dissertações, teses, trabalhos de conclusão de curso:

AUTOR (SOBRENOME, Nome). Título. Data. Quantidade de folhas. Tipo do documento (dissertação, tese, trabalho de

conclusão de curso), grau entre parênteses (Mestrado, Doutorado, Especialização em...) - vinculação acadêmica, o local e a

data da defesa, mencionada na folha de aprovação se houver.

Eventos no todo (Congressos, Jornadas, Encontros, Simpósios):

TÍTULO DO EVENTO, Número do evento, Data do evento, Local do evento. Título do documento. Local: Editora, data.

Paginação.

Trabalhos de eventos:

AUTOR (SOBRENOME, Nome). Título do trabalho de evento: subtítulo do trabalho de evento (se houver).

Referência da

publicação no todo precedida de In: localização da parte referenciada (Anais, atas, tópicos). Local, editora, data de

publicação e localização da parte referenciada.

Revistas/periódicos no todo:

TÍTULO do periódico. Local: Editora, data inicial. Periodicidade.

Revistas/periódicos, suplementos, números especiais:

TÍTULO do periódico. Título do fascículo, suplemento se houver. Local: Editora, v., n., data e paginação total do fascículo.

Nota.

Artigos de revistas/periódicos:

AUTOR do artigo (SOBRENOME, Nome). Título do artigo. Título da revista, local, v., n., páginas, mês, ano.

Artigos de jornais:

AUTOR do artigo (SOBRENOME, Nome). Título do artigo. Título do jornal, local, data (dia, mês e ano).

Caderno.

Imagem em movimento:

TÍTULO (primeira palavra em maiúsculo). Subtítulo. Responsável. Local, Produtora, Distribuidora, data.

Especificação do

suporte em unidades físicas, som, cor. Largura em milímetros. Título original. Legenda.

Leis, decretos, portarias, etc.:

NOME DO LOCAL (país, estado ou cidade). Título (especificação da legislação, n.º e data). Indicação da publicação oficial.

Palestras, debates, comunicações, entrevistas:

NOME DO PALESTRANTE, ENTREVISTADO, etc. Título da palestra. Local, data. Nota.

Pré-impresões, trabalhos escritos mas não publicados ou em fase de elaboração, notas de aulas, etc.

Deve ser mencionado o fato indicando-se também os dados bibliográficos disponíveis:

AUTOR (SOBRENOME, Nome). Título do trabalho. Nome da instituição, local, data. Nota.

Programas de rádio/televisão:

TÍTULO. Apresentador. Local: Emissora, data (dia, mês e ano), horário. Duração. Entrevistado.

Relatórios:

NOME DA INSTITUIÇÃO. Título do relatório. Local, data, paginação.

Documentos eletrônicos online:

AUTOR (SOBRENOME, Nome). Título. Local, data. Disponível em: < >. Acesso em: dd mm aaaa. Abreviar o mês a partir da

terceira letra com exceção do mês de maio que deve ser colocado na íntegra.

#### **b) RESENHAS**

As resenhas deverão ter dimensão variável entre três e cinco páginas (4.200 a 7.000 mil caracteres), contendo o registro e

a crítica de obras, livros, teses, monografias etc., publicadas recentemente, sendo que os textos incluídos nesta categoria

também devem respeitar os padrões acima. As resenhas serão avaliadas pelo Conselho Editorial. As resenhas bibliográficas devem conter as referências completas das obras analisadas, indicando seu número de páginas e ISBN. O

título da resenha deve ser diferente do título da obra resenhada. Solicita-se que a resenha seja acompanhada de um

exemplar da obra ou de imagem digitalizada da capa em formato TIFF ou JPG, para publicação, de acordo com as

possibilidades de editoração.

#### **c) TRADUÇÕES**

Traduções inéditas de artigos não disponíveis em português são aceitas para publicação, desde que se obtenha a devida

autorização para publicação junto aos detentores dos direitos autorais e siga as mesmas orientações de formatação

exigidas para os artigos.

#### **d) ENTREVISTAS**

As entrevistas deverão ser inéditas e focar depoimentos de pessoas cujas histórias de vida ou realizações profissionais

sejam relevantes para as áreas de abrangência da revista. Sua dimensão deve variar entre 15.000 e 25.000 caracteres,

incluindo referências bibliográficas e notas. A decisão sobre a publicação de entrevistas compete ao Conselho Editorial e

responde a critérios de relevância, atualidade e pertinência para a revista.



## ANEXO II

### ACTA TROPICA - Guide for Authors

*Acta Tropica* publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

#### Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/actrop>.

Please suggest 4-6 potential reviewers for your submission, providing contact details and specific reasons for your suggestions.

Please note that the journal may not use your suggestions, but your help is appreciated and may speed up the selection of appropriate reviewers.

#### Journal Scope

The content of papers submitted must fall within the [Journal's Scope](#). Manuscripts based on parasite/microbe or vector inhibition experiments with crude extracts or fractions, where the active ingredients are not defined, will normally not be accepted.

Original papers should be organized as follows: Abstract - Key words - Introduction - Material (or Patients) and Methods - Results - Discussion Acknowledgements - References.

(a) Manuscripts should be complete in all respects and be type written **with double spacing and wide margins**. The metric system is to be used throughout.

(b) Manuscripts must be checked carefully before submission. No changes will be allowed at the proof stage.

(c) The title page should include: title, the names, affiliations and complete postal addresses of all authors. One corresponding author is to be designated, with a telephone and e-mail address.

(d) An abstract, of not more than 5% of the length of the article, should be provided.

(e) Keywords (indexing terms), normally 3-6 items, should be provided.

**References** should be assembled alphabetically on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System), the year being placed in parentheses, e.g., (Jones, 1970). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should be in accordance with the following examples.

Musaka, R.A., Nayambati, V.M., Nantulya, V.M., Majiwa, P.A.O., Molloo, S.K., Musoke, A.J., 1988. The chromosome profiles of *Trypanosoma congolense* isolates from Kilifi, Kenya and their relationship to serodeme identity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 105-112.

Garcia, L.S., Bruckner, D.A., 1988. *Diagnostic Medical Parasitology. Histological Identification of Parasites.* Elsevier Sci. Publ. Co. Inc., New York, NY, pp. 326-334.

Scorza, J.V., Medina, R., Pérez, H., Hernández, A.G., 1985. Leishmaniasis in Venezuela. In: K.-P. Chang and R.S. Bray (Eds.), *Human Parasitic Diseases, Vol. 1, Leishmaniasis,* Elsevier, Amsterdam, pp. 283-296.

Journal titles should be abbreviated according to the *List of Serial Title Word Abbreviations* (available from International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8). References concerning unpublished data should not be cited in the reference list; work accepted for publication should be referred to as *in press*. Incomplete references can result in publication delay.

**Artwork.** Full details for electronic submission of artwork can be obtained from <http://authors.elsevier.com>.

#### **Instructions for authors regarding GenBank/DNA sequence linking**

DNA sequences and GenBank Accession numbers Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048M**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**").

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).


Example 2: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**").

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**").

Submission of a paper to *Acta Tropica*, including a revised version, implies the transfer of copyright from the author(s) to the publisher and therefore that the corresponding author has obtained the approval of all other authors to the text and that it does not contain information previously published (except as a meeting abstract or by submission of sequence data to an electronic database) and is not under consideration for publication elsewhere. Publication in *Acta Tropica* is taken to imply the authors'

willingness to comply with reasonable requests to supply reagents such as recombinant clones and monoclonal antibodies, and sequence data in electronic form to persons lacking access to computer databases.


Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding authors confirming receipt of the manuscript together with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (  <http://www.elsevier.com/locate/permissions> ).

Manuscripts returned for revision should be returned to the editor within 3 months.

**Page charges.** There will be no page charges.

**Proofs.** One set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned to the Publisher within 3 days of receipt. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a 'watermarked' version of the published article and includes a coversheet with the journal cover image and a disclaimer outlining terms and conditions of use. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

**Author enquiries:** Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature at  <http://www.elsevier.com/trackarticle>.

**Authors in Japan please note:** Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106; Tel. (03)-5561-5032; Fax: (03)-5561-5045.