

PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTI-LEISHMANIA DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA

Marianne Morais Vieira (Bolsista PIBITI/CNPq), Leiz Maria Costa Veras Miura (Colaboradora, BIOTEC/UFPI, José Roberto de Souza Almeida Leite, (Orientador, UFPI/CMRV).

INTRODUÇÃO. O uso das plantas medicinais anda de mãos dadas com o desenvolvimento da humanidade, sendo que na antiguidade existia apenas o conhecimento empírico e, na atualidade, muitas pesquisas científicas comprovam as propriedades medicinais de vários vegetais (OLIVEIRA, 2006). Dentre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse mundial destaca-se o jaborandi (*Pilocarpus sp.*) que é utilizado como matéria prima para isolamento de diversos farmoquímicos (Santos et al., 1988).

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) é uma planta arbustiva e bastante ramificada pertencente à família *Rutaceae*. No Brasil, ocorre principalmente na região Leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste (Marques & Costa, 1994). A partir dessa espécie já foram identificadas as estruturas dos seguintes alcalóides: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7(11)-dehidropilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina, N,N-dimetiltriptamina, plastidesmina, (1H)-4-metoxi-2-quinolone e dictamina (SANTOS e MORENO, 2004).

Com o conhecimento prévio de que o alcalóide epiisopiloturina é o de maior concentração na biomassa do jaborandi logo após a extração de pilocarpina e considerando ser missão das Instituições de Estudo e Pesquisa realizarem estudos, possibilitando desenvolvimento para a sociedade, foi firmada uma parceria entre a Universidade Federal do Piauí e a empresa VEGEFLOA Extrações do Nordeste LTDA. Assim, o projeto visa ampliar o estudo sobre os compostos químicos oriundos da biomassa resultante do processamento do jaborandi, isolando o alcalóide em estudo, epiisopiloturina, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e dessa forma, buscando o conhecimento sobre a função e a utilidade de toneladas de resíduos gerados, através da

O projeto objetiva-se a purificação do alcalóide epiisopiloturina, encontrada no resíduo industrial da produção de pilocarpina e a investigação da atividade farmacológica e o uso de processos de obtenção dos princípios ativos que permitem melhor aproveitamento dos recursos naturais e seus subprodutos, tendo suporte em fontes sustentáveis com mínimo impacto ao meio ambiente, mas com grande impacto econômico e social para a região onde a empresa está inserida.

METODOLOGIA. A biomassa foi submetida a um processo de extração de alcalóides baseado na acidificação e filtragem de resíduo industrial seguida de alcalinização e filtragem da solução para obtenção do alcalóide epiisopiloturina concentrado. A biomassa foi diluída a 5%, filtrada em sistemas com diâmetro de 0,45 µm e colocado em tubos de plásticos de 1,5 mL no rack autosample (Autosample SIL-10AF). Em seguida a solução foi injetada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Prominence, AUTOSAMPLE SIL-10AF, CTO-20A, LC-6AD, CBM-20A). A coluna usada foi LiChrospher 60 RP Select B (5 µm) – Merck, como fase móvel. O eluente utilizado foi o

fosfato de potássio (K₃PO₄) a 5% com pH 2,5. O fluxo foi ajustado para 1 mL/min a 50°C. O comprimento de onda usado pelo detector do HPLC foi ajustado para 216 nm.

As cepas utilizadas foram do gênero *Candida* desenvolvidas em meio inclinado Sabouraud (Merck), por 48 horas, a 25°C. Após este período, foi realizado um repique para caldo Sabouraud (Merck) e incubado nas mesmas condições. A partir desta suspensão os inóculos foram preparados nas concentrações de 1% (v/v) para as soluções extrativas e 1 a 4% (v/v) para o alcalóide. A preparação das placas e distribuição das amostras foi realizada conforme descrito pelo método do NCCLS. O padrão utilizado foi nistatina, nas concentrações de 0,3 mg/mL para os discos, e 0,03 mg/mL para os cilindros e as placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi possível isolar mais de 100 mg do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa gerada do resíduo industrial da pilocarpina. O alcalóide isolado teve sua massa molecular confirmada por espectrometria de massa ($[M+H]^+ = 287,061$ Da). (**Figura 1**). Foram testados *in vitro*, atividade antifúngica contra as leveduras *Candida albicans* ATCC 1023, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ct - cepa de campo, *Candida tropicalis* ATCC 157, *Candida glabrata* ATCC 30070, *Candida dubliniensis* ATCC 778157, *Candida dubliniensis* ATCC 777 e *Candida parapsilosis* - ATCC 22019) não interferindo com o desenvolvimento microbiano nas concentrações até 1 mg/mL. As amostras foram diluídas em DMSO/água esterilizada (5:95, v/v).

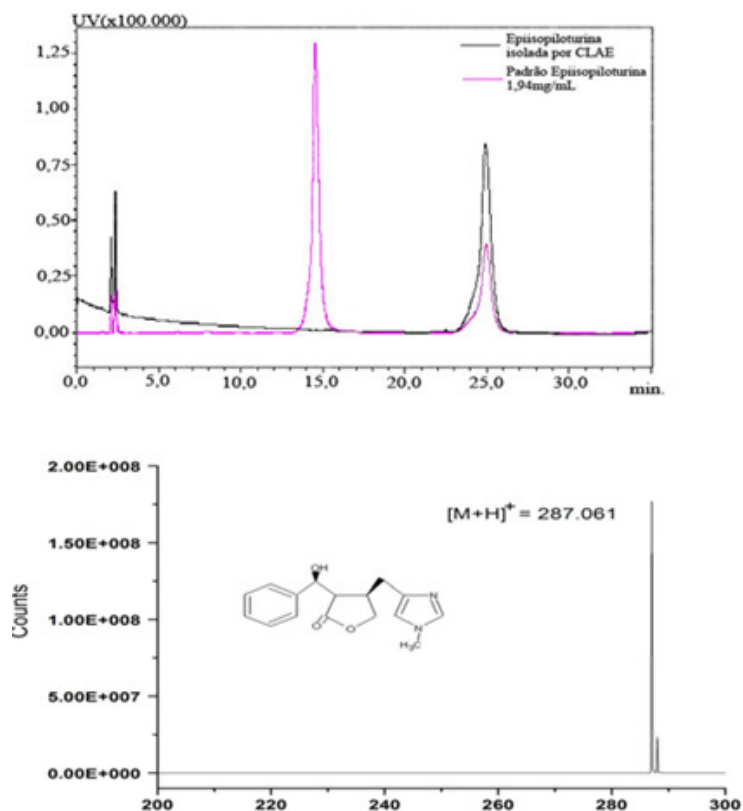


Figura 1. (1) Cromatografia líquida de alta eficiência dos padrões e alcalóide industrial purificado por HPLC. (2) Análise por espectrometria de massa ESI⁺ do alcalóide epiisopiloturina ($[M + H]^+ = 287,061$). Estes dados confirmam a pureza e a estrutura molecular.

CONCLUSÃO. O grande interesse do projeto foi o aproveitamento dos resíduos industriais como uma forma de reduzir o impacto ambiental, eliminando toneladas desses produtos que poluem o ambiente e na busca de aplicações tecnológicas de subprodutos da extração de pilocarpina, oferecendo assim um impacto de inovação tecnológica regional em parceria pública privada (PPP). Pois embora não houve atividade antifúngica comprovada para as espécies testadas, houve atividade contra formas amastigotas de *L. amazonensis in vitro* permitindo que possa em futuro próximo outros projetos relacionados para aprimoramentos e avaliações de novos estudos nesta área. **APOIO.** VEGEFLOTA Extrações do Nordeste LTDA, CNPq (pela bolsa concedida através do programa PIBIT).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aquino Neto, Francisco Radler, Denise da Silva e Souza Nunes. Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

BAPTISTA NETO, C. SUGAYA, N.N. Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região da cabeça e do pescoço. Revista Biociência, Taubaté, v. 10, n.3, p. 147-151, jul./set. 2004.

MIURA, L.M.C.V. Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga, 2009.

RANG, H.P; DALE, MM. Farmacologia. 6 ed. Rio de Janeiro:ELSERVIER, 2003.

Palavras chave: Epiisopiloturina; anti-fúngico; jaborandi.