

## DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS NANOESTRUTURADOS COMO ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE ALCALÓIDES DA CADEIA PRODUTIVA DO JABORANDI

Maria Adelaide Guimarães (bolsista do PIBITI/CNPq), Leiz Maria Costa Veras (colaboradora, UFPI), David Fernandes Lima (colaborador, Anidro do Brasil Extrações S.A.), José Roberto de Souza de Almeida Leite (Orientador, BIOTEC-UFPI)

### Introdução:

Os alcalóides são um dos produtos naturais que já fornecem muitos medicamentos para uso humano. São substâncias de caráter básico que contém nitrogênio na sua composição, derivado de uma variedade de fontes, incluindo microorganismos, organismos marinhos e plantas. Pode existir no estado livre nas plantas, bem como na forma de sais ou óxidos. Eles podem ser usados em uma vasta gama de ações terapêuticas como agentes anticancerígenos, antimaláricos, analgésicos, no tratamento da hipertensão parkinsoniana e desordens do sistema nervoso central. As folhas de *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi) apresentam um certo conteúdo de pilocarpina, este alcaloide é o agente mais concentrado nas folhas da planta. O alcalóide é uma amina terciária que estimula diretamente os receptores colinérgicos e apresenta ações muscarínicas. Além deste, vários outros alcaloides já foram identificados a partir do gênero *Pilocarpus*, porém a maioria está, ainda, em fase de testes e/ou ainda não possui aplicação farmacológica conhecida. Alguns alcalóides imidazóis, identificados a partir da espécie *Pilocarpus microphyllus*, como a isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina, já possuem as suas estruturas determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN), porém nenhum deles possui ainda atividade farmacológica descrita, podendo ser promissores em várias áreas da medicina.

A epiisopiloturina é um alcalóide que apresenta um grupo hidrobenzílico e um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico através de uma ligação C-C. Suas propriedades biológicas ainda são desconhecidas, mas recentemente este alcaloide foi isolado das folhas de *P. microphyllus* e mostrou ter atividade contra *S. mansoni* adulto, esses resultados geraram uma patente com o governo Brasileiro junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

O uso de materiais biológicos tais como, extratos de plantas, gomas, leveduras, fungos, bactérias e borrachas, tem sido investigado na síntese de nanopartículas metálicas atuando tanto como agentes redutores e/ou agentes estabilizantes destes sistemas. Utilizar materiais biológicos em substituição a reagentes severos, empregados na síntese de nanopartículas, surge como tentativa de encontrar condições mais amenas que viabilizem sua utilização em aplicações biológicas, neste caso características como biocompatibilidade, diminuição da toxicidade das nanopartículas além de baixo custo de produção têm sido investigados e dentro deste contexto, tais sínteses vêm sendo denominadas de "síntese verde". A "síntese verde" de nanopartículas pode ser uma opção para intercalação de drogas, a fim de diminuir a toxicidade do fármaco utilizado e diminuir os efeitos colaterais. Durante as duas últimas décadas, a infecção fúngica tornou-se uma complicação importante e uma das principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos. Os agentes antifúngicos comuns atualmente utilizado na quimioterapia antifúngica são azóis (tais como fluconazol, cetoconazol e itraconazol). Mas tanto a frequência de infecções fúngicas invasivas (IFI) quanto a resistência à terapia antifúngica continuam a aumentar

apesar da introdução de novos agentes antifúngicos, demonstrando a necessidade de testes com novas drogas antifúngicas.

#### **Metodologia:**

O alcalóide epiisopiloturina foi extraído da planta *Pilocarpus microphyllus* e o isolamento e purificação do alcalóide foi realizado por cromatografia líquida preparativa de alta eficiência. Foram preparadas soluções de Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) 1mM da marca Sigma-Aldrich com teor de 99,8% e solução estoque de goma 0,5% m/v, solubilizada sob agitação por 12 h e posteriormente filtrada em papel filtro qualitativo tipo 15,0Ø Qualy®. Para a caracterização da síntese, foram realizadas diluições aquosas a partir da solução estoque de goma, nas concentrações finais de 0,4%; 0,3%; 0,2% e 0,1%.

As sínteses foram realizadas em um reator de vidro aberto sob agitação magnética e na temperatura, controlada por banho-maria, de 75 °C +/- 5, a partir da solução de  $\text{AgNO}_3$  na presença de 1 das 5 concentrações de goma preparadas, na proporção 1:1 v/v. As reações tiveram 60 ou 100 minutos de duração.

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:**

O presente trabalho apresenta um método que permite a extração e isolamento do alcalóide EPI a partir de resíduos industriais químicos de purificação de pilocarpina pela Anidro do Brasil. Os métodos de separação utilizados foram bem sucedidos, antes do HPLC a amostra continha sais e outras impurezas e depois do processo de purificação cristais livres de epiisopiloturina com 98% de pureza foram obtidos.

A síntese de nanopartícula de prata foi diretamente dependente do tempo de reação e das concentrações dos reagentes envolvidos; o tempo de reação exigido para a formação de uma quantidade expressiva de AgNP é curto se comparado a outras rotas se sínteses verdes já descritas, sendo o período de 60 min o tempo ideal a formação das AgNPs-Caju propostas neste trabalho. Uma análise comparativa dos espectros revelou que o aumento na concentração de goma do caju não influenciou na interação deste com as nanopartículas, já que se observou apenas um aumento relativo na intensidade dos picos. No entanto, os espectros da goma do cajueiro com nanopartículas apresentaram uma nítida alteração na região abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  se comparados com o espectro da goma pura, o que sugere que a interação entre as nanopartículas e a goma ocorra principalmente por meio dos grupamentos OH, já que as bandas em  $777\text{ cm}^{-1}$  e  $646\text{ cm}^{-1}$  correspondem a deformação fora do plano destes grupos.

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) foram testadas e o alcalóide epiisopiloturina não interferiu com o desenvolvimento microbiano na concentração de 1 mg/mL.

**Conclusão:**

O presente trabalho encontra-se nos campos da nanotecnologia e biotecnologia e refere-se à síntese verde por redução química em via úmida de nanopartículas metálicas, em especial nanopartículas de prata (AgNP), reduzidas e estabilizadas por uma goma natural, sendo esta isolada e purificada a partir de exsudatos do cajueiro (*Anacardium* sp.). Este novo nanomaterial pode apresentar atividade antimicrobiana contra várias bactérias patogênicas de importância na indústria farmacêutica, alimentícia e/ou cosmética e atividade antifúngica quando alcalóides imidazólicos são incorporados nessa estrutura, podendo ser utilizada como conservante e outros derivados biocidas.

Os resultados antifúngicos apresentados aqui foram testes preliminares, novos testes serão realizados e apresentados no seminário de iniciação científica.

**Apoio:** Programa PIBITI/CNPq, Universidade Federal do Piauí, Anidro do Brasil Extrações S.A.

**Referências Bibliográficas:**

PHILLIPSON J., WRIGHT, C. W.; KIRBY, G.C.; WARHUST, D.C. Tropical plants as sources of antiprotozoal agents. In: Downum KR, Romeo JR, Stafford HA (eds) *Phytochemical potential of tropical plants*, v. 27. **Recent advances in phytochemistry**. Plenum Press, New York, p. 1–40, 1993.

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.

VERAS LM, GUIMARÃES MA, CAMPELO YD, VIEIRA MM, NASCIMENTO C, LIMA D, VASCONCELOS L, NAKANO E, KUCKELHAUS S, BATISTA MC, LEITE JR, MORAES J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry** 19:2051-2058, 2012.

PANACEK, A.; KOLAR, M.; VECEROVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J.; KRYSTOF, V.; HAMAL, P.; ZBORIL, R.; KVÍTEK, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, 2009, 30: 6333-6340.

**Palavras-chave:** Epiisopiloturina. Atividade antifúngica. Nanopartículas.