Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Estabelecimento de culturas *in vitro* de
Pilocarpus pennatifolius Lemmaire e
estudos iniciais sobre a biossíntese do alcalóide
pilocarpina**

Ana Paula Santos da Conceição

Tese de Doutorado

Prof. Dr. Paulo Roberto H. Moreno

Orientador

São Paulo

2004

“Estabelecimento de culturas *in vitro* de *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire e estudos iniciais sobre a biossíntese do alcalóide pilocarpina”

ANA PAULA SANTOS DA CONCEIÇÃO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Orgânica.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. LILIAN ROTHSCILD FRANCO DE CARVALHO
IQ – USP

Profa. Dra. DAISY DE BRITO REZENDE
IQ – USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GLEYDES MORGANTE
UDR – UNESP

Profa. Dra. DOMINIQUE CORINNE HERMINE FISCHER
FCF - USP

SÃO PAULO
01 de abril 2004

À minha família, por todo apoio e confiança.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Paulo Roberto H. Moreno, pela oportunidade de ingresso em seu grupo de pesquisa e pela orientação do presente trabalho.

Aos Professores do Instituto de Química, pela contribuição em minha formação profissional e intelectual.

Aos técnicos do B11 Tatiana Reis, José Antônio Joaquim, José Rubens Toledo e aos funcionários do Instituto de Química, pelo convívio e colaboração neste período.

À minha família científica – os amigos Sérgio, Melânia, Daniela, Elvis, Fátima e Marcos – que colaborou na realização deste trabalho compartilhando comigo pontos de vista, além de incontáveis momentos de descontração.

Aos amigos do Instituto de Química Adalberto, Ana Frazão, Ana Paula, Andréa, Angélica, Elisabete, Carol, Cecília, Fernanda, Fernando, Geise, Hiléia, Ingrid, Isabel, Joaquim, Joca, Luis, Mariko, Marta, Sandra e Tiago.

À minha família de São Paulo, Adriana, André, Andréa e Roberto.

Aos meus pais, irmãos e sobrinha, pelo apoio, pela confiança e torcida durante todo o tempo.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de tabelas	viii
Lista de equações e esquemas	ix
Lista de figuras	x
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Capítulo 1. Revisão bibliográfica sobre o gênero <i>Pilocarpus</i>	1
1.1. O gênero <i>Pilocarpus</i>	2
1.2. Principais metabólitos secundários de <i>Pilocarpus</i>	7
1.2.1. Alcalóides	7
1.2.2. Cumarinas	13
1.2.3. Flavonóides	20
1.2.4. Terpenos	24
1.2.5. Outros metabólitos secundários isolados de <i>Pilocarpus</i>	39
1.3. Conclusão	43
1.4. Referências Bibliográficas	45
Capítulo 2. Objetivos	57
2.1. <i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire	58
2.2. Objetivos	60
2.3. Referências bibliográficas	61

Capítulo 3. Extração de pilocarpina a partir de folhas de <i>P. pennatifolius</i>	62
3.1. Extração de alcalóides em espécies vegetais	63
3.1.1. Extração de pilocarpina em espécies de <i>Pilocarpus</i>	64
3.1.2. Técnicas analíticas para determinação de pilocarpina	65
3.2. Experimental	67
3.2.1. Extração de pilocarpina de folhas de <i>P. pennatifolius</i>	67
3.2.2. Determinação de pilocarpina por CG	69
3.3. Resultados e discussão	71
3.4. Conclusão	74
3.5. Referências bibliográficas	75
Capítulo 4. Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> de <i>P. pennatifolius</i> e determinação do alcalóide pilocarpina <i>in vitro</i>	78
4.1. Cultura de tecidos <i>in vitro</i> na produção de metabólitos secundários	79
4.1.1. Produção de pilocarpina <i>in vitro</i>	80
4.2. Experimental	84
4.2.1. Protocolos para desinfecção das folhas de <i>Pilocarpus pennatifolius</i>	84
4.2.2. Elaboração dos meios de cultura para indução de calos	85
4.2.3. Influência do regime de luminosidade na indução de calos de <i>P. pennatifolius</i>	86
4.2.4. Curvas de crescimento para calos de <i>P. pennatifolius</i> Lemm.	88
4.2.5. Caracterização da cultura de células de <i>P. pennatifolius</i> por RMN ¹ H	88
4.2.6. Extração de pilocarpina dos calos de <i>P. pennatifolius</i> Lemm.	91
4.3. Resultados e Discussão	93
4.4. Conclusões	101
4.5. Referências Bibliográficas	102

Capítulo 5. Estudos sobre a biossíntese do alcalóide pilocarpina em *P. pennatifolius*

5.1. Biossíntese de alcalóides	109
5.1.1. Acúmulo e transporte de alcalóides em espécies vegetais	111
5.1.2. Estudos sobre a biossíntese do alcalóide pilocarpina em <i>P. pennatifolius</i>	114
5.2. Experimental	118
5.2.1. Preparação do padrão ácido imidazol-pirúvico	118
5.2.2. Extração das proteínas hidrossolúveis das folhas e raízes de <i>P. pennatifolius</i>	120
5.2.3 Concentração do extrato protéico por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	121
5.2.4. Ensaio enzimático para desaminases	121
5.2.5. Ensaio enzimático para aminotransferases	122
5.2.6. Análise por CLAE da conversão de <i>L</i> -histidina	123
5.2.7. Quantificação da atividade enzimática	123
5.2.8. Dosagem das proteínas totais em folhas e raízes de <i>P. pennatifolius</i>	124
5.2.9. Caracterização da enzima	125
5.3. Resultados e discussão	127
5.4. Conclusões	138
5.5. Referências bibliográficas	139

Capítulo 6. Análise dos constituintes voláteis de *P. pennatifolius* por CG/ EM

6.1. Generalidades sobre óleos essenciais	146
6.1.1. Óleos essenciais em espécies do gênero <i>Pilocarpus</i>	147
6.2. Experimental	149

6.2.1. Extração do óleo essencial de <i>Pilocarpus pennatifolius</i>	149
6.2.2. Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa	150
6.2.3. Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	150
6.3. Resultados e discussão	152
6.4. Conclusões	157
6.5. Referências bibliográficas	158
Capítulo 7. Considerações finais sobre o estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de <i>P. pennatifolius</i> e sobre a biossíntese de pilocarpina	160
7.1. Conclusão geral	161
7.2. Referências bibliográficas	164
Apêndice	166

Lista de tabelas

Tabela 1.1	Exemplos de Rutaceae e suas diferentes utilizações	2
Tabela 1.2	Espécies de <i>Pilocarpus</i> e localização	5
Tabela 1.3	Alcalóides encontrados em espécies de <i>Pilocarpus</i> e suas respectivas atividades	10
Tabela 1.4	Cumarinas encontradas em espécies de <i>Pilocarpus</i> e suas respectivas atividades	15
Tabela 1.5	Flavonóides isolados a partir de espécies de <i>Pilocarpus</i> e suas respectivas atividades	22
Tabela 1.6	Terpenóides isolados a partir de espécies de <i>Pilocarpus</i>	26
Tabela 1.7	Outros metabólitos secundários isolados a partir de espécies de <i>Pilocarpus</i> e suas respectivas atividades	40
Tabela 3.1	Rendimento das extrações de alcalóides de folhas de <i>P. pennatifolius</i> de acordo com os protocolos A, B e C	71
Tabela 3.2	Rendimento das extrações A, B e C em relação à quantidade de pilocarpina extraída por massa de folhas	73
Tabela 4.1	Alguns metabólitos secundários produzidos em cultura de tecidos vegetais	81
Tabela 4.2	Protocolos para descontaminação das folhas de <i>P. pennatifolius</i>	85
Tabela 4.3	Algumas formulações de meios de cultura sólidos para indução e manutenção de calos de <i>P. pennatifolius</i> Lemm.	87
Tabela 4.4	Principais aminoácidos e açúcares que podem ocorrer em extratos de células vegetais	90
Tabela 4.5	Aminoácidos e carboidratos acumulados intracelularmente em cultura de calos de <i>P. pennatifolius</i>	97
Tabela 5.1	Alguns exemplos de alcalóides, seus sítios de biossíntese, acúmulo e transporte através da planta	113

Tabela 5.2	Atividades de algumas enzimas envolvidas na biossíntese de alcalóides	132
Tabela 5.3	Propriedades de algumas aminotransferases isoladas de diferentes vegetais	137
Tabela 6.1	Composição do óleo essencial das folhas de <i>P. pennatifolius</i>	154

Lista de equações e esquemas

Equação 4.1	Determinação da concentração de uma substância conhecida no espectro de RMN ¹ H	89
Equação 4.2	Determinação do fator correção para quantificação por RMN ¹ H	89
Equação 5.1	Determinação da atividade enzimática através da correlação das áreas do produto e padrão interno no cromatograma obtido por CLAE	124
Esquema 5.1	Preparação do ácido imidazol-pirúvico a partir de <i>L</i> -histidina	118

Lista de figuras

Figura 1.1	Posicionamento do gênero <i>Pilocarpus</i> na família Rutaceae	3
Figura 1.2	Estrutura do alcalóide imidazólico pilocarpina	4
Figura 1.3	Estruturas dos alcalóides isolados em espécies de <i>Pilocarpus</i>	12
Figura 1.4	Estruturas das cumarinas isoladas em espécies de <i>Pilocarpus</i>	18
Figura 1.5	Estruturas dos flavonóides isolados em espécies de <i>Pilocarpus</i>	23
Figura 1.6	Estruturas dos terpenóides isolados em espécies de <i>Pilocarpus</i>	34
Figura 1.7	Outros metabólitos secundários isolados em espécies de <i>Pilocarpus</i>	42
Figura 2.1	<i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire	59
Figura 3.1	Possíveis reações de degradação da pilocarpina (1)	65
Figura 3.2	Curva de calibração para o padrão cloridrato de pilocarpina obtida por CG	70
Figura 3.3	Cromatogramas obtidos através da análise por CG dos extratos de alcalóides totais de <i>P. pennatifolius</i> , obtidos pelos métodos de extração A, B e C, respectivamente.	72
Figura 4.1	Espectro de RMN ¹ H para o aminoácido <i>L</i> -histidina	91
Figura 4.2	Curva de calibração para o padrão cloridrato de pilocarpina obtida por CLAE	92
Figura 4.3	Calo de <i>P. pennatifolius</i> mantido em meio semi-sólido 77	94
Figura 4.4	Curva de crescimento para cultura de calos de <i>P. pennatifolius</i> no meio de cultura 77	95
Figura 4.5	Espectro de RMN ¹ H para células em suspensão de <i>P. pennatifolius</i> obtido	96
Figura 4.6	Cromatograma obtido por CG do extrato de alcalóides totais em células de <i>P. pennatifolius</i>	99

Figura 4.7	Cromatograma obtido por CLAE do extrato de alcalóides totais em células de <i>P. pennatifolius</i>	100
Figura 5.1	Alguns alcalóides com importância farmacológica	109
Figura 5.2	Proposta de ROBINSON para a biossíntese da pilocarpina	115
Figura 5.3	Proposta de BROCHMANN-HANSSEN <i>et al.</i> para a biossíntese da pilocarpina	116
Figura 5.4	Curva padrão da BSA para a determinação da concentração das proteínas totais	125
Figura 5.5	Determinação dos tempos de retenção de <i>L</i> -histidina, ácido imidazol-pirúvico e ácido urocânico a partir dos padrões	129
Figura 5.6	Cromatograma para o ensaio enzimático para aminotransferases com extrato protéico de raízes de <i>P. pennatifolius</i>	130
Figura 5.7	Variação da atividade enzimática em função do pH do ensaio	133
Figura 5.8	Variação da atividade enzimática em função do tempo	134
Figura 5.9	Variação da atividade enzimática com a concentração de substrato	135
Figura 6.1	Comparação da composição de óleos essenciais de algumas espécies de <i>Pilocarpus</i>	153
Figura 6.2	Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>P. pennatifolius</i>	155
Figura 6.3	Ciclização de carbocátions levando a formação dos esqueletos eudesmano e cadinano	156

Lista de abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4- dicloro-fenóxi-acético
ACN	Acetonitrila
BAP	6-benzil-amino-purina
BSA	Albumina bovina sérica
CG	Cromatografia gasosa
CIN	6-furfuril-amino-purina
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido diamino-etileno-tetra acético
eV	elétron-Volt
FID	Flame Ionisation Dectetor
GSH	Glutathiona reduzida
HAT	Histidina aminotransferase
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidróxi-etil)-piperazina- <i>N'</i> -(2-etano-sulfônico)
IAA	Ácido 3-indol-acético
IV	Infravermelho
nKatal	nmol/ s
MES	Ácido (<i>N</i> -morfolino)-etano sulfônico
NAA	Ácido naftil-acético
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
SNC	Sistema nervoso central
TA	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
tr	Tempo de retenção
TRIS	Tris- hidróximetil- aminometano

Resumo

Pilocarpus pennatifolius Lemmaire (Rutaceae) é uma espécie nativa que ocorre nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, e é popularmente conhecida por jaborandi. Essa e outras espécies de *Pilocarpus* encontram-se em risco de extinção devido ao extrativismo (uso como planta medicinal) e ao desmatamento.

O cultivo *in vitro* de *P. pennatifolius* foi realizado como uma alternativa para a produção de pilocarpina (princípio ativo do jaborandi). A cultura de células foi obtida em meio MS semi-sólido, suplementado com sacarose, como fonte de carbono, e tendo como reguladores de crescimento BAP, IAA e NAA. O tempo de duplicação da cultura de calos foi de 22 dias. A concentração do alcalóide, determinada por técnicas cromatográficas, foi de aproximadamente 0,1 µg/ mg de biomassa.

Os ensaios enzimáticos referentes à biossíntese da pilocarpina tiveram como objetivo elucidar a etapa inicial de formação do anel imidazólico, além da localização desta reação na planta. Os experimentos realizados indicaram a presença da enzima histidina amino-transferase (HAT, EC 2.6.1.38) cuja atividade catalítica foi de 46,09 nKat/ mg de proteína, apenas no extrato protéico das raízes de *P. pennatifolius*.

A determinação da composição do óleo essencial por CG e CG/EM indicou como constituintes majoritários os hidrocarbonetos tridecano (56,8 %) e pentadecano (25,5 %). Os sesquiterpenos não oxigenados constituíram cerca de 15 % do óleo obtido.

Abstract

Pilocarpus pennatifolius Lemmaire (Rutaceae) is a native Brazilian species which is commonly known as jaborandi. This species is endangered due to its exploitation as medicinal plant and the increasingly deforestation.

A callus culture of *P. pennatifolius* was established as an alternative source for pilocarpine production (the active compound of jaborandi). The cell culture was obtained in a semi-solid media, supplemented with sucrose as carbon source and as growth regulators, BAP, IAA e NAA. The doubling time for the callus culture was determined as 22 days. The concentration of the alkaloid, obtained by chromatographic techniques was *ca.* 0.1 µg/mg dry weight.

The enzymatic assays related to pilocarpine biosynthesis were carried out with the aim to elucidate the imidazole ring formation beyond identify the site where this reaction takes place. The results indicated the presence of the enzyme histidine ammonia transferase (HAT, EC 2.6.1.38) only in the protein extract obtained from the roots of *P. pennatifolius*. The catalytic activity for this enzyme was 46.09 nKat/ mg protein.

Volatile constituents from the leaves were analyzed by GC and GC/MS and the major compounds were determined as the hydrocarbons tridecane (56.8 %) and pentadecane (25.5 %). Almost 15 % of the total composition was constituted of non-oxygenated sesquiterpenes.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica sobre o gênero *Pilocarpus*

1.1. O gênero *Pilocarpus*

O gênero *Pilocarpus* é um dos 150 que constituem a família Rutaceae e tornou-se conhecido mundialmente com a chegada das primeiras expedições científicas feitas ao Brasil (HOLMSTED *et al.*, 1975). Várias espécies de *Pilocarpus* são popularmente conhecidas por jaborandi, em uma referência ao Tupi-Guarani, *ya-mbor-endi* (que causa salivação). Devido a esta propriedade, os "jaborandis" foram inicialmente confundidos com algumas espécies de *Piper* (HOLMSTED *et al.*, 1975, CORRÊA, 1969).

Ao todo, a família Rutaceae engloba cerca de 1500 espécies, presentes na América tropical, sul da África e Austrália (POTER & ELIAS, 1979). A principal característica dessa família é a presença de glândulas produtoras de óleos essenciais aromáticos que protegem as plantas contra predadores (HABERLANDT, 1928).

Várias espécies de Rutaceae são conhecidas por sua importância econômica, ornamental e em medicina popular. Alguns exemplos mais comuns estão relacionados na tabela 1.1, a seguir:

Tabela 1.1: Exemplos de Rutaceae e suas diferentes utilizações

Espécie	Utilização	Referência
<i>Citrus</i> spp.	Horticultura, óleos essenciais	ALBUQUERQUE, 1968
<i>Pilocarpus</i> spp.	Medicina alopática (pilocarpina)	HOLMSTED <i>et al.</i> , 1979
<i>Zanthoxylum</i> spp.	Indústria madeireira	CORRÊA, 1975
<i>Euxilophora paraensis</i>	Fabricação de tacos	LOUREIRO & SILVA, 1968
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Febrífugo	ALBUQUERQUE, 1968

O gênero *Pilocarpus* foi primeiramente estabelecido em 1797, com a descrição da espécie *P. racemosus* Vahl (SKORUPA, 1996). Atualmente, a posição taxonômica desse gênero é a seguinte (KAASTRA, 1977):

Família	Subfamília	Tribo	Subtribo	Gêneros
Rutaceae —	Rutoideae ———	Galipeae ———	Pilocarpineae ———	<i>Pilocarpus</i>
		(Cusparieae)		<i>Essenbeckia</i>
	Dictyolomatoideae	Zanthoxyleae		<i>Metrodorea</i>
	Spathelioideae	Ruteae		<i>Raulinoa</i>
	Toddalioideae	Boroneae		<i>Galipea</i> *
	Flindersioideae	Diosmeae		<i>Raputia</i> *
	Citroideae			<i>Neoraputia</i> *

* citados por PIRANI (1999)

Figura 1.1: Posicionamento do gênero *Pilocarpus* na família Rutaceae

As espécies de *Pilocarpus* ocorrem em uma vasta região do continente americano, que abrange desde o sul da América do Norte (México) até o sul da América do Sul (Argentina). De acordo com a revisão feita por SKORUPA (1996), são conhecidas 16 espécies, sendo que 13 podem ser encontradas no Brasil. Vale ressaltar que 11 delas ocorrem exclusivamente em território brasileiro onde se encontram distribuídas desde a região Sul à Nordeste (tabela 1.2).

Somente em 1873 esta planta começou a ser estudada quanto às suas propriedades farmacológicas, sendo comprovado que o jaborandi possui atividade sialagoga, diurética e diaforética (CORRÊA, 1969). A partir daí, infusos das folhas de jaborandi foram utilizadas no tratamento de febres, estomatites, bronquites, gota, psoríase, vitiligo, doenças renais, entre outras (HOLMSTED *et al.*, 1975).

Com o isolamento do alcalóide imidazólico pilocarpina (**1**) em 1875 (GERRARD, 1875; HARDY, 1875), e seu emprego em oftalmologia (WEBER, 1876), o jaborandi passou a figurar entre as plantas mais importantes da flora brasileira. A espécie mais valorizada atualmente é o *P. microphyllus* que, por seu conteúdo em pilocarpina (0,5 - 0,9%), é o único explorado comercialmente (PINHEIRO, 1997).

Além de alcalóides, cumarinas (AMARO-LUIS *et al.*, 1990), flavonóides (BERTRAND *et al.*, 2001), hidrocarbonetos (SKORUPA *et al.*, 1998; NEGRI *et al.*, 1998) e terpenos (CRAVEIRO *et al.*, 1979; ANDRADE NETO *et al.*, 1994) estão entre as substâncias já isoladas de espécies de *Pilocarpus*.

Figura 1.2: Estrutura do alcalóide imidazólico pilocarpina

O objetivo dessa revisão é ressaltar a importância deste gênero como fonte de metabólitos secundários com potencial farmacológico, dentro da família Rutaceae. Pretende-se, ainda, reunir em uma única publicação o maior número possível de referências relativas a este gênero, de modo a criar um banco de dados de fácil acesso relativo às espécies de *Pilocarpus*.

Tabela 1.2: Espécies de *Pilocarpus* e localização (SKORUPA, 1996)

Espécie	Localização
<i>Pilocarpus alatus</i> C. J. Joseph ex Skorupa	Brasil (Pará e Mato Grosso)
<i>Pilocarpus carajaensis</i> Skorupa	Brasil (Pará)
<i>Pilocarpus demerarae</i> Sandwith	Guiana Inglesa
<i>Pilocarpus giganteus</i> Engler	Brasil (Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo)
<i>Pilocarpus grandiflorus</i> Engler	Brasil (Alagoas, Bahia e Espírito Santo)
<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes	Brasil (Ceará e Pernambuco)
<i>Pilocarpus manuensis</i> Skorupa	Peru (Parque Nacional do Manu)
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth	Brasil (Maranhão, Mato Grosso, Pará e Piauí), Suriname
<i>Pilocarpus pauciflorus</i> St. Hilaire	Brasil (Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, São Paulo) (subespécie <i>pauciflorus</i>)
	Brasil (Bahia) (subespécie <i>clavatus</i>)
	Brasil (subespécie <i>organensis</i>)
<i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lemmaire	Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo), Paraguai (Caazapá, Paraguari), Argentina (Misiones)

Tabela 1.2: Espécies de *Pilocarpus* e localização (SKORUPA, 1996) (continuação)

Espécie	Localização
<i>Pilocarpus peruvianus</i> (Macbride) Kaastra	Bolívia, Brasil (Acre, Rondônia e Mato Grosso) e Peru
<i>Pilocarpus racemosus</i> Vahl	México, Antilhas, Colômbia, Venezuela e Guiana Inglesa (subespécie <i>racemosus</i>)
	Venezuela e Colômbia (subespécie <i>goudotianus</i>)
	Costa Rica e El Salvador (subespécie <i>viridulus</i>)
<i>Pilocarpus riedelianus</i> Engler	Brasil (Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Paraíba e Pernambuco)
<i>Pilocarpus spicatus</i> St. Hilaire	Brasil (Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo) (subespécie <i>spicatus</i>)
	Brasil (Bahia) (subespécie <i>longeracemosus</i>)
	Brasil (Ceará, Paraíba e Pernambuco) (subespécie <i>aracatensis</i>)
<i>Pilocarpus sulcatus</i> Skorupa	Brasil (Bahia e Minas Gerais)
<i>Pilocarpus trachyllophus</i> Holmes	Brasil (Bahia, Ceará, Minas Gerais e Piauí)

1.2. Principais metabólitos secundários de *Pilocarpus*

1.2.1. Alcalóides

Cerca de 12000 alcalóides já foram identificados na natureza. Essa classe de metabólitos secundários ocorre em cerca de 20% das espécies vegetais estudadas (FACCHINI, 2001). Quimicamente, são definidos como bases de baixa massa molecular que possuem nitrogênio em anel heterocíclico (alcalóides verdadeiros) ou não (proto- ou pseudoalcalóides) (DEWICK, 2000). Nas plantas, essas substâncias são relatadas como reserva de nitrogênio ou defensivos naturais contra predadores ou patógenos (HENRIQUES *et al.*, 2000). São biossintetizados a partir de aminoácidos sendo assim agrupados de acordo com o precursor biogenético.

Os alcalóides derivados do jaborandi são em sua maioria imidazólicos e especula-se que o aminoácido *L*-histidina seja seu precursor biossintético (BATTERSBY & OPENSHAW, 1953; BROCHMANN-HANSEN *et al.*, 1975; CORDELL, 1981; DEWICK, 2000). Contudo, esta hipótese ainda não foi confirmada.

A pilocarpina (e outros alcalóides imidazólicos) é obtida de várias espécies de *Pilocarpus*. Ao todo foram isolados 9 alcalóides com núcleo imidazólico das 8 espécies de *Pilocarpus* já estudadas (tabela 1.3). Apesar de sua semelhança estrutural, apenas a pilocarpina apresentou atividade colinérgica, atuando no SNC como estimulante do sistema parassimpático

(bexiga, canais lacrimais, glândulas salivares e sudoríparas). Este alcalóide é o fármaco utilizado no tratamento do glaucoma (perda da visão periférica devido ao aumento da pressão intra-ocular). A utilização de colírios à base de sais de pilocarpina (cloridratos ou nitratos) descongestiona o canal de Schlem (ângulo), normalizando o fluxo do humor aquoso (fluido que irriga a córnea), diminuindo a pressão intra-ocular (KOROLKOVAS, 1996). A isopilocarpina **(2)** é praticamente inativa quanto à sua ação colinérgica em comparação com seu epímero, a pilocarpina.

A ação sialagoga, isto é, aumento da produção de saliva, é atualmente explorada com objetivo de minorar os danos causados às glândulas salivares (xerostomia ou boca seca), devido à radio- ou quimioterapia em casos de câncer na região da garganta ou cabeça. A ingestão oral de pilocarpina mostrou ser eficaz na normalização do fluxo salivar, sendo seus efeitos colaterais toleráveis (MILLER, 1993; VALDEZ *et al.*, 1993).

Nenhuma outra atividade farmacológica foi reportada na literatura para os outros alcalóides imidazólicos do gênero *Pilocarpus*.

Além dos alcalóides imidazólicos, são descritos também alcalóides indólicos e quinolínicos, ambos derivados do *L*-triptofano.

O alcalóide indólico *N,N*-dimetil-5-metóxi-triptamina **(10)** e seu análogo desmetilado a *N,N*-dimetil-triptamina **(11)**, conhecido como DMT, foram isolados a partir das folhas de *P. pauciflorus* ssp. *organensis* (BALSAM & VOIGTLÄNDER, 1978). Ambos atuam no SNC provocando

alucinações. Existem alguns relatos sobre a utilização de *P. organensis* na preparação da bebida alucinógena conhecida como *Ayahuasca* (*Ayahuasca analogues*¹).

O alcalóide quinolínico dictamina (**14**) obtido de *P. grandiflorus*, por sua semelhança estrutural com as cumarinas, apresentou atividade fotossensibilizante (ASHWOOD *et al.*, 1982). Não foi relatada na literatura qualquer atividade farmacológica para os demais alcalóides quinolínicos isolados de espécies de *Pilocarpus*.

¹ *Ayahuasca analogues*. Disponível em www.serendipity.li/dmt/hoasca.html. Acesso: 22 ago. 2002.

Tabela 1.3: Alcalóides encontrados em espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades

Substância	Espécie	Atividades	Referência
pilocarpina (1)	<i>P. jaborandi</i> <i>P. microphyllus</i> <i>P. pennatifolius</i> <i>P. racemosus</i> <i>P. trachyllophus</i> <i>P. riedelianus</i>	Sialagoga Diurética Diaforética	GERRARD, 1875 HARDY, 1875 JOWETT, 1900 MESTER, 1973 PAYO HILL et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 1996 GUERREIRO et al., 2003
isopilocarpina (2)	<i>P. jaborandi</i> <i>P. microphyllus</i> <i>P. pennatifolius</i>	n.r. *	GERRARD, 1875 HARDY, 1875 MESTER, 1973
pilocarpidina (3)	<i>P. jaborandi</i>	n.r.	JOWETT, 1900
isopilocarpidina (4)	<i>P. jaborandi</i>	n.r.	JOWETT, 1900
pilosina (5)	<i>P. jaborandi</i> <i>P. microphyllus</i>	n.r.	PYMAN, 1912 VOIGTLÄNDER & ROSENBERG, 1959 TEDESCHI et al., 1973
isopilosina (6)	<i>P. jaborandi</i>	n.r.	VOIGTLÄNDER & ROSENBERG, 1959
epiisopilosina (7)	<i>P. jaborandi</i>	n.r.	TEDESCHI et al., 1973
epiisopiloturina (8)	<i>P. jaborandi</i>	n.r.	TEDESCHI et al., 1973
13-nor-7(11)-de-hidro-pilocarpina (9)	<i>P. trachyllophus</i>	n.r.	ANDRADE NETO et al., 1996
<i>N</i> , <i>N</i> - dimetil-5-metóxi-triptamina (10)	<i>P. organensis</i>	Alucinógeno	BALSAM & VOIGTLÄNDER, 1978 RIBA et al., 2002
<i>N</i> , <i>N</i> -dimetil-triptamina (11)	<i>P. organensis</i>	Alucinógeno	BALSAM & VOIGTLÄNDER, 1978 RIBA et al., 2002

Tabela 1.3: Alcalóides encontrados em espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades (continuação)

Substância	Espécie	Atividades	Referência
plastidesmina (12)	<i>P. grandiflorus</i>	n.r.	de SOUZA et al., 2003
(1H)-4-metóxi-2-quinolona (13)	<i>P. grandiflorus</i>	n.r.	de SOUZA et al., 2003
dictamina (14)	<i>P. grandiflorus</i>	Antifúngico Vasorrelaxante Fotosensibilizante Anticoagulante	ASSWOOD-SMITH et al., 1982 YU et al., 1992 de SOUZA et al., 2002 SU et al., 1998

* n.r. - não relatado

Figura 1.3: Estruturas dos alcalóides isolados em espécies de *Pilocarpus*

1.2.2. Cumarinas

Cumarinas são metabólitos secundários biossintetizados a partir do ácido *p*-cumarínico (derivado da *L*-fenilalanina). Além das cumarinas simples (escopolentina **(28)**), também foram isoladas de espécies de *Pilocarpus* piranocumarinas (lineares- luvangetina **(17)** ou angulares- allo-xantoxiletol **(19)**) e furanocumarinas (lineares- bergaptano **(20)** ou angulares- 3-metóxi-angelicina **(26)**). Algumas cumarinas que apresentam em sua estrutura um grupo prenila ligado a um oxigênio (donatina **(18)**, imperatorina **(23)**) ou a um carbono (ostol **(30)**).

A eficácia das infusões de jaborandi no tratamento de doenças de pele pode ser atribuída a essa classe de substâncias devido a sua atividade fotossensibilizante. Atualmente, a repigmentação da pele para tratamento de psoríase e vitiligo é feita por fotoquimioterapia. Esta técnica consiste no uso (tópico ou oral) de uma cumarina (geralmente o 8-metóxi-psoraleno), combinado à irradiação do local afetado com luz UVA (320-380 nm) (MANDERFELD *et al.*, 1997).

Os extratos hexânico e diclorometânico de *P. spicatus* e *P. giganteus* exibiram potencial atividade antichagásica no teste de letalidade em *Trypanosoma cruzi* (MAFEZOLI *et al.*, 2000). Demonstrou-se que a chalepina **(34)**, isolada a partir das folhas de *P. spicatus*, é a substância ativa na inibição deste parasita. Através de cristalografia de raios-X, foi mostrado que a chalepina se complexa com a enzima GAPDH

(gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), inibindo a glicólise em *T. cruzi*. (PAVÃO *et al.*, 2002).

Estudos realizados por HUANG *et al.* (1994) verificaram que análogos sintéticos da seselina **(35)** apresentaram uma potencial atividade anti-HIV.

Tabela 1.4: Cumarinas encontradas em espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades

Substância	Espécie	Atividade	Referência
xantiletina (15)	<i>P. goudotianus</i>	Antifúngico	AMARO-LUIS et al., 1990
	<i>P. racemosus</i>	Anticoagulante	TENG et al., 1992
	<i>P. riedelianus</i>	Aleloquímico Inseticida	MACÍAS et al., 1993 CALCAGNO et al., 2002
xantoxiletina (16)	<i>P. goudotianus</i>	Anticoagulante Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS et al., 1990 TENG et al., 1992 MACÍAS et al., 1993 CALCAGNO et al., 2002
luvangetina (17)	<i>P. goudotianus</i>	Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS et al., 1990 COMPAGNONE e RODRIGUEZ, 1993 MACÍAS et al., 1993 CALCAGNO et al., 2002
	<i>P. racemosus</i>		
donatina (18)	<i>P. goudotianus</i>	Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS et al., 1990 MACÍAS et al., 1993 CALCAGNO et al., 2002
allo-xantoxiletol (19)	<i>P. goudotianus</i>	Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS et al., 1990 MACÍAS et al., 1993 CALCAGNO et al., 2002
bergaptano (20)	<i>P. goudotianus</i>	Fotosensibilizador Bactericida Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS et al., 1990 COMPAGNONE e RODRIGUEZ, 1993 MACÍAS et al., 1993 MANDERFELD et al., 1997 CALCAGNO et al., 2002
	<i>P. racemosus</i>		

Tabela 1.4: Cumarinas encontradas em espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades (continuação)

Substância	Espécie	Atividade	Referência
8-metóxi-psoraleno (21)	<i>P. goudotianus</i> <i>P. racemosus</i>	Fotossensibilizador Vaso-relaxante Bactericida Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS <i>et al.</i> , 1990 COMPAGNONE e RODRIGUEZ, 1993 MACÍAS <i>et al.</i> , 1993 MANDERFELD <i>et al.</i> , 1997 CHIOU <i>et al.</i> , 2001 CALCAGNO <i>et al.</i> , 2002
isopimpineline (22)	<i>P. goudotianus</i>	Vaso-relaxante Bactericida Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS <i>et al.</i> , 1990 MACÍAS <i>et al.</i> , 1993 CHIOU <i>et al.</i> , 2001 CALCAGNO <i>et al.</i> , 2002 NGWENDSON <i>et al.</i> , 2003
imperatorina (23)	<i>P. goudotianus</i>	Vaso-relaxante Anticoagulante Aleloquímico Inseticida	AMARO-LUIS <i>et al.</i> , 1990 SU <i>et al.</i> , 1998 CHIOU <i>et al.</i> , 2001 NGWENDSON <i>et al.</i> , 2003
tricolina (24)	<i>P. goudotianus</i>	n.r.	AMARO-LUIS <i>et al.</i> , 1990
(+)-elisina (25)	<i>P. goudotianus</i> <i>P. grandiflorus</i>	n.r.	AMARO-LUIS <i>et al.</i> , 1990 de SOUZA <i>et al.</i> , 2003
3-metóxi-angelicina (26)	<i>P. riedelianus</i>	n.r.	MÜLLER <i>et al.</i> , 1993
3,6-dimetóxi-angelicina (27)	<i>P. riedelianus</i>	n.r.	MÜLLER <i>et al.</i> , 1993

Tabela 1.4: Cumarinas encontradas em espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades (continuação)

Substância	Espécie	Atividade	Referência
escopolentina (28)	<i>P. riedelianus</i> <i>P. grandiflorus</i>	Antioxidante	MÜLLER et al., 1993 de SOUZA et al., 2002 SHAW et al., 2003
pimpinellina (29)	<i>P. riedelianus</i>	n.r.	MÜLLER et al., 1993
ostol (30)	<i>P. riedelianus</i>	Anticoagulante Vaso-relaxante	MÜLLER et al., 1993 CHIOU et al., 2001
hidrato de meranzina (31)	<i>P. riedelianus</i>	n.r.	MÜLLER et al., 1993
esfondina (32)	<i>P. riedelianus</i>	n.r.	MÜLLER et al., 1993
auraptano (33)	<i>P. riedelianus</i>	Antitumoral	MÜLLER et al., 1993 MURAKAMI et al., 1997
chalepina (34)	<i>P. spicatus</i>	Antichagásico	PAVÃO et al., 2002
seselina (35)	<i>P. riedelianus</i>	Anti-HIV	GUERREIRO et al., 2001 HUANG et al., 1994
umbeliferona (36)	<i>P. riedelianus</i>	Antioxidante	HOULT e PAYA, 1996 GUERREIRO et al., 2001
13, 13- dimetil-6 metóxi-2H, 8H-pirano-(2, 3)- cromen-2-ona (37)	<i>P. riedelianus</i>	n.r.	GUERREIRO et al., 2001
7- hidróxi- 3- (1', 1'-dimetilalil)- 8- metóxi-cumarina (38)	<i>P. riedelianus</i>	Bactericida Antifúngico	GUERREIRO et al., 2001
3'-hidróxi-dipetalolactona (39)	<i>P. grandiflorus</i>	n.r.	de SOUZA et al., 2001
3',4'-di-hidro-3'-hidróxi-dipetalolactona (40)	<i>P. grandiflorus</i>	Antifúngico	de SOUZA et al., 2003
3-(1',1'-dimetilalil)-escopolentina (41)	<i>P. grandiflorus</i>	Antifúngico	de SOUZA et al., 2003

* n.r. - não relatada

Figura 1.4: Estruturas das cumarinas isoladas em espécies de *Pilocarpus*

Figura 1.4: Estruturas das cumarinas isoladas em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

1.2.3. Flavonóides

Os flavonóides representam um dos mais importantes grupos de compostos fenólicos e, tal qual as cumarinas, são biossintetizados a partir da *L*-fenilalanina (4-cumaroil-CoA). São metabólitos facilmente encontrados em várias espécies de *Citrus* (Rutaceae), sendo isolados de frutos, flores, sementes e folhas (MIDDLETON, 1984). Exibem uma série de atividades farmacológicas, das quais a antioxidante é a mais estudada. A ação antioxidante é devida à capacidade que tais substâncias possuem de capturar as espécies reativas de oxigênio e radicais livres, restringindo sua produção (KIM *et al.*, 2002). Além de atuarem como antioxidantes, os flavonóides possuem atividade analgésica (THIRUGNANASAMBANTHAN *et al.*, 1990), sedativa (MEDINA *et al.*, 1997; MARDER & PALADINI, 2002) e antiinflamatória (PATHAK *et al.*, 1991), entre outras.

Na busca de novas substâncias para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer, os flavonóides têm se mostrado bastante promissores (KIM *et al.*, 2002). Acredita-se que a produção de espécies reativas de oxigênio no organismo esteja estreitamente relacionada à manifestação desta doença (MAKERSBY, 1997).

A hesperidina (**46**), isolada em *P. trachyllophus* (BERTRAND *et al.*, 2001), apresentou uma grande variedade de atividades farmacológicas, entre as quais antiinflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, abortiva, analgésica, antipirética e antioxidante (GARG *et al.*, 2001). Recentemente,

foi verificado que esta substância também possui propriedades sedativas (MARDER *et al.*, 2003). Esse flavonóide é obtido principalmente de espécies de *Citrus* (KANES *et al.*, 1993; HOROWITZ & GENTILI, 1963) e *Zanthoxylum* (ARTHUR *et al.*, 1956).

A tabela 1.5, a seguir, apresenta os flavonóides isolados a partir de espécies de *Pilocarpus* bem como suas respectivas atividades farmacológicas.

Tabela 1.5: Flavonóides isolados a partir de espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades

Sustância	Espécie	Atividade	Referência
3, 4', 5, 7-tetra-hidróxi-3', 6-dimetóxi-flavona- 3-O-β-rutinosídeo (42)	<i>P. trachyllophus</i>	n.r.*	BERTRAND <i>et al.</i> , 2001
3, 4', 5, 7-tetra-hidróxi-6-metóxi-flavona- 3-O-β-rutinosídeo (43)	<i>P. trachyllophus</i>	n.r.	BERTRAND <i>et al.</i> , 2001
patulentina- 3-O-β-rutinosídeo (44)	<i>P. trachyllophus</i>	Antioxidante (aglicona)	BERTRAND <i>et al.</i> , 2001
axilarina (45)	<i>P. trachyllophus</i>	Antioxidante	BERTRAND <i>et al.</i> , 2001 KIM <i>et al.</i> , 2002
hesperidina (46)	<i>P. trachyllophus</i>	Antioxidante Sedativo	ANDRADE NETO <i>et al.</i> , 1996 KIM <i>et al.</i> , 2002

* n.r. - não relatada

(42) R1 = OCH₃
R2 = 3-O-β-D-rutinosila

(43) R1 = H
R2 = 3-O-β-D-rutinosila

(44) R1 = 3-O-β-D-rutinosila

(45) R1 = CH₃

(46) R = 7-O-β-L-rutinosila

D-rutinosila

Figura 1.5: Estruturas dos flavonóides isolados em espécies de *Pilocarpus*

1.2.4. Terpenos

Vários terpenos foram isolados de espécies de *Pilocarpus*, principalmente a partir dos óleos essenciais. Os terpenos são biossintetizados a partir do isopentenil pirofosfato (IPP) (C5), que origina os mono- (C10), os sesqui- (C15), os di- (C20) e os triterpenos (C30).

São vários os papéis atribuídos aos óleos essenciais no metabolismo das plantas. Entretanto, é um consenso a importância que estes metabólitos apresentam na atração de polinizadores, garantindo a reprodução de uma espécie vegetal (HARBONE, 1982). Quanto às atividades biológicas, as mais citadas são a inseticida, antimicrobiana e anti-séptica (FIGUEIREDO, 1992).

Os óleos essenciais das espécies *P. spicatus*, *P. gradiflorus* e *P. pauciflorus* apresentaram atividade bactericida em cepas de *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SANTOS *et al.*, 1997).

Na tabela 1.6 podemos verificar que os óleos essenciais de *Pilocarpus* são constituídos em sua maioria por hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Apenas dois diterpenos foram relatados para espécies de *Pilocarpus*, sendo um hidrocarboneto (CRAVEIRO *et al.*, 1979) e um oxigenado (GUERREIRO *et al.*, 2001).

Apesar de serem compostos comuns à maioria dos vegetais, a ocorrência de triterpenos e esteróides neste gênero foi relatada apenas em três espécies (tabela 1.6). Em *P. grandiflorus* foram isolados o β -

amirina (**109**), a ocotilona (**111**) e o germanicol (**114**) (de SOUZA *et al.*, 2003). Em *P. trachyllophus* foi isolado o acetato de β -amirina (**110**), para o qual foi relatada uma atividade citostática alta em células HEP-2 (GOMEZ *et al.* 1997).

Dos vários esteróides isolados, somente o β -sitosterol (**115**) teve atividades farmacológicas descritas na literatura, tais como angiogênica, anti-helmíntica, anti-microbial e antitumoral (MOON *et al.*, 1999; VILLASENOR *et al.*, 2002; SINGH & SINGH, 2003; AWAD *et al.*, 2003).

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus*

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Monoterpenos</i>		
3.7.7-trimetil-biciclo-[3.1.1]-2-hepteno (47)	<i>P. microphyllus</i> , <i>P. affinis</i>	CRAVEIRO et al., 1979
α -pineno (48)	<i>P. jaborandi</i> , <i>P. microphyllus</i> ,	CRAVEIRO et al., 1979
	<i>P. affinis</i> , <i>P. spicatus</i> ,	SANTOS et al., 1997
	<i>P. grandiflorus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
	<i>P. spicatus</i> , <i>P. grandiflorus</i>	SANTOS et al., 1997
β -pineno (49)		ANDRADE NETO et al., 2002
canfeno (50)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
borneol (51)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
linalol (52)	<i>P. spicatus</i> , <i>P. grandiflorus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
mirceno (53)		SANTOS et al., 1997
		ANDRADE NETO et al., 2002
	<i>P. jaborandi</i> , <i>P. affinis</i> , <i>P. spicatus</i> ,	CRAVEIRO et al., 1979
	<i>P. grandiflorus</i>	SANTOS et al., 1997
<i>E</i> - β -ocimeno (54)		ANDRADE NETO et al., 2002
	<i>P. spicatus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
		SANTOS et al., 2004
Z- β -ocimeno (55)	<i>P. pennatifolius</i>	SANTOS et al., 2004

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Monoterpenos</i>		
limoneno (56)	<i>P. jaborandi</i> , <i>microphyllus</i> , <i>P. affinis</i> ,	CRAVEIRO et al., 1979
	<i>P. trachyllophus</i> , <i>P. spicatus</i> ,	ANDRADE NETO et al., 1995
	<i>P. grandiflorus</i>	SANTOS et al., 1997
sabineno (57)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2000, 2002
δ-3-careno (58)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
α-terpineno (59)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
γ-terpineno (60)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
α- terpineol (61)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
terpinen-4-ol (62)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
p-cimeno (63)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
β-felandreno (64)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
1,8-cineole (65)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Sesquiterpenos</i>		
Z,Z- farnesol (66)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
E-nerolidol (67)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
β-bisaboleno (68)	<i>P. trachyllophus, P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 SANTOS et al., 1997
δ-cadineno (69)	<i>P. microphyllus, P. trachyllophus, P. spicatus. P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 2000, 2002 CRAVEIRO et al., 1979 ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2000, 2002 SANTOS et al., 2004
γ-cadineno (70)	<i>P. trachyllophus, P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 SANTOS et al., 1997
germacreno D (71)	<i>P. trachyllophus, P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2000, 2002 ANDRADE NETO et al., 1995
β-cubebano (72)	<i>P. spicatus, P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 2002 ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2002 SANTOS et al., 2004
γ-muuroleno (73)	<i>P. spicatus, P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2002 SANTOS et al., 2004

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Sesquiterpenos</i>		
α -muuroleno (74)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
germacreno-4-D-ol (75)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
α -cadinol (76)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
cubenol (77)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
T-muurolol (78)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
calacoreno (79)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO et al., 2001
α -calacoreno (80)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO et al., 2001
γ -calacoreno (81)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO et al., 2001
cadaleno (82)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO et al., 2001
sesquicamaenol (83)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO et al., 2001
sesquicamaenol A (84)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO et al., 2001
δ -elemeno (85)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
germacreno A (86)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
germacreno B (87)	<i>P. pennatifolius</i>	SANTOS et al., 2004
selineno (88)	<i>P. affinis, P. pennatifolius</i>	CRAVEIRO et al., 1979 SANTOS et al., 2004

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Sesquiterpenos</i>		
β -elemeno (89)	<i>P. spicatus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2002 SANTOS et al., 2004
biciclo-germacreno (90)	<i>P. spicatus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 2002 SANTOS et al., 2004
elemol (91)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
β -eudesmol (92)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
ciclo-sativeno (93)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
óxido de cariofileno (94)	<i>P. trachyllophus</i> , <i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 SANTOS et al., 1997
α -humuleno (95)	<i>P. microphyllus</i> , <i>P. trachyllophus</i> , <i>P. spicatus</i> , <i>P. grandiflorus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 2000, 2002 CRAVEIRO et al., 1979 ANDRADE NETO et al., 1995 SANTOS et al., 1997
α -copaeno (96)	<i>P. microphyllus</i> , <i>P. spicatus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 2000, 2002 SANTOS et al., 2004 CRAVEIRO et al., 1979 ANDRADE NETO et al., 2002 SANTOS et al., 2004

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Sesquiterpenos</i>		
β -borboneno (97)	<i>P. trachyllophus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2002 SANTOS et al., 2004
β -cariofileno (98)	<i>P. microphyllus</i> , <i>P. trachyllophus</i> , <i>P. spicatus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	CRAVEIRO et al., 1979 ANDRADE NETO et al., 1995 SANTOS et al., 1997 ANDRADE NETO et al., 2000, 2002 SANTOS et al., 2004
α -guaiaeno (99)	<i>P. microphyllus</i>	CRAVEIRO et al., 1979
espatulenol (100)	<i>P. trachyllophus</i> , <i>P. pennatifolius</i>	ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2000 SANTOS et al., 2004
α -cubebeno (101)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
allo-aromadendrano (102)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
globulol (103)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
viridiflorol (104)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
guaiol (105)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002
bulnesol (106)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO et al., 2002

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Diterpenos</i>		
sandaracopimaradieno (107)	<i>P. jaborandi</i>	CRAVEIRO <i>et al.</i> , 1979
angustifolina (108)	<i>P. riedelianus</i>	GUERREIRO <i>et al.</i> , 2001
<i>Triterpenos</i>		
β -amirina (109)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA <i>et al.</i> , 2003
acetato de β -amirina (110)	<i>P. trachyllophus</i>	BERTRAND <i>et al.</i> , 2001
ocotilona (111)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA <i>et al.</i> , 2003
3- β -acetóxi-24-metil-25-etil-20,24-epóxi-damarano (112)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO <i>et al.</i> , 1994
3-oxo-24-metil-25-etil-20,24-epóxi-damarano (113)	<i>P. spicatus</i>	ANDRADE NETO <i>et al.</i> , 1994
germanicol (114)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA <i>et al.</i> , 2003

Tabela 1.6: Terpenóides identificados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Terpeno (classe)	Espécie	Referência
<i>Esteróides</i>		
β -sitosterol (115)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA et al., 2003
β -sitosterona (116)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA et al., 2003
7-oxo- β -sitosterol (117)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA et al., 2003
estigmast-3,7-diona (118)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA et al., 2003
7- β -hidróxi-estigmast-4-en-3-ona (119)	<i>P. grandiflorus</i>	de SOUZA et al., 2003
<i>Polisoprenóides</i>		
12-prenol (120)	<i>P. trachyllophus</i>	BERTRAND et al., 2001
[3E, 9Z]-13-prenol (121)	<i>P. trachyllophus</i>	BERTRAND et al., 2001
[3E, 10Z]-14-prenol (122)	<i>P. trachyllophus</i>	BERTRAND et al., 2001

Monoterpenos

Figura 1.6: Estruturas dos terpenóides isolados em espécies de *Pilocarpus*

Sesquiterpenos

Figura 1.6: Estruturas dos terpenóides isolados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Diterpenos **Triterpenos**

Figura 1.6: Estrutura dos terpenóides isolados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

Esteróides **Prenóis**

Figura 1.6: Estrutura dos terpenóides isolados em espécies de *Pilocarpus* (continuação)

1.2.5. Outros metabólitos secundários isolados de *Pilocarpus*

Além das substâncias detalhadas anteriormente, foram isolados de espécies de *Pilocarpus* cetonas, álcoois, amidas, lignanas, ácidos carboxílicos, ésteres e hidrocarbonetos (tabela 1.7).

Duas lignanas, outra categoria de derivados da *L*-fenilalanina, foram isoladas das espécies *Pilocarpus*. Lignóides são substâncias responsáveis pela constituição das paredes das células vegetais, conferindo a elas a rigidez característica. Uma delas, o lírio-resinol B (**124**), isolada em *P. grandiflorus* (de SOUZA *et al.*, 2003), apresentou atividade antichagásica (SAUVAIN *et al.*, 1996).

A amida pelitorina (**125**), foi obtida a partir das folhas de *P. trachyllophus*, é conhecida por sua pronunciada atividade inseticida sendo isolada freqüentemente de espécies de *Piper* (HE *et al.*, 2002).

Os padrões de *n*-alcanos constituem importantes marcadores taxonômicos na classificação de plantas quanto a gênero e espécie, de acordo com EGLINTON *et al.* (1962). Algumas espécies de *Pilocarpus* analisadas quanto às graxas epicuticulares, apresentaram um padrão de hidrocarbonetos variando de C₁₄-C₃₃ (SKORUPA *et al.*, 1998). Em *P. jaborandi* foi isolado um hidrocarboneto aromático C₂₀, o qual é considerado um marcador para essa espécie, pois não foi encontrado em outros *Pilocarpus spp.* (NEGRI *et al.*, 1998).

Tabela 1.7: Outros metabólitos secundários isolados a partir de espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades

Substância	Espécie	Atividade	Referência
(-)-episesamina (123)	<i>P. trachyllophus</i>	n.r.*	ANDRADE NETO et al., 1995
lirio-resinol B (124)	<i>P. grandiflorus</i>	Antichagásica	de SOUZA et al., 2003 SAUVAIN et al., 1996
pelitorina (125)	<i>P. trachyllophus</i>	Inseticida	ANDRADE NETO et al., 1995 HE et al., 2002
eugenol (126)	<i>P. pennatifolius</i>	Inseticida Anestésica Antioxidante Antifúngica	SANTOS et al., 2004 PARK et al., 2000 OGATA et al., 2000 PRIYADARSINI et al., 1998 MEEPAGALA et al., 2002
ácido <i>N',N'</i> -dimetil-antranílico (127)	<i>P. grandiflorus</i>	n.r.	de SOUZA et al., 2003
ácido vanílico (128)	<i>P. grandiflorus</i>	n.r.	de SOUZA et al., 2003
siringaldeído (129)	<i>P. grandiflorus</i>	n.r.	de SOUZA et al., 2003
2-undecanona (130)	<i>P. spicatus</i> <i>P. trachyllophus</i> <i>P. jaborandi</i>	n.r.	SANTOS et al., 1997 ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2000, 2002
2-tridecanona (131)	<i>P. spicatus</i> <i>P. trachyllophus</i> <i>P. jaborandi</i>	n.r.	SANTOS et al., 1997 ANDRADE NETO et al., 1995 ANDRADE NETO et al., 2000, 2002
1-hidróxi-2-tridecanona (132)	<i>P. trachyllophus</i>	n.r.	ANDRADE NETO et al., 1996
2-hidróxi-glutarato de etila (133)	<i>P. racemosus</i>	n.r.	COMPAGNONE & RODRIGUEZ, 1993
hexadecanoato de metila (134)	<i>P. pennatifolius</i>	n.r.	SANTOS et al., 2004
hexanol (135)	<i>P. pennatifolius</i>	n.r.	SANTOS et al., 2004
undecanol (136)	<i>P. pennatifolius</i>	n.r.	SANTOS et al., 2004

Tabela 1.7: Outros metabólitos secundários isolados a partir de espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades
(continuação)

Substância	Espécie	Atividade	Referência
1-fenil-5-vinil-5,9-dimetil-decano (137)	<i>P. jaborandi</i>	n.r.	NEGRI et al., 1998 SKORUPA et al., 1998
tridecano (138)	<i>P. pennatifolius</i>	n.r.	SANTOS et al., 2004
pentadecano (139)	<i>P. pennatifolius</i>	n.r.	SANTOS et al., 2004
<i>n</i> -alcanos (140)	<i>P. alatus</i> , <i>P. carajaensis</i> , <i>P. giganteus</i> , <i>P. sulcatus</i> , <i>P. pauciflorus</i> , <i>P. jaborandi</i> , <i>P. grandiflorus</i> , <i>P. riedelianus</i> , <i>P. microphyllus</i>	n.r.	SKORUPA et al., 1998

*n.r. - não relatada

Figura 1.7: Outros metabólitos secundários isolados a partir de espécies de *Pilocarpus*

1.3. Conclusão

Foram reunidas as informações disponíveis na literatura quanto à composição dos metabólitos secundários em espécies de *Pilocarpus* e suas respectivas atividades biológicas. Alcalóides, cumarinas, flavonóides e terpenos constituem as substâncias freqüentemente isoladas neste gênero da família Rutaceae (GUERREIRO *et al.*, 2001). Pode ser observada uma predominância de substâncias oriundas do metabolismo da *L*-fenilalanina,

Apesar da diversidade de substâncias isoladas de espécies de *Pilocarpus*, podemos perceber que este gênero ainda é pouco explorado como fonte de substâncias potencialmente ativas:

1. das 16 espécies conhecidas (tabela 1.2), apenas em 8 foi relatada a presença de alcalóides (tabela 1.3) o que totaliza menos de um alcalóide por espécie;
2. a presença de flavonóides, cuja importância como antioxidantes cresce a cada dia, só foi descrita na espécie *P. trachyllophus* (tabela 1.5);
3. somente duas lignanas são descritas para o gênero (tabela 1.7) e uma delas possui atividade antichagásica;
4. apesar das diferentes atividades farmacológicas exibidas pelas cumarinas isoladas (tabela 1.4), ainda são poucos os trabalhos relativos ao estudo destas substâncias em espécies de *Pilocarpus*.

O uso popular consagrou ao longo do tempo várias espécies vegetais. O estudo químico dessas espécies, associado a ensaios de atividade, revelou uma variedade de substâncias de importância inestimável para o homem. Considerando o gênero *Pilocarpus*, a quantidade de substâncias identificadas e as atividades farmacológicas que algumas delas apresentam, podemos perceber que há ainda um vasto campo de pesquisas a ser investigado quanto à fitoquímica das diferentes espécies.

1.4. Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE BWP (1968) Rutaceae do estado da Guanabara, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **40(4)**, 500-550.

AMARO LUIS JM, MASSANET GM, PANDO E & RODRIGUEZ LUIZ F (1990) New coumarins from *Pilocarpus goudotianus*, *Planta Medica*, **56**, 304-306.

ANDRADE NETO M, SILVEIRA ER, BRAZ-FILHO R, GAMBARDELA MTP & SANTOS RHA (1994) 24-methyl-25-ethyladammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*, *Phytochemistry*, **35(3)**, 739-743.

ANDRADE NETO M, MAFEZOLI J, CUNHA UA, da SILVEIRA SC & SILVEIRA ER (1995) Volatile constituents of *Pilocarpus trachyllophus* Holmes, *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 671-674.

ANDRADE NETO M, MENDES PH & SILVEIRA ER (1996) An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*, *Phytochemistry*, **42(3)**, 885-887.

ANDRADE NETO M, CUNHA UA, MAFEZOLI J & SILVEIRA ER (2000) Volatile constituents of *Pilocarpus trachyllophus* Holmes and *Pilocarpus jaborandi* Holmes (Rutaceae), *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 769-774.

_____ (2002) Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil, *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 319-324.

- ARTHUR HR, WUI WH & MA CN (1956) An examination of the Rutaceae of Hong Kong (Part I), Flavonoid glycosides from *Zanthoxylum* species and occurrence of optically active hesperidin, *Journal of Chemistry Society*, 632-635.
- ASHWOOD-SMITH MJ, TOWERS GH, ABRAMOWSKI Z, POULTON GA, LIU M (1982) Photobiological studies with dictamnine, a furoquinoline alkaloid, *Mutation Research*, **102(4)**, 401-412.
- AWAD AB, ROY R & FINK CS (2003) β -sitosterol, a plant sterol induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Oncology Reports*, **10(2)**, 497-500.
- BALSAM G & VOIGTLÄNDER HW (1978) A psychotropic alkaloid from *Pilocarpus organensis*, *Archiv der Pharmazie*, **311(78)**, 1016-1018.
- BARROSO GM (1991) *In Sistemática de Angiosperma do Brasil*, vol. 2, 2ª edição. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- BATTERSBY AR & OPENSHAW HT (1953) The Imidazole Alkaloids, *In The Alkaloids* (Manske RFH & Holmes HL, editors), **20**, 221-246.
- BERTRAND C, FABRE N & MOULIS C (2001) Constituents of *Pilocarpus trachylophus*, *Fitoterapia*, **72**, 844-847.
- BROCHMANN-HANSSEN E, NUNES MA & OLAH CK (1975) On the biosynthesis of pilocarpine, *Planta Medica*, **28**, 1-5.
- CALCAGNO MP, COLL J, LLORIA J, FAINI F & ALONSO-AMELOT ME (2002) Evaluation of synergism in feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*, **28(1)**, 175-191.

- CHIOU WF, HUANG YL, CHEN CF, CHEN CC (2001) Vasorelaxing effect of coumarins from *Cnidium monnieri* on rabbit corpus cavernosum, *Planta Medica*, **67(3)**, 282-284.
- COMPAGNONE R & RODRIGUEZ MC (1993) Coumarins from *Pilocarpus racemosus*, *Fitoterapia*, **64(6)**, 557.
- CORDELL G (1981) Alkaloids derived from histidine, 833-845, *In* Introduction to alkaloids- a biogenic approach, John-Willey & Sons.
- CORRÊA MP (1969) *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol. 4, 360-369.
- _____ (1975) *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol. 5, 58-58.
- CRAVEIRO AA, ANDRADE CHS, MATOS FJA & ALENCAR JW (1979) Essential oils from Brazilian Rutaceae. I Genus *Pilocarpus*, *Journal of Natural Products*, **42(6)**, 669-671.
- _____ (2001) Estudo fitoquímico de *Pilocarpus grandiflorus* e sua ação sobre o fungo simbiote de formigas cortadeiras, *In* Livro de Resumos da 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- DEWICK PM (2000) Alkaloids, *In* Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 270-374, John-Willey & Sons.
- EGLINTON G, HAMILTON RJ, RAPHAEL RA & GONZALEZ AG (1962) Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plants leaves: a taxonomic survey, *Phytochemistry*, **1**, 89-102.

FACCHINI PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 29-66.

FIGUEIREDO ACS (1992) *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*: produção de metabólitos secundários *in vivo* e *in vitro*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

GARG A, GARG S, ZANEVELD LJD & SINGLA AK (2001) Chemistry and pharmacology of the *Citrus* bioflavonoid hesperidin, *Phytotherapy Research*, **15**, 655-669.

GERRARD AW (1875) Alkaloid and active principle of jaborandi, *Pharmaceutical Journal*, **5**, 865.

GUERREIRO G, FERNANDES JB, VIEIRA PC, DA SILVA MFGF, RODRIGUES FILHO E, VICTOR SR, MAGALHÃES C, BUENO OC, HEBLING MJ, PAGNOCCA FC (2001) Sesquiterpenos e cumarinas bioativos de *Pilocarpus riedelianus*, In Livro de Resumos da 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

GOMEZ MA, SÁENZ MT, GARCIA MD, AHUMADA MC & DE LA PUERTA R (1997) Cytostatic activity againsty HEp-2 cells of methanolic extracts from *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. and two isolated principles, *Phytotherapy Research*, **11**, 240-242.

HABERLANDT G (1928) *Physiological plant anatomy*, 2nd edition. London, MacMillan *apud* FIGUEIREDO ACS (1992) *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*: produção de metabólitos secundários *in vivo* e *in vitro*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

- HARBONE (1982) Introduction to ecological biochemistry, 2nd edition. Academic Press.
- HE W, van PUYVELDE L, de KIMPE N, VERBRUGGEN L, ANTHONISSEN K, van der FLAAS M, BOSSLAERS J, MATHENGE SG & MUDIDA FP (2002) Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarense*, *Phytotherapy Research*, **16**, 66-70.
- HARDY ME (1875), Sur le jaborandi (*Pilocarpus pinnatus*), *Bulletin Société Chimie Paris*, **24**, 497-500 *apud* HOLMSTED B, WASSEN SH & SCHULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.
- HENRIQUES AT, KERBER VA & MORENO PRH (2000) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos, *In* Farmacognosia - da planta ao medicamento (SIMÕES CMO, *et al.*- organizadores), 2^a edição, 641-656.
- HOLMSTED B, WASSEN SH & SCHULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.
- HOROWITZ RM & GENTILI B (1963) Flavonoids of *Citrus*, *Tetrahedron*, **19**, 773-782.
- HOULT JR & PAYA M (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential, *General Pharmacology*, **27(4)**, 713-722.
- HUANG L, KASHIWADA Y, COSENTINO LM, FAN S, CHEN CH, MCPHAIL AT, FUJIOKA T, MIHASHI K & LEE KH (1994) Anti-Aids agents 15. Synthesis and anti-HIV activity of dihydroseselin and related analogs, *Journal of Medicinal Chemistry*, **37(23)**, 3947- 3955.

- JOWETT HAD (1900) Pilocarpine and the alkaloids of Jaborandi leaves, *Journal of Chemistry Society*, **77**, 473-499.
- KAASTRA RC (1977) New taxa and combinations in Rutaceae, *Acta Botanica Neerlandica*, **26 (6)**, 471-488.
- KANES K, TISSERAT B, BERHOW M & VANDERCOOK C (1993) Phenolic composition of various tissues of Rutaceae species, *Phytochemistry*, **324**, 967-974.
- KIM SR, PARK MJ, LEE MK, SUNG SH, PARK EJ, KIM J, KIM SY, OH TH, MARKELONIS GJ, KIM YC (2002) Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate, *Free Radical Biology & Medicine*, **32(7)**, 596-604.
- KOROLKOVAS A (1996) Medicamentos Oftálmicos *In* Dicionário Terapêutico Guanabara, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.
- LOUREIRO AA & SILVA MF (1968) *Catálogo das madeiras da Amazônia*, Belém, SUDAM, vol. 2, 261-266.
- MACÍAS FA, GALINDO JCC, MASSANET GM, RODRIGUEZ-LUIZ F & ZUBIA E (1993) Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves, *Journal of Chemical Ecology*, **19(7)**, 1371-1379.
- MAFEZOLI J, VIERA PC, FERNANDES JB, da SILVA MFGF & DE ALBUQUERQUE S (2000) *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*, *Journal of ethnopharmacology*, **73**, 335- 340.
- MARDER M & PALADINI AC (2002) GABA_A-receptor ligands of flavonoid structure, *Currents Topics in Medicinal Chemistry*, **2**, 853-863.

- MARDER M, VIOLA H, WASOWSKI C, FERNANDEZ S, MEDINA JH & PALADINI AC (2003) 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **75 (3)**, 537-545.
- MAKERSBY WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease, *Free Radical Biological Medicine*, **23**, 134-147.
- MANDERFELD MM, SCHAFER HW, DAVIDSON PM & ZOLLOTA EA, Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley, *Journal of Food Protection*, **60(1)**, 77-77 (1997)
- MEEPAGALA KM, STURTZ G & WEDGE DE (2002) Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var *dracunculus*, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **50(24)**, 6989-6992.
- MEDINA JH, VIOLA H, WOLFMAN C, MARDER M, WASOWKI C & CALVO D (1997) Flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands, *Neurochemistry Research*, **22(4)**, 419-425.
- MESTER I (1973) The occurrence of the alkaloids in Rutaceae, *Fitoterapia*, **44**, 123-152.
- MIDDLETON EJ (1984) The flavonoids, *Trends in Pharmacology Science*, **8**, 335-338.
- MILLER LJ (1993) Oral pilocarpine for radiation-induced xerostomia, *Cancer Bulletin (Houston)*, **45(6)**; 549-550.
- MOON EJ, LEE YM, LEE OH, LEE MJ, LEE SK, CHUNG MH, PARK YI, SUNG CK, CHOI JS & KIM KW (1999) A novel angiogenic factor derived from *Aloe vera* gel: β -sitosterol, a plant sterol, *Angiogenesis*, **3(2)**, 117-123.

- MÜLLER AH, DEGASPARI LRO, VIEIRA PC, da SILVA MFG, FERNANDES JB & PIRANI JR (1993) 3-methoxyfuranocoumarins from *Pilocarpus riedelianus*, *Phytochemistry*, **34(2)**; 585-586.
- MURAKAMI A, KUKI W, TAKAHASHI Y, YONEI H, NAKAMURA Y, OHTO Y, OHIGASHI H, KOSHIMIZU K (1997) Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes, *Japanese Journal of Cancer Research*, **88(5)**, 443-452.
- NEGRI G, SALATINO MLF, SALATINO A & SKORUPA LA (1998) An aromatic hydrocarbon from the foliar epicuticular wax of *Pilocarpus jaborandi*, *Phytochemistry*, **49(1)**, 127-129.
- NGWENDSON JN, BEDIR E, EFANGE SM, OKUNJI CO, IWU MM, SCHUSTER BG & KHAN IA. (2003) Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects, *Pharmazie*, **58(8)**, 587-589.
- OGATA M, HOSHI M, URANO S & ENDO T (2000) Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds, *Chemical Pharmacology Bulletin* (Tokio), **48(10)**, 1467-1469.
- PARK IK, LEE HS, LEE SG, PARK JD & AHN YJ (2000) Insecticidal and fumigant activities of *Connamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: attelabidae), *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48(6)**, 2528-2531.
- PATHAK D, PATHAK K & SINGLA A (1991) Flavonoids as medical agents - recent advances, *Fitoterapia*, **LXII**, 317-389.

- PAVÃO F, CASTILHO MS, PUPO MT, DIAS RLA, CORREA AG, FERNANDES JB, SILVA MFGF, MAFEZOLI J, VIEIRA PC & OLIVA G (2002) Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution, *FEBS Letters*, **520**; 13-17.
- PAYO HILL A, DOMINICIS ME, OQUENDO M & SARDUY R (1995) Obtención de pilocarpina a partir de *Pilocarpus racemosus* Vahl, *Revista Cubana de Farmacia*.
- PINHEIRO CUB (1997) Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop, *Economic Botany*, **51(1)**, 49-58.
- PIRANI JR (1999) Estudos Taxonômicos em Rutaceae: Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae). Análise cladística de Pteleinae. Sinópsese de Rutaceae do Brasil. Tese de Livre docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- POTER DM & ELIAS TS (1979) Flora of Panama. Rutaceae, *Annals of Missouri Botany Garden*, **66**, 123-164.
- PYMAN, FL (1912) Pilocarpine: a new alkaloid from *Pilocarpus microphyllus*, *Journal of Chemistry Society*, **101**, 2206-2271.
- PRIYADARSINI KI, GUHA SN & RAO MN (1998) Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols, *Free Radical Biological Medicine*, **24(6)**, 933-941.

- RIBA J, RODRIGUEZ-FORNELLS A & BARBANOJ MJ (2002) Effects of ayahuasca on sensory and sensorimotor gating in humans as measured by P50 suppression and prepulse inhibition of the startle reflex, respectively, *Psychopharmacology* (Berl), **165(1)**, 18-28.
- SANTOS FA, CUNHA GMA, VIANE GSB, RAO VSN, MANOEL AN & SILVEIRA ER (1997) Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants, *Phytotherapy Research*, **11**, 67-69.
- SANTOS AP, CORNÉLIO ML, LIMBERGER RP, APEL MA, HENRIQUES AT & MORENO PRH (2004) Analysis of the Volatile Oil from *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire (Rutaceae) Leaves by GC/MS, *Flavour and Fragrance Journal*.
- SAUVAIN M, KUNESH N, POISSON J, GANTIER JC, GAYRAL P, DEDET JP (1996) Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dolicarpus dentatus* (Dilleniaceae), *Phytotherapy Research*, **10**, 1-4.
- SINGH B & SINGH S (2003) Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth, *Phytotherapy Research*, **17(7)**, 814-816.
- SHAW CY, CHEN CH, HSU CC, CHEN CC & TSAI YC (2003) Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*, *Phytotherapy Research*, **17(7)**, 823-825.
- SKORUPA LA (1996) Revisão taxonômica de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). Tese de doutoramento. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SKORUPA LA, SALATINO MLF & SALATINO A (1998) Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic meaning, *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 655-662.

de SOUZA RC, FERNANDES JB, VIEIRA PC, Da SILVA MFGF, RODRIGUES FILHO E, PIRANI JR (2003) Constituintes químicos de *Pilocarpus grandiflorus* (Rutaceae), *In* Livro de Resumos da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

de SOUZA RC, FERNANDES JB, VIEIRA PC, Da SILVA MFGF, RODRIGUES FILHO E, BUENO OC, PAGNOCCA, HEBLING MJA, ZANCUL MS (2002). Alcalóide furoquinolínico de *Pilocarpus grandiflorus* e sua ação sobre o fungo simbiote se formigas cortadeiras, *In* Livro de Resumos da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

SU TL, LIN FW, TENG CM, CHEN KT & WU TS (1998) Antiplatelet aggregation principles from the stem and root bark of *Melicope triphylla*, *Phytotherapy Research*, **12**, S74-S76

TEDESCHI E, KAMIONSKY J, FACKLER S & SAREL S (1973) The isolation of pure pilosine and epi-isopilosine from leaves of *Pilocarpus jaborandi*, *Israel Journal of Chemistry*, **11(5)**, 731-733.

TENG CM, LI HL, YU SM, WU TS, HUANG SC, PENG IS, HUANG TFASIA (1992) Ca⁺² channel blocking effects of 3 coumarin compounds, isolated from *Citrus grandis*, in rat thoracic aorta, *Pacific Journal of Pharmacology*, **7 (2)**, 115-120.

THIRUGNANASAMBANTHAN P, VISWANATHAN S, MYTHIRAYEE C, KRISHNAMURTY V, RAMACHANDRAN S & KAMESWARAN L (1990) Analgesic activity of certain flavone derivatives: a structure-activity study, *Journal of Ethnopharmacology*, **28**, 207-214.

- VALDEZ IH, WOLFF A, ATKINSON JC, MACYNSKY AA & FOX PC (1993) Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction, *Cancer (Philadelphia)*, **71(5)**, 1848-1851.
- VILLASENOR IM, ANGELADA J, CANLAS AP & ECHEGOYEN R (2002) Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside, *Phytotherapy Research*, **16(5)**, 417-421.
- VOIGTLÄNDER HW & ROSENBERG W (1959) Über der isopilosin und pilosin, *Archiv der Pharmazie*, **292**, 579-585.
- WEBER U (1876) Ueber die Wirkung des Pilocarpium muriaticum, *Central. Med. Wiss.*, **44**, 409-422 *apud* HOLMSTED B, WASSEN SH & SCHULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.
- YU SM, KO FN, SU MJ, WU TS, WANG ML, HUANG TF, TENG CM.(1992) Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by fraxinellone and dictamine isolated from the Chinese herb *Dictamnus dasycarpus* Turcz: comparison with cromakalim and Ca^{2+} channel blockers, *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, **345(3)**, 349-555.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1. *Pilocarpus pennatifolius*

Pilocarpus pennatifolius Lemm. (figura 2.1) é uma espécie nativa da América do Sul, encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina. Espécies do gênero *Pilocarpus* são conhecidas genericamente por jaborandi (HOLMSTED *et al.*, 1975) e, de acordo com CORRÊA (1969), esta terminologia refere-se a "diversas plantas, todas medicinais, das Rutaceae e Piperaceae". A espécie *Pilocarpus pennatifolius* é ainda conhecida por jaborandi do Paraguai, ibirataí, crista-de-peru ou pimenta-de-cachorro.

Figura 2.1: *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire: detalhe da folhas, flores, inflorescência, sementes (esquerda)¹ e árvore de *P. pennatifolius* (direita)².

¹ *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire: detalhe da folhas, flores, inflorescência e sementes. <http://ridgwaydb.mobot.org/mobot/rarebooks/page.asp?relation=QK99A1K6318831914B1&identifier=0386>

² Árvore de *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/jaborandipic.htm>

Atualmente, devido à devastação e ao extrativismo (por serem plantas de uso medicinal), essa e outras espécies de *Pilocarpus* encontram-se em risco de extinção (IBAMA, 1992). Logo, para evitar o desaparecimento dessas espécies, faz-se necessário buscar alternativas para a produção da pilocarpina **(1)**, o metabólito responsável pelas atividades farmacológicas mais importantes exibidas pelo jaborandi.

(1)

Uma destas alternativas é o cultivo *in vitro* de espécies de *Pilocarpus*. O estabelecimento de culturas de tecidos vegetais tem-se mostrado uma eficiente ferramenta na obtenção de metabólitos secundários de interesse e na manutenção de espécies vegetais (de CASTRO FRANÇA, 2000).

O estudo da rota biossintética dos metabólitos secundários foi impulsionado a partir do isolamento das enzimas envolvidas na síntese destas substâncias nas plantas (ZENK, 1991). Uma vez conhecidas as enzimas envolvidas em uma rota biossintética e o seu mecanismo, é possível atuar sobre sua regulação de modo a priorizar a produção e/ou acúmulo de um metabólito de interesse. A rota biossintética que origina os

alcalóides imidazólicos, entre os quais a pilocarpina **(1)**, ainda não foi elucidada (ROBINSON, 1955; BROCHMANN-HANSSEN, 1975).

2.2. Objetivos

Considerando-se a importância das espécies de *Pilocarpus* como fonte do alcalóide pilocarpina **(1)** e a necessidade de estabelecerem-se novas rotas para a produção desta substância, os objetivos principais deste trabalho foram os seguintes:

1. Estabelecer a cultura *in vitro* de *Pilocarpus pennatifolius*
2. Monitorar a produção do alcalóide pilocarpina em cultura de células
3. Estudar a biossíntese da pilocarpina através de ensaios enzimáticos

Além disso, como uma maneira de contribuir para a fitoquímica deste gênero, foi realizada a análise do óleo essencial extraído das folhas de *P. pennatifolius*.

Referências bibliográficas

De CASTRO FRANÇA S (2000) Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias bioativas, *In Farmacognosia - da planta ao medicamento* (CMO SIMÕES, EP SCHENKEL, G GOSMANN, JCP DE MELLO, LA MENTZ, PR PETROVICK, organizadores), 101-121. Editora da UFSC, Florianópolis.

CORRÊA MP (1969) *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol. 4, 360-369.

HOLMSTED B, WASSEN SH & SCHULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.

IBAMA - Portaria nº 37-N de 3 de abril de 1992.

CAPÍTULO 3

Extração de pilocarpina a partir de folhas de
P. pennatifolius

3.1. Extração de alcalóides em espécies vegetais

Alcalóides podem ser encontrados em praticamente todos os tipos de tecidos vegetais. Entretanto, a concentração pode variar nos diferentes órgãos da planta de acordo com o estágio de desenvolvimento ou época do ano. Em plantas jovens, possivelmente por seu papel na defesa contra predadores, são encontrados em toda a extensão. Durante a floração, foi observada maior produção em algumas espécies dos gêneros *Papaver*, *Senecio* e *Corydalis* (MANSKE, 1950).

A obtenção de extratos de alcalóides totais, livres de outros metabólitos secundários, não é a parte mais complexa do trabalho com esta classe de produtos naturais. Sem dúvida a etapa mais laboriosa, e invariavelmente necessária, é a separação de cada constituinte de uma mistura, uma vez que a grande maioria das plantas não sintetiza exclusivamente um único alcalóide (CORDELL, 1981).

As metodologias para extração de alcalóides geralmente são iniciadas pela extração do material vegetal com um solvente orgânico apolar (éter de petróleo, hexano), visando a remoção de ácidos graxos, clorofila e outros pigmentos. A partir desse ponto, são realizadas extrações com solventes orgânicos de média a alta polaridade (clorofórmio, diclorometano, metanol ou etanol). Levando em consideração o caráter básico dos alcalóides, podem ser utilizados dois métodos de extração: no primeiro emprega-se uma solução ácida para

converter estas substâncias em seus respectivos sais e no segundo, utiliza-se uma solução alcalina para eliminar outras substâncias polares.

Algumas desvantagens são mencionadas quando a extração é feita a partir da acidificação do extrato orgânico (MANSKEE, 1950; COURTOIS, 1996). A principal delas é a extração de outras substâncias, como por exemplo, amido, açúcares e proteínas, responsáveis pela formação de emulsões estáveis que dificultam realização de etapas posteriores. Contudo, este procedimento parece apresentar os melhores resultados quantitativos (MAAT & BEYERMAN, 1983).

3.1.1. Extração de pilocarpina em espécies de *Pilocarpus*

Alcalóides em espécies de *Pilocarpus* foram inicialmente relatados por BYANSON (1875) sendo a pilocarpina **(1)** o primeiro constituinte imidazólico isolado a partir das folhas de *P. jaborandi*, por HARDY (1875) e GERRARD (1875), separadamente. Rapidamente verificou-se que esta substância era a principal responsável pelas propriedades farmacológicas exibidas pelo jaborandi. Em 1876, foi determinada sua atividade miótica que propiciou seu uso em preparações oftálmicas (HOLMSTED, 1979). A partir daí, a extração de pilocarpina em grandes quantidades tornou-se um procedimento economicamente importante.

A extração de pilocarpina em larga escala foi descrita pela primeira vez por Chemnitius, em 1928 (MAAT & BEYERMAN, 1983), e acredita-se que este método seja a base para os processos industriais utilizados até

hoje. O principal problema no isolamento da pilocarpina é a sua degradação, que leva à formação de produtos de epimerização e hidrólise do anel lactônico (NUNES *et al.*, 1974; NEVILLE *et al.*, 1976). Os produtos originados são a isopilocarpina **(2)** e os ácidos pilocárpico **(3)** e isopilorcárpico **(4)** (artefatos formados durante a extração).

Figura 3.1: Possíveis reações de degradação da pilocarpina **(1)**

3.1.2. Técnicas analíticas para determinação de pilocarpina

Muitas metodologias foram descritas para a determinação de pilocarpina em soluções oftálmicas. Já foram utilizadas técnicas como cromatografia à gás (COURTOIS *et al.*, 1996; BIRK *et al.*, 1998), espectrometria de massas, espectrofotometria-polarimetria de UV (SCOTT, 1981) e cromatografia líquida de alta eficiência (DRAKE *et al.*, 1982; WEAVER *et al.*, 1992; AROMDEE, 1996; FAN *et al.*, 1996; van der

MERBEL, *et al.*, 1998). Além dessas, também foi descrito o uso de RMN de ^1H e de ^{13}C na análise das reações de epimerização e degradação (NUNES *et al.*, 1974, NEVILLE *et al.*, 1976).

Muitas vantagens e desvantagens são abordadas quanto ao uso da CLAE na determinação de pilocarpina. Algumas delas são: a baixa sensibilidade à pequena quantidade de isopilocarpina, a alta pressão de retorno na coluna devido ao uso de tampões e a diminuição do tempo de vida útil da coluna (FAN *et al.*, 1996). As principais vantagens apontadas no uso da CLAE na determinação de pilocarpina são a sensibilidade e o curto tempo de análise.

O uso da cromatografia à gás associada à espectrometria de massa é bastante difundido na análise de pilocarpina e outros alcalóides imidazólicos. Esta técnica oferece resultados reprodutíveis, além de ser mais rápida e simples do que a CLAE.

Neste capítulo, serão analisadas algumas metodologias para extração e determinação de pilocarpina. O objetivo desta etapa é a escolha das condições mais adequadas para a obtenção de pilocarpina a partir cultura de células *in vitro* de *Pilocarpus pennatifolius*.

3.2. Experimental

Três metodologias de extração de alcalóides, descritas na literatura, foram testadas quali- e quantitativamente, quanto à obtenção da pilocarpina (UGAZ, 1994; REUTHER, 1991; CHIALE *et al.*, 1990). Cada extração foi realizada em triplicata e a determinação qualitativa de alcalóides no extrato bruto foi feita através dos reagentes de Dragendorff, Bouchardat e Mayer, preparados de acordo com a literatura (UGAZ, 1994).

Optou-se por realizar a determinação quantitativa de pilocarpina por cromatografia à gás, de acordo com metodologia desenvolvida para o extrato de alcalóides totais.

3.2.1. Extração de pilocarpina de folhas de *P. pennatifolius*

Método A (UGAZ, 1994)

10 g de folhas de *P. pennatifolius* secas (TA) e moídas foram extraídas sob agitação magnética com 30 mL de H_3PO_4 0,67 mol/L (pH= 2) durante 30 minutos. Recolheu-se o extrato aquoso ácido em um funil de separação, realizou-se três extrações com hexano (30 mL). A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa foi alcalinizada com NH_4OH concentrado até pH= 10. Esta fase aquosa básica foi extraída com CHCl_3 (4 x 50 mL ou até que o teste com os reativos para alcalóides fossem

negativos). A fase aquosa isenta de alcalóides foi desprezada. A fase orgânica foi concentrada a vácuo, fornecendo o extrato de alcalóides totais, cuja massa foi determinada para a avaliação do rendimento.

Método B (REUTHER, 1991)

10 g de folhas de *P. pennatifolius* foram extraídas com 25 mL de CHCl_3 e 0,78 mL de uma solução de NH_4OH 10 % (v/v), durante 20 minutos. A fase orgânica alcalina foi particionada (3 vezes) com 7,8 mL HCl 5 % (v/v), em funil de separação. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa alcalinizada com NH_4OH concentrado até pH 10 e extraída com 7,8 mL de CHCl_3 (até teste negativo com reativos para alcalóides). A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica concentrada a vácuo, fornecendo o extrato de alcalóides totais e este, conforme descrito anteriormente, teve sua massa determinada para o cálculo do rendimento.

Método C (CHIALE *et al.*, 1990)

10 g de folhas secas e moídas de *P. pennatifolius* foram extraídas com 40 mL de álcool etílico durante 30 minutos (3 vezes ou até teste negativo com reativos para alcalóides). As fases alcoólicas foram então concentradas a vácuo a 40°C. Adicionam-se, ao resíduo formado, 10 mL de uma solução de HCl 5% (v/v), agitando-se até a dissolução completa.

O extrato aquoso ácido foi transferido para um funil de separação e extraído com hexano (3 x 10 mL). A fase orgânica foi separada e descartada, enquanto a fase aquosa foi alcalinizada com NH_4OH concentrado até $\text{pH} = 10$. Esta fase aquosa alcalina foi extraída com CHCl_3 (5 x 20 mL). As fases clorofórmicas foram reunidas e secas em Na_2SO_4 anidro e, finalmente, concentradas a vácuo, sendo obtida uma mistura de alcalóides totais cuja massa foi determinada para cálculo de rendimento.

3.2.2. Determinação de pilocarpina por CG

A determinação de pilocarpina nos extratos de alcalóides totais por cromatografia à gás foi realizada em um cromatógrafo HP 5890 series II, equipado com detetor por ionização de chama (FID), injetor automático HP 7673 e integrador eletrônico HP 3396a. Foi utilizada uma coluna capilar apolar HP-5 (5% fenil 95% metilsilicone. Dimensões: 30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 μm espessura do filme) e hélio ultrapuro como gás de arraste. O extrato foi dissolvido em metanol, sendo o volume de injeção de 3 μL . A programação de temperaturas foi a seguinte:

Temperatura inicial:	150 °C (5 min)
Temperatura do injetor:	275 °C
Temperatura do detetor:	325 °C
Taxa de aquecimento:	2,5 °C/min
Temperatura final:	220 °C (5 min)

A pilocarpina foi identificada comparando-se os cromatogramas de cada um dos extratos com o cromatograma obtido para o padrão cloridrato de pilocarpina (Merck). A curva analítica para quantificação do alcalóide foi construída a partir de injeções do padrão e um padrão interno (1,10-decanodiol, Aldrich).

Figura 3.2: Curva analítica para o padrão cloridrato de pilocarpina obtida por CG

3.3. Resultados e discussão

Os métodos de extração foram inicialmente avaliados quantitativamente quanto à massa de alcalóides totais extraída. A tabela abaixo resume os resultados encontrados:

Tabela 3.1: Rendimento das extrações de alcalóides de folhas de *P. pennatifolius* de acordo com os métodos A, B e C

Método	Massa do extrato total (mg)			Média	Rendimento (% m/m)
A	158,3	156,2	162,8	159,1 ± 3,4	1,59
B	169,9	174,8	178,1	174,3 ± 4,1	1,74
C	127,7	112,6	129,0	123,1 ± 9,1	1,23

Através da análise dos dados da tabela acima podemos observar que o método B permitiu a obtenção da maior massa de alcalóides totais. Este resultado está de acordo com outros dados da literatura (REUTHER, 1991; COURTOIS, 1996), que ressaltam a importância da etapa de alcalinização do extrato orgânico.

A fim de se comparar a eficiência de cada extração, a análise qualitativa destes extratos foi feita por CG. O tempo de retenção para o padrão de cloridrato de pilocarpina, nas condições cromatográficas descritas (pág. 69), foi de 21 minutos. Os cromatogramas (figura 3.3) a seguir ilustram o perfil dos extratos de alcalóides totais obtidos para cada uma das metodologias de extração empregadas:

Figura 3.3: Cromatogramas obtidos através da análise por CG dos extratos de alcalóides totais de *P. pennatifolius*, obtidos pelos métodos de extração A, B e C, respectivamente. Coluna: HP-5 (5% fenil 95% metilsilicone). Dimensões: 30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 μ m espessura do filme. Gás de arraste: He ultrapuro. Temperatura inicial: 150 °C (5 min). Temperatura final: 220 °C (5 min). Taxa de aquecimento: 2,5 °C/min. Temperatura do injetor: 275 °C. Temperatura do detetor: 325 °C.

Podemos observar através do cromatograma A (figura 3.3) que a primeira metodologia de extração forneceu uma quantidade maior de pilocarpina (maior razão entre a áreas do pico referente à pilocarpina e do padrão interno). Também foram observadas outras substâncias cujo tempo de retenção é muito próximo ao da pilocarpina. Esta última observação tornou este procedimento pouco interessante quando comparado com o segundo método de extração (figura 3.3b). O cromatograma de alcalóides totais para o extrato obtido segundo este método B mostrou maior seletividade na extração de pilocarpina. Nota-se também que a quantidade de isopilocarpina ($t_r = 20,4$ min) e dos artefatos (ácidos pilocárpico e isopilocárpico) é bem menor. Analisando-se o cromatograma do extrato obtido de acordo com procedimento C, verifica-se que houve isomerização completa da pilocarpina à isopilocarpina durante a extração (figura 3.3c).

As concentrações de pilocarpina nos extratos determinadas por CG foram as seguintes:

Tabela 3.2: Eficiência das extrações A, B e C em relação à quantidade de pilocarpina extraída por massa de folhas

Método	Pilocarpina (mg/ g)
A	$1,07 \pm 0,49$
B	$1,01 \pm 0,21$
C	n.d.

n.d. = não detectada

3.4. Conclusão

A partir de três procedimentos descritos na literatura verificou-se que apenas um forneceu melhores resultados quali- e quantitativos quanto à extração de pilocarpina. Observou-se que a etapa de alcalinização do extrato orgânico inicial com NH_4OH forneceu um extrato de alcalóides totais praticamente isento de produtos secundários formados devido à degradação da pilocarpina.

A concentração de pilocarpina nos extratos obtidos a partir das folhas de *P. pennatifolius* foi determinada por CG e as quantidades do alcalóide, obtidas de acordo com os métodos de extração A e B, estão dentro da faixa descrita na literatura para esta espécie (0,8- 1,6 mg de pilocarpina/ g de folhas) (BATTERSBY & OPPENSAW, 1953).

3.5. Referências bibliográficas

- AROMDEE C, FAWCETT JP & LEDGER R (1996) Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for pilocarpine in biological fluids using fluorescence derivatisation, *Journal of Chromatography B*, **667**, 313-318.
- BATTERSBY AR & OPENSHAW HT (1953) The imidazole alkaloids *In* The Alkaloids (MANSKE RHT & HOLMES HL, editors), III, 202- 207.
- BIRK KL, DRU JD, HSIEH JYK, DEMETRIADES JL, MATUSZENSKI BK, BAYNE WF, WOOLF EJ, CAIRMS AM, ROGERS JD & MUSSON DG (1998) Determination of pilocarpic acid in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection, *Journal of Chromatography B*, **719**, 93-102.
- BYANSON M (1875) *Pharmaceutical Journal*, **5(3)**, 826 *apud* HOLMSTED B, WASSEN SH & SHCULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of ethnopharmacology*, **1**, 3-21.
- CHIALE CA, CABRERA JL & JULIANI HR (1990), N^αCinnamoylhistamine derivatives from *Lycium cestroides*, *Phytochemistry*, **29(2)**, 668.
- CORDELL GA (1981) *Introdution to Alkaloids - A Biogenetic Approach*. John-Willey & Sons.
- COURTOIS D, PETIARD V & TOUCHE A (1996) *Pilocarpine production process*. USPTO 5, 569, 593.

DRAKE MV, O'DONNELL JJ & SANDMAN RP (1982) Analysis of commercial pilocarpine preparations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **71(3)**, 358- 359.

FAN TY, WALL GM, STERNITZKE K, BASS L, MORTON AB & MUEGGE E (1996) Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions. Importance of octadecylsilane column choice, *Journal Chromatography A*, **740**, 289- 295.

GERARD AW (1875) *Pharmaceutical Journal*, **5(3)**, 865 *apud* HOLMSTED B, WASSEN SH & SHCULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.

HARDY E (1875) *Bulletin Societé Chimique France*, **24(2)**, 497 *apud* HOLMSTED B, WASSEN SH & SHCULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.

HOLMSTED B, WASSEN SH & SHCULTES RE (1979) Jaborandi: An interdisciplinary appraisal, *Journal of Ethnopharmacology*, **1**, 3-21.

MAAT L & BEYERMAN HC (1983) The imidazole alkaloids *In* The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology (A BROSSI, editor), XXII, 282- 333.

MANSKE RHF (1950) Sources of alkaloids and their isolation, *In* Alkaloids Chemistry and Physiology, **1**, 1-14.

van der MERBEL NC, TINKE AP, OOTERHUIS B, JONKMAN JHG & BOHLE JF (1998) Determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in human plasma urine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography B*, **708**, 103-112.

NEVILLE GA, HASAN FB & SMITH ICP (1976) Stereoselective epimerization of pilocarpine in aqueous solution as determined by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Canadian Journal of Chemistry*, **54**, 2094-2100.

NUNES MA & BROCHMANN-HANSEN E (1974) Hydrolysis and epimerization kinetics of pilocarpine in aqueous solution, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **63(5)**, 716-721.

REUTHER G (1991) *Process for the preparation of pilocarpine from in vitro cultures of Pilocarpus*, USPTO 5, 059, 531.

SCOTT BS, DUNN DL & DORSEY ED (1981) Analysis of pilocarpine and isopilocarpine in ophthalmic solutions by UV spectrophotometry-polarimetry, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **70(9)**, 1046-1048.

UGAZ OL (1994) Reacciones de coloración e precipitación para grupos funcionales, *In Investigación Fitoquímica - metodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad Catolica del Peru, Peru.

WEAVER ML, TANZER JM & KRAMER PA (1992) High-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine in plasma, *Journal of Chromatography*, **581**, 293-296.

CAPÍTULO 4

**Estabelecimento da cultura *in vitro* de
P. pennatifolius Lemm. e determinação do
alcalóide pilocarpina *in vitro***

4.1. Cultura de tecidos *in vitro* na produção de metabólitos secundários

O estabelecimento de culturas *in vitro* foi inicialmente empregado como uma maneira de demonstrar a longevidade de meristemas de plantas (BANTHORPE, 1994). Com o passar do tempo, as técnicas de cultivo *in vitro* tiveram seu potencial expandido graças à descoberta da totipotência das células vegetais, isto é, cada célula isolada é capaz de regenerar uma planta inteira, não importando o órgão de origem (CONSTABEL, 1987, BANTHORPE, 1994). As características fenotípicas podem ser expressas sob determinadas condições de nutrientes (nitrogênio, fósforo e outros), reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), luminosidade, etc.

Na década de 1970, surgiram os primeiros relatos sobre a possível utilização de culturas de tecidos vegetais na produção de metabólitos secundários de interesse comercial (BANTHORPE, 1994). Desde então, o estabelecimento de culturas de espécies vegetais *in vitro*, visando o acúmulo de metabólitos secundários, vem crescendo cada vez mais.

O número e a variedade de substâncias que podem ser produzidas em cultivo *in vitro* é bastante grande, sendo que muitas dessas substâncias apresentam importantes propriedades farmacológicas (BERLIN, 1997). Dentre esses metabólitos, podemos destacar os alcalóides, as naftoquinonas e antraquinonas, as antocianinas, os terpenos e alguns compostos esteroidais (tabela 4.1).

Tabela 4.1: Alguns metabólitos secundários produzidos em cultura de tecidos vegetais

Substância	Espécie vegetal	Referência
Alcalóides		
atropina	<i>Atropa belladonna</i>	HARTMANN <i>et al.</i> , 1986
berberina	<i>Coptis japonica</i>	SATO & YAMADA, 1984
cafeína	<i>Coffea arabica</i>	FRISCHKNECHT <i>et al.</i> , 1977
nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	SPEAKE <i>et al.</i> , 1964 MIZUSAKI <i>et al.</i> , 1965
raucafricina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	SCHÜBEL <i>et al.</i> , 1989
sanguinarina	<i>Papaver somniferum</i>	FURUYA <i>et al.</i> , 1972 ELIERT <i>et al.</i> , 1985
solasodina	<i>Solanum nigrum</i>	BHATT <i>et al.</i> , 1983
taxol	<i>Taxus spp.</i>	FETT-NETO <i>et al.</i> , 1993, 1994
vimblastina, vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	SCHIEL & BERLIN, 1987 SMITH <i>et al.</i> , 1987
Antocianinas e betalainas		
amarantina	<i>Chenopodium rubrum</i>	BERLIN <i>et al.</i> , 1986
betanina	<i>Phytolaca americana</i>	SAKUTA <i>et al.</i> , 1987
celosianina	<i>Amaranthus tricolor</i>	BIANCO-COLOMAS & HUGUES, 1990
cianidina-3-arabinosídeo	<i>Euphorbia millii</i>	YAMAMOTO, 1991

Tabela 4.1: Alguns metabólitos secundários produzidos em cultura de tecidos vegetais (continuação)

Substância	Espécie	Referência
Esteróides		
colesterol diosgenina	<i>Discorea deltoidea</i>	KAUL & STABA, 1968
panaxadiol	<i>Panax ginseng</i>	CHARLWOOD <i>et al.</i> , 1990
sitosterol	<i>Yucca gloriosa</i>	GOGOBERIDZE <i>et al.</i> , 1992
Terpenóides		
anetol	<i>Pimpinella anisum</i>	SALEM & CHARLWOOD, 1995
limoneno felandreno	<i>Pelargonium</i> spp.	LIS-BALCHIN & ROTH, 2000
mentona mentol	<i>Menta piperita</i>	KIM <i>et al.</i> , 1995
Propenilfenóis		
capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	LINDSAY & YEOMAN, 1984
Naftoquinonas e antraquinonas		
ubiquinona-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	FONTANEL & TABATA, 1987
chiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	FUJITA & TABATA, 1986
lucidina	<i>Morinda citrifolia</i>	ZENK <i>et al.</i> , 1975

4.1.1.1. Produção de pilocarpina *in vitro*

A produção em larga escala de pilocarpina é uma questão de grande interesse para as indústrias farmacêuticas. Duas razões principais justificam essa busca:

- a. toda pilocarpina utilizada como fármaco é de origem vegetal e, com isso, a produção está sujeita a fatores climáticos e edáficos (PINHEIRO, 1997);
- b. as propostas sintéticas (DEGRAW, 1972; NOORDAN, 1979; COMPAGNONE & RAPOPORT, 1986; HORNE *et al.*, 1993) ainda não são economicamente viáveis devido ao baixo rendimento global após várias etapas.

Alguns trabalhos a respeito do cultivo *in vitro* de *P. microphyllus* são encontrados na literatura. REUTER (1991) descreveu a produção de pilocarpina *in vitro* através de culturas de plântulas e de células em suspensão. Entretanto, devido ao curto prazo de viabilidade das sementes de *Pilocarpus* spp. (cerca de 9 dias) e o desenvolvimento lento observado para as plântulas, por se tratar de uma espécie lenhosa, esse tipo de cultivo *in vitro* torna-se pouco atraente.

O estabelecimento de culturas de raízes modificadas foi descrito por COURTOIS *et al.* (1996), a partir da infecção da cultura de calos com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes*. A produção de pilocarpina relatada pelos autores foi da mesma ordem de grandeza que a encontrada na planta. Em casos nos quais as raízes são o sítio de produção *in vivo*, esta

técnica pode ser utilizada com sucesso no acúmulo de metabólitos *in vitro* em grandes quantidades (FLORES *et al.*, 1999).

Neste capítulo foram relatadas as etapas desenvolvidas no estabelecimento da cultura de células *in vitro* de uma espécie de *Pilocarpus*. Esta cultura foi caracterizada por RMN¹H, quanto ao acúmulo de aminoácidos (visando observar a presença do aminoácido *L*-histidina, um possível precursor do núcleo imidazólico da pilocarpina) e carboidratos. O monitoramento da produção de pilocarpina, durante o desenvolvimento da cultura, foi realizado de acordo com o **método C** de extração descrito no capítulo 3 (pág. 68).

4.2. Experimental

4.2.1. Material vegetal

No estabelecimento das culturas *in vitro* foram utilizadas folhas de um espécimen de *P. pennatifolius* Lemm. (Parque Ecológico da UNICAMP), mantido na casa de vegetação do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O espécimen voucher encontra-se depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob o número 30683.

Todo o material da cultura de células foi esterilizado em autoclave vertical a 120 kgf/cm² de pressão durante 20 minutos, sendo o manuseio feito em câmara de fluxo laminar horizontal.

4.2.2. Protocolos para desinfecção das folhas de *Pilocarpus pennatifolius*

O material vegetal disponível foi proveniente de casa de vegetação, sendo necessário, inicialmente, realizar a descontaminação das folhas para a indução de calos.

As folhas de *P. pennatifolius* foram lavadas previamente em água corrente com detergente neutro. Foram utilizadas como soluções para descontaminação dos explantes: HgCl₂ (0,5 e 2% m/V), álcool etílico (70% v/v) e solução de NaOCl comercial (2,0- 2,5% de cloro ativo). O tempo de imersão em cada solução de esterilização variou de 1 a 20

minutos e, entre cada uma dessas soluções, o material foi enxaguado com água estéril por 3 vezes. As tentativas de descontaminação das folhas estão resumidas na tabela 4.2:

Tabela 4.2: Protocolos para descontaminação das folhas de *P. pennatifolius*

Soluções	Tempo de imersão (min)		
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Álcool etílico 70% (v/v)	5	1	5
HgCl ₂ 2% (p/v)	-	5	-
HgCl ₂ 0,5% (p/v)	-	-	1
NaOCl comercial (2,0- 2,5% de cloro ativo)	10/ 15/ 20	5/ 10	5

4.2.3. Elaboração dos meios de cultura para indução de calos

Quanto à composição basal dos sais e suplementos orgânicos, os meios semi-sólidos foram preparados de acordo com MURASHIGE & SKOOG (1962)- meio MS- e GAMBORG *et al.* (1968)- meio B5. O pH foi ajustado entre 5,6- 5,9 com soluções de HCl e NaOH 0,1 e 1 mol/L. Os reguladores de crescimento utilizados foram BAP, IAA, NAA, 2,4-D, Picloram e Cinetina. Como fonte de carbono nos meios semi-sólidos foi utilizada a sacarose na concentração de 30 g/L para o meio MS e 40 g/L para o meio B5.

Inicialmente foram formulados cerca de 50 meios de cultura semi-sólidos para a indução de calos (tabela 4.3). Pedacos das folhas ($\pm 1\text{cm}^2$

de área) ou das nervuras centrais das folhas (± 1 cm) de *P. pennatifolius* foram utilizados como explantes (parte do tecido vegetal que originará a cultura de células). No decorrer dos experimentos foram realizadas modificações a partir dos meios já formulados, de modo a otimizar a friabilidade e a taxa de crescimento dos calos obtidos.

O uso de uma solução antioxidante, na preparação dos meios, tornou-se necessário devido ao escurecimento observado nos explantes após duas semanas de plaqueamento. Esta solução foi preparada com os ácidos cítrico e ascórbico nas concentrações de 100 mg/L e 150 mg/L, respectivamente.

4.2.4. Influência do regime de luminosidade na indução de calos de *P. pennatifolius*

O efeito da incidência de luz, na indução de calos de *P. pennatifolius*, foi analisado mantendo-se metade das culturas em fotoperíodo (regime de 12 h, $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e metade constantemente no escuro. A temperatura durante a indução de calos foi de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 4.3: Algumas formulações de meios de cultura sólidos para indução e manutenção de calos de *P. pennatifolius* Lemm.

meio	saís	Reguladores de crescimento (mg/L)					
		NAA	BAP	CIN	IAA	2,4-D	Picloram
2 ^{a, e}	MS ^c	0,50	0,11	-	-	-	-
3 ^{a, e}	MS ^c	0,50	0,60	-	-	-	-
42 ^{a, e}	B5 ^d	-	-	-	-	0,10	-
43 ^{a, e}	B5 ^d	-	-	0,10	-	0,10	-
66 ^{b, e}	MS ^c	0,50	0,11	-	0,18	0,11	0,03
75 ^{b, e}	MS ^c	0,50	0,11	-	0,18	0,55	0,06
77 ^{b, e}	MS ^c	5,63	0,11	-	0,56	-	-
78 ^{b, e}	MS ^c	-	0,11	-	0,56	-	0,14

^a meio sem antioxidante.

^b meio com antioxidante.

^c MURASHIGE T & SKOOG F (1962) *Physiology Plantarun*, **15**, 473-497.

^d GAMBORG OL, MILLER RA & OJIMA K (1968) *Experimental Cell Research*, **50**, 151-158.

^e Concentração de sacarose: 30 g/ L (MS) e 40 g/L (B5).

4.2.5. Curvas de crescimento para calos de *P. pennatifolius* Lemm.

As curvas de crescimento da cultura de células de *P. pennatifolius* foram construídas a partir das massas fresca (mf) e seca (ms) dos calos obtidos. A massa seca foi obtida por liofilização do material vegetal (24 - 30 h) e as determinações foram realizadas num período de 40 dias. A taxa de crescimento foi determinada a partir do tempo de duplicação da massa (seca ou fresca) da cultura de células.

4.2.6. Caracterização da cultura de células de *P. pennatifolius* por RMN¹H

A cultura de calos foi analisada quanto aos aminoácidos e carboidratos acumulados intracelularmente (SCHRIPSEMA *et al.*, 1991). Uma massa de 330 mg de células liofilizadas foi extraída, sob agitação, com 5 mL de água destilada (3 vezes, por aproximadamente 30 minutos).

Um volume de 10 mL do extrato aquoso foi concentrado por liofilização até a secura, o sólido obtido foi ressuspendido em 800 µL de D₂O contendo padrão interno¹, agitando-se vigorosamente em seguida. A suspensão obtida foi transferida para um frasco cônico de 2,0 mL e centrifugada por 10 minutos a 10000 g. Um volume de 500 µL do sobrenadante foi recolhido para a análise por RMN¹H (espectrômetro Varian DPX-300, frequência de 300MHz).

¹ sal de sódio do ácido 3-(trimetil-silil)-1-propano sulfônico, 97%.

Os aminoácidos e carboidratos foram quantificados através da correlação entre os sinais característicos de cada substância no espectro de RMN¹H (tabela 4.4) e o sinal do padrão interno (de concentração conhecida) adicionado à amostra (equação 4.1).

$$C = \frac{(\text{altura do sinal/ altura do sinal PI}) \times [\text{PI}] \times f}{m} \quad (\text{equação 4.1})$$

Em que:

C, concentração do aminoácido ou carboidrato no extrato aquoso (mg/ g de células liofilizadas)

[PI], concentração do padrão interno (30 mg/ mL)

f, fator de correção de limite de detecção (mL)

m, massa células liofilizada (g)

$$f = \frac{A}{B} \quad (\text{equação 4.2})$$

Em que:

f, fator de correção de limite de detecção (mL)

A, concentração do padrão (mg/mL) x altura do sinal PI (cm) x volume de extração (mL) x volume final (mL)

B, concentração PI (mg/mL) x altura do sinal de padrão (cm) x volume liofilizado (mL)

(para o método descrito: volume de extração = 15mL, volume liofilizado = 10mL e volume final = 0,8mL)

Tabela 4.4: Principais aminoácidos e açúcares presentes em extratos de células vegetais

Substâncias	δ (ppm), multiplicidade ^a	f (mL) ^b
Ácido aspártico	2,75 (m)	21,93
Ácido glutâmico	2,38 (m)	12,48
Alanina	1,48 (d)	3,68
Arginina	1,90 (m)	36,44
	1,71 (m)	76,48
Asparagina	2,90 (m)	19,60
Colina	3,21 (s)	1,18
Fenilalanina	7,41 (m)	14,42
Frutose	4,12 (d)	57,28
Glicina	3,57 (s)	2,07
Glicose	5,23 (d)	101,98
	4,65 (d)	60,87
	3,24 (t)	107,02
Glutamina	2,46 (m)	20,66
	2,14 (m)	23,59
Sacarose	5,42 (d)	49,11
	4,21 (d)	35,18
Treonina	1,33 (d)	5,46
Triptofano	7,73 (d)	31,93
Tirosina	7,18 (d)	14,76
	6,91 (d)	14,76
Valina	1,02 (dd)	5,15

^{a, b} SCHRIPSEMA *et al.*, 1991

Pretende-se também, através desse experimento, verificar se o aminoácido *L*-histidina ocorre em cultura de células *in vitro* de *P. pennatifolius*. O sinal escolhido para identificação e quantificação desta substância foi um singleto observado a 8,70 ppm no espectro de RMN¹H. O fator para o limite de detecção (*f*), calculado de acordo com a equação 4.2, foi de 54,08 mL.

Figura 4.1: Espectro de RMN¹H para o aminoácido *L*-histidina obtido em um aparelho Varian DPX-300, com frequência de 300 MHz para o núcleo de hidrogênio

4.2.7. Extração de pilocarpina dos calos de *P. pennatifolius* Lemm.

A extração de alcalóides (a partir da cultura de células de *P. pennatifolius*) e a determinação do conteúdo de pilocarpina por CG foram realizadas conforme descrito no capítulo 3.

A determinação de pilocarpina, no extrato bruto, por CLAE foi realizada de acordo com metodologia descrita na literatura para determinação da pilocarpina em preparações oftálmicas (FAN *et al.*, 1996). As análises foram realizadas por eluição isocrática em um cromatógrafo a líquido Shimadzu LC 10AD com detetor de ultravioleta SPD 10A UV-VIS. Utilizou-se uma coluna de fase reversa (Merck, Purospher RP18, 5 μ m, 125: 4) e, como eluente, o tampão H₃PO₄:TEA acrescido de MeOH, na proporção 98:2 (FAN *et al.*, 1996).

O comprimento de onda para detecção da pilocarpina foi de 216 nm e o fluxo durante a análise de 1 mL/min. A identificação do alcalóide foi feita a partir do cromatograma do padrão, cloridrato de pilocarpina. De acordo com as condições descritas para a análise por CLAE, o tempo de retenção para o cloridrato de pilocarpina foi de 5,5 minutos e a quantificação de pilocarpina nos extratos feita a partir da curva analítica a seguir.

Figura 4.2: Curva analítica para o padrão cloridrato de pilocarpina obtida por CLAE.

4.3. Resultados e discussão

Tecidos vegetais e microrganismos requerem basicamente os mesmos nutrientes para o crescimento *in vitro*, sendo que fungos e bactérias possuem uma taxa de crescimento maior (ENDRESS, 1994). Assim, a escolha de uma técnica adequada de desinfecção garante o sucesso inicial do estabelecimento de uma cultura de tecidos. Dos protocolos testados (tabela 4.2, pág. 85), apenas o de número três mostrou ser eficaz na descontaminação do material vegetal. Os demais permitiram crescimento indesejável de microrganismos (protocolo 1) ou comprometeram a viabilidade do explante devido ao seu poder oxidante (protocolo 2).

O efeito que a incidência de luz pode causar sobre uma cultura de células vegetais irá depender do comprimento de onda, da intensidade e do efeito visado (indução de calos ou diferenciação) (ENDRESS, 1994). Em relação ao crescimento de uma cultura *in vitro*, a exposição à luz pode atuar desfavoravelmente, em alguns casos, apesar de fazer parte de um dos mais importantes processos metabólicos das plantas, a fotossíntese (LONGEMANN & BERGMANN, 1974).

Durante a indução de calos de *P. pennatifolius* foi verificado que os explantes expostos à luz rapidamente tornavam-se escuros,

possivelmente por oxidação de compostos fenólicos. Os explantes deixados no escuro, após as modificações introduzidas na formulação dos meios de cultura, não apresentaram sinais de oxidação e induziram calos após duas semanas. Quando esses mesmos calos foram expostos à luz, notou-se um rápido escurecimento dos mesmos (cerca de 3- 4 dias).

Inicialmente, apenas quatro formulações de meios de cultura (meios 2, 3, 42 e 43; vide tabela 4.3, pág. 87) foram capazes de induzir a formação de calos. Entretanto, os calos obtidos eram pouco friáveis e de crescimento lento. A alteração das concentrações e do tipo de reguladores de crescimento, além da adição de solução antioxidante a fim de evitar o escurecimento, levou à elaboração dos meios 66, 75, 77 e 78 (pág. 87). Foi observado que a adição da auxina Picloram e o aumento da concentração de IAA foram decisivos para o aumento da friabilidade dos calos obtidos.

Figura 4.3: Células de *P. pennatifolius* em meio semi-sólido 77 (após 4 subculturas)

A determinação do crescimento de uma cultura de células pode ser feita através da massa seca ou fresca, do número ou volume de células

ou, ainda, indiretamente, através da condutividade do meio de cultura (ENDRESS, 1994).

Para os calos mantidos no meio 77, a curva de crescimento obtida foi a seguinte:

Figura 4.4: Curva de crescimento para cultura de calos de *P. pennatifolius* no meio de cultura 77

A fase *lag* (período de divisão celular lenta) neste meio praticamente não foi observada. As fases exponencial (divisão acelerada das células) e estacionária (senescência, células não mais se dividem) tiveram duração de 15 e 8 dias respectivamente. O tempo de duplicação (período necessário para que a massa celular dobre) dos calos de *P. pennatifolius* mantidos no meio 77 foi de 25 dias. Esta taxa de crescimento pode ser

considerada similar ao de outras culturas *in vitro* de espécies vegetais lenhosas relatados na literatura, onde o tempo de duplicação para calos de *Rudgea jasminoides* foi de 20 dias (STELLA & BRAGA, 2002).

A seguir, o espectro de RMN¹H ilustra o perfil de açúcares e aminoácidos obtido para a cultura de células de *Pilocarpus pennatifolius*.

Figura 4.5: Espectro de RMN¹H para células em suspensão de *P. pennatifolius* obtido em um aparelho Varian DPX-300, com frequência de 300 MHz para o núcleo de hidrogênio

Na tabela a seguir são listados os aminoácidos e carboidratos intracelulares presentes em cultura de calos de *P. pennatifolius*, determinados de acordo com SCHRIPSEMA & VEPOORTE (1991).

Tabela 4.5: Aminoácidos e carboidratos acumulados intracelularmente em cultura de células de *P. pennatifolius*

		δ (ppm)	concentração (mg/g) ¹
Aminoácidos			
Alanina	(1)	1,48 (d)	2,0
Arginina	(2)	1,90 (m)	15,0
Asparagina	(3)	2,93 (m)	130,0
Glutamina	(4)	2,45 (m)	7,0
Treonina	(5)	1,34 (d)	1,2
Carboidratos			
Frutose	(6)	4,12 (d)	63,0
Glicose	(7)	5,23 (d)	83,0
Sacarose	(8)	5,41 (d)	80,0

Não foi possível identificar a presença do singlete a 8,70 ppm no espectro de RMN¹H, nos extratos aquosos analisados, o que indica a ausência do aminoácido *L*-histidina. Contudo, a análise de um desses extratos por CLAE², permitiu identificar um pico um sinal com tempo de retenção igual ao da *L*-histidina. Possivelmente, a sensibilidade da técnica escolhida para detecção de substâncias que ocorrem em baixa concentração, em misturas, não é muito boa.

¹ Valor médio dos três extrato analisados.

² Resultados não apresentados. Quantidade de *L*-histidina não determinada.

A análise por RMN¹H mostrou que cerca de 25% do peso seco da biomassa eram constituídos por carboidratos, sendo a glicose o principal carboidrato acumulado durante o desenvolvimento da cultura. Este resultado foi semelhante ao observado por SCHRIPEMA & VEPOORTE (1991) em culturas de células de *Achillea millefolium*, *Humulus lupulus* e *Tabernamontana divaricata*, dentre outras espécies.

Não foi observado o acúmulo de pilocarpina durante a fase de crescimento exponencial da cultura. Em cultura de células, o acúmulo de metabólitos secundários é, muitas vezes, inversamente proporcional ao crescimento (LINDSEY & YEOMAN, 1983; BANTHORPE, 1994; COLLIN, 2001). Além disso, durante o crescimento acelerado, ocorre principalmente a conversão dos nutrientes em substâncias do metabolismo primário, que poderão ser redirecionados para a produção de metabólitos secundários na fase estacionária em uma cultura *in vitro*.

A maioria dos trabalhos relativos ao acúmulo de metabólitos secundários em cultura *in vitro* é realizada com células em suspensão. Culturas de calos também devem ser consideradas neste sentido, pois de acordo com alguns autores são sistemas diferenciados e com maior possibilidade de acumular metabólitos de interesse (LINDSEY & YEOMAN, 1983). Entretanto, se levarmos em conta a taxa de crescimento, este sistema mostra-se inconveniente para produção em larga escala (BANTHORPE, 1994).

A análise por CG do extrato de alcalóides totais da cultura de células de *P. pennatifolius* forneceu o cromatograma apresentado na Figura 4.6.

Figura 4.6: Cromatograma obtido por CG do extrato de alcalóides totais em células de *P. pennatifolius*. Coluna: HP-5 (5% fenil 95% metilsilicone). Dimensões: 30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 μ m espessura do filme. Gás de arraste: He ultrapuro. Temperatura inicial: 150 °C (5 min). Temperatura final: 220 °C (5 min); Taxa de aquecimento: 2,5 °C/min. Temperatura do injetor: 275 °C. Temperatura do detetor: 325 °C.

O cromatograma abaixo foi obtido a partir da análise do extrato de alcalóides totais de calos de *P. pennatifolius*, por CLAE em fase reversa.

Figura 4.7: Cromatograma obtido por CLAE do extrato de alcalóides totais em células de *P. pennatifolius*. Coluna: Purospher RP18, 5 μ m, 125: 4 (Merck). Eluente: Tampão H_3PO_4 (13,5 mL)+ TEA (3 mL): MeOH (98:2). Comprimento de onda: 216 nm. Fluxo: 1 mL/ min.

A quantidade de pilocarpina determinada nos calos de *P. pennatifolius* por CG foi de 0,113 μ g/ mg de biomassa, enquanto a quantidade do alcalóide determinada por CLAE foi de 0,161 μ g/ mg de células. A baixa resolução do cromatograma obtido por CLAE pode ter interferido na integração do sinal referente à pilocarpina, resultando em uma quantidade do alcalóide maior do que aquela determinada por CG. Apesar da diferença entre os valores obtidos (aproximadamente 30%), a quantidade de pilocarpina na cultura de calos de *P. pennatifolius* foi da mesma ordem que a relatada para cultura de células não-diferenciadas de *P. microphyllus* (REUTHER, 1991).

4.4. Conclusões

Foi estabelecida a cultura de células *in vitro* de *P. pennatifolius* em meio MS semi-sólido, tendo como fonte de carbono sacarose (30 g/L), suplementado com solução antioxidante e, como reguladores de crescimento, BAP (0,11 mg/L), IAA (0,56 mg/L) e NAA (5,63 mg/L). Apenas as culturas mantidas constantemente ao abrigo da luz induziram a formação de calos. A taxa de crescimento, sob estas condições, foi de 25 dias.

Na análise do extrato aquoso da biomassa por RMN¹H, foi possível identificar como componentes intracelulares os aminoácidos alanina, arginina, asparagina, glutamina e treonina, além dos açúcares frutose, sacarose e glicose. A técnica de RMN¹H não se mostrou adequada para a detecção de histidina (provável precursor do anel imidazólico), provavelmente pela baixa abundância deste aminoácido.

A cultura de células de *P. pennatifolius* foi capaz de acumular o alcalóide pilocarpina na concentração de aproximadamente 0,1 µg/ mg de biomassa. Comparando-se esta quantidade com aquela determinada nas folhas de *P. pennatifolius* (capítulo 3, pág. 73), observamos que a cultura *in vitro* acumula menos pilocarpina que o espécimen estudado.

4.5. Referências bibliográficas

- BANTHORPE DV (1994) Secondary metabolism in plant tissue culture - scope and limitations, *Natural Product Reports*, **11 (3)**, 303-328.
- BERLIN J, SIEG S, STRACK D, BOKERN M & HARMS H (1986) Production of betalains by suspensions cultures of *Chenopodium rubrum*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **5**, 168-174.
- BERLIN J (1997) Secondary metabolites from plant cell cultures. In *Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise – vol. 7 Products from secondary metabolism* (ed. H. Kleinkauf & H. von Döhren), 593-640. VCH, Alemanha.
- BHATT PN, BHATT DP & SUSSEX I (1983) Studies on some factors affecting solasodine contents in tissue cultures of *Solanum nigrum*, *Physiologia Plantarum*, **57 (1)**, 159-162.
- BIANCO-COLOMAS J & HUGUES M (1990) Establishment and characterization of a betacyanin producing cell line of *Amaranthus tricolor*: Inductive effects of light and cytokinins, *Journal of Plant Physiology*, **136**, 734-739.
- CHARLWOOD BV, CHARLWOOD KA, MOLINA-TORRES J (1990) Accumulation of secondary compounds by organized plants cultures In *Secondary Products from Plant Tissue Culture* (BV CHARLWOOD & MJC RHODES, editors), 167- 200.
- COLLIN HA (2001) Secondary product formation in plant tissue culture, *Plant Growth regulation*, **34**, 119-134.

COMPAGNONE RS & RAPOPORT H (1986) Chirospecific synthesis of (+)-pilocarpine, *Journal of Organic Chemistry*, **51**, 1713-1719.

CONSTABEL F (1987) Cell culture in phytochemistry. *In* Cell culture and somatic cell genetics of plants (CONSTABEL F & VASIL IK, editors), vol. 4, 3-13. Academic Press, Londres.

COURTOIS D, PETIARD V & TOUCHE A (1996) Pilocarpine production process, USPTO 5, 569, 593.

DEGRAW JI (1972) An improved synthesis of pilocarpine, *Tetrahedron*, **28**, 967-972.

ELIERT U, KURZ WGW & CONSTABEL F (1985) Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cells by fungal homogenates, *Journal of Plant Physiology*, **119**, 65-76.

ENDRESS R (1994) Basic techniques *In* Plant Cell Biotechnology, 15-45. Springer-Verlag, Londres.

_____ (1994) Culturing of plant cells *In* Plant Cell Biotechnology. 46- 88. Springer-Verlag, Londres.

FETT-NETO AG, MELANSON SJ, SAKATA K & DICOSMO F (1993) Improved growth and taxol yield and developing of *Taxus cuspidata* by medium composition modification, *Biotechnology*, **11**, 731-734

FETT-NETO AG, ZHANG WY & DICOSMO F (1994) Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*, *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 205-210.

- FLORES H, VIVANCO JM & LOYOLA-VARGAS VM (1999) 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism, *Trends in Plant Science*, **4(6)**, 220-226.
- FONTANEL M & TABATA M (1987) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures – Presents aspects and prospects, *Nestlé Research News*, **1986-87**, 92-104.
- FRISCHKNECHT PM, BAUMANN TW & WANNER H (1977) Tissue culture of *Coffea arabica* growth and caffeine formation, *Planta Medica*, **31**, 344-350.
- FUJITA Y & TABATA M (1986) Secondary metabolites from plants cells: Pharmaceutical application and progress in commercial production, *In Plant Tissue and Cell Culture* (DA SOMER, BG GEGENBACH, DS BIESBOER, WP HACKETT & CE GREEN, editors), 169-185, Univ. of Minneapolis Press, Minnesota.
- FURUYA T, IKUTA A & SYŌNO K (1972) Alkaloids from callus culture of *Papaver somniferum*, *Phytochemistry*, **11**, 3041-3044.
- GAMBORG OL, MILLER RA & OJIMA K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Experimental Cell Research*, **50**, 151-158.
- GOGOBERIDZE MK, MAMALADZE MN & ZAMBAKHIDZE NE (1992) Steroid substances in the *Yucca gloriosa* L. cell and tissue-culture and their formation during morphogenesis, *Plant Science*, **84 (2)**, 201-207.
- HARTMANN T, WITTE L, OPRACH F, TOPPEL G (1986) Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell-suspension cultures, *Planta Medica*, **5**, 390-395.

HORNE DA, FUGMANN B, YAKUSHIJIN K & BÜCHI G (1993) A synthesis of pilocarpine, *Journal of Organic Chemistry*, **58**, 62-64.

KAUL B & STABA JE (1968) *Discorea* tissue cultures: I. Biosynthesis and isolation of diosgenin from *Discorea deltoidea* callus and suspension cells, *Lloydia*, **31**, 171-176.

KIM T, KIM TY, BAE GW, CHAE YA, LEE HJ & CHUNG IS (1995) Enhanced essential oil formation by two-phase culture of *Mentha piperita* cells in shake flask and air-lift bioreactors, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **5 (6)**, 364-369

LINDSEY K & YEOMAN MM (1983) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures, *Journal of Experimental Botany*, **34(145)**, 1055-1065.

LIS-BALCHIN M & ROTH G (2000) Composition of the essential oils of *Pelargonium odoratissimum*, *P. exstipulatum* and *P. fragrans* (Geraniaceae) and their bioactivity, *Flavour and Fragrance Journal*, **15 (6)**, 391-394.

LONGEMANN H & BERGMANN L (1974) Influence of light and medium on the planting efficiency of isolated cells from callus cultures of *Nicotiana tabacum* var *sansun*, *Planta*, **121**, 283-293.

MIZUSAKI S, KISAKI T & TAMAKI E (1965) Transformation of nicotine to nornicotine in excised tobacco root culture, *Agricultural and Biological Chemistry*, **29 (1)**, 78-82.

MURASHIGE T & SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiology Plantarum*, **15**, 473-497.

NOORDAN A (1979) Stereoselective synthesis of (+) pilocarpine, PHD thesis. Delft University Press. Leiden, Netherlands.

PINHEIRO CUB (1997) Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop, *Economic Botany*, **51(1)**, 49-58.

REUTER G (1991) Process for the preparation of pilocarpine from in vitro cultures of *Pilocarpus*, USPTO 5, 059, 531.

SAKUTA M, TAKAGI T & KOMAMINE A (1987) Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*, *Physiology Plantarum*, **71**, 459-463.

SALEM KMSA & CHARLWOOD BV (1995) Accumulation of essential oils by *Agrobacterium tumefaciens*-transformed shoot cultures of *Pimpinella anisum*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **40 (3)**, 209-215.

SATO F & YAMADA Y (1984) High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells, *Phytochemistry*, **23**, 281-285.

SCHIEL O & BERLIN J (1987) Large-scale fermentation and alkaloid production of cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **8**, 153-161.

SCHRIPSEMA J & VERPOORTE R (1991) Investigation of extracts of plant cell cultures by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Phytochemical Analysis*, **2**, 155-162.

SCHÜBEL H, RUYTER C & STÖCKIGT J (1989) Improved production of raucaffricine by cultivated *Rauwolfia* cells, *Phytochemistry*, **28**, 491-494.

SMITH JI, SMART NJ, MISAWA M, KURZ WGW, TALLEVI SG & DICOSMO F (1987) Increased accumulation of indole alkaloids by some cell-lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulfate, *Plant Cell Reports*, **6 (2)**, 142-145.

SPEAKE T, MCCLOSKEY P & SMITH WK (1964) Isolation of nicotine from cell cultures of *Nicotiana tabacum*, *Nature*, **201 (491)**, 614-622.

STELLA A & BRAGA MR (2002) Callus and cell suspension of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae, *Plant Cell and Tissue Culture*, **68**, 271- 276.

ZENK MH, EL-SHAGI H & SCHULTE U (1975) Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *Planta Medica* (Suppl.), 70-101.

CAPÍTULO 5

**Estudos sobre a biossíntese do alcalóide
pilocarpina em *P. pennatifolius* Lemm.**

5.1. Biossíntese de alcalóides

Muitos alcalóides apresentam atividades farmacológicas únicas como, por exemplo, a pilocarpina **(1)**, que é usada no tratamento do glaucoma e da xerostomia (WEBER, 1876; VALDEZ *et al.*, 1993). Outros exemplos são: berberina **(2)** (antimuscarínico utilizado no tratamento de mal de Parkinson), vincristina **(3)** e vimblastina **(4)** (antitumorais), camptotecina **(5)** (antitumoral) e codeína **(6)** (analgésico) (figura 5.1).

Figura 5.1: Alguns alcalóides com importância farmacológica

Apesar da importância dessa classe de metabólitos, pouco é conhecido a respeito das vias biossintéticas que originam as diversas classes de alcalóides (DE LUCA & ST PIERRE, 2000; BENTLEY, 1999; FLORES *et al.*, 1999). Recentemente, dados a respeito da regulação, produção e acúmulo de alcalóides indólicos foram elucidados empregando-se como modelo de estudos a espécie *Catharanthus roseus* (DE LUCA & LAFLAMME, 2001; VERPOORTE & MEMELINK, 2002).

A grande maioria dos estudos sobre a biossíntese de alcalóides tem sido realizada através do uso de precursores marcados com isótopos radioativos. Apesar da difusão deste tipo de experimento, suas limitações ainda não permitem a descrição completa da rota biossintética de um metabólito secundário. Atualmente, a prova definitiva sobre a validade de uma proposta biogenética é feita por meio de ensaios *in vitro*, realizados com enzimas capazes de catalisar uma etapa específica da biossíntese do metabólito de interesse (ZENK *et al.*, 1985; BAUNMERT *et al.*, 1986).

É possível conhecer o sítio de biossíntese através do isolamento das enzimas envolvidas na produção de um metabólito ou pela conversão de substratos marcados em um tecido vegetal (WINK, 1987). O isolamento de enzimas com um relativo grau de pureza tem sido possível graças ao desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* de algumas espécies vegetais (ZENK, 1980; 1985). Uma vez conhecida(s) a(s) enzima(s) envolvida(s) em uma determinada etapa da biossíntese de um alcalóide, torna-se possível estudar a sua regulação e, com isso, interferir na produção e/ou acúmulo das substâncias de interesse.

Um fator importante na biossíntese de alcalóides é a compartimentalização. Este mecanismo permite às células, de determinados órgãos, reconhecer e segregar enzimas, substratos e produtos. Algumas organelas celulares desempenham papel importante na compartimentalização, entre as quais podemos citar cloroplastos, citosol, mitocôndrias e vacúolos, cujo papel na biossíntese de alcalóides quinolínicos, piperidínicos e indólicos já foi descrito em diversas espécies (WINK, 1987).

5.1.1. Acúmulo e transporte de alcalóides em espécies vegetais

O acúmulo de metabólitos secundários em vegetais é resultante de uma série de interações complexas entre a biossíntese, o transporte e a degradação destas substâncias (WINK, 1990). A biossíntese pode ocorrer em todo o vegetal, em qualquer órgão ou tecido e está relacionada ao estágio de desenvolvimento da planta. Já o acúmulo de um metabólito pode ocorrer em toda a planta, seja no mesmo tecido (ou órgão) em que ele é produzido ou em locais diferentes do sítio de produção (tabela 5.1).

De uma maneira geral, compostos lipofílicos são estocados em membranas, paredes celulares ou células mortas (WIERMAN, 1981), enquanto os compostos hidrofílicos (alcalóides, por exemplo) são mantidos em ambiente polar, nos vacúolos (DEUS-NEUMANN & ZENK, 1986). Os vacúolos são os grandes sítios de acúmulo de metabólitos

secundários em plantas, nos quais a concentração de alcalóides pode ser superior a 200 mmol/ L (WAGNER, 1982; WINK, 1987).

Quando os sítios de produção e acúmulo localizam-se em órgãos distintos, entra em ação o transporte intercelular à longa distância ou translocação (WINK, 1986; WINK & MENDE, 1987). Este transporte pode ocorrer através de várias estruturas, entre as quais floema, xilema, vasos laticíferos e canais resinosos (WINK & WITHE, 1984). Muitos alcalóides, entre os quais a nicotina, a atropina e a esparteína, são acumulados em órgãos diferentes daqueles onde são biossintetizados e, por esta razão, são translocados até o sítio final de acúmulo (tabela 5.1).

Devido à necessidade de técnicas especializadas, os mecanismos da translocação de metabólitos secundários ainda não foram completamente elucidados (WINK, 1987; 1990). Apesar disso, já é possível divisar a importância de proteínas carreadoras específicas no transporte até o órgão de acúmulo no caso de alguns alcalóides do tipo morfina (ROBERTS, 1987) e pirrolizidínicos (EHMKE *et al.*, 1988).

Tabela 5.1: Alguns exemplos de alcalóides seus sítios de biossíntese, acúmulo e transporte através da planta

Alcalóide	Gênero	Biossíntese	Acúmulo	Transporte	Referência
Atropina	<i>Atropa</i>	raízes	folhas, ramos	xilema	WINK, 1987
Berberina	<i>Berberis</i>	rizomas	rizomas, ramos	-	WINK, 1987
Cafeína	<i>Coffea</i>	folhas	frutos, folhas	-	MOTHES, 1955
Esparteína	<i>Cytisus</i>	folhas	folhas, ramos	-	WINK, 1990
Lupanina	<i>Lupinus</i>	folhas	folhas, ramos	floema	MOTHES, 1955
Morfina	<i>Papaver</i>	folhas, látex	folhas, ramos	-	WINK, 1987
Nicotina	<i>Nicotiana</i>	raízes	folhas	xilema	WINK, 1990
Sanguinarina	<i>Sanguinaria</i>	raízes	rizomas	vasos laticíferos	WINK, 1990

5.1.2. Estudos sobre a biossíntese do alcalóide pilocarpina em *P. pennatifolius*

Apesar da simplicidade da molécula, a biossíntese do alcalóide imidazólico pilocarpina tem sido pouco estudada. Duas propostas biogénéticas tentaram explicar sua origem a partir do aminoácido *L*-histidina **(7)** (ROBINSON, 1955; BROCHMANN-HASSEN *et al.*, 1975). Entretanto, nenhum resultado experimental conclusivo foi obtido.

Embora as propostas difiram no intermediário que dá origem à porção imidazólica da pilocarpina **(1)**, ambas concordam em que grande parte da biossíntese ocorra nas raízes, até a formação do alcalóide pilocarpidina **(9)**. De maneira similar à nicotina em *N. tabacum*, este alcalóide poderia ser translocado até as folhas das espécies de *Pilocarpus*, nas quais seria transformado em pilocarpina através de uma reação de *N*-metilação (BROCHMANN-HANSEN *et al.*, 1975). Contudo, os resultados obtidos por COURTOIS *et al.* (1996) em experimentos com raízes modificadas, indicam que a produção desse metabólito pode se dar completamente nas raízes.

Figura 5.3: Proposta de BROCHMANN-HANSEN *et al.* para a biossíntese da pilocarpina

Até o presente, as hipóteses biossintéticas existentes para a formação da pilocarpina não haviam sido testadas quanto às enzimas envolvidas. Diante disso, o objetivo desta etapa foi estudar a biossíntese do alcalóide imidazólico (**1**), buscando identificar o primeiro intermediário formado enzimaticamente a partir de *L*-histidina. Admitindo-se que esse aminoácido seja o precursor da porção imidazólica, duas enzimas (uma aminotransferase, Figura 5.2 ou uma desaminase, Figura 5.3) poderiam atuar inicialmente sobre o substrato, originando o primeiro precursor na biossíntese da pilocarpina.

5.2. Experimental

Inicialmente, preparou-se o ácido imidazol-pirúvico **(8)** a ser utilizado como padrão no ensaio para aminotransferase, como apresentados no esquema 5.1:

5.2.1. Preparação do padrão ácido imidazol-pirúvico **(8)**

- Preparação do ácido 2-hidróxi-3-(5-imidazoil)-propanóico **(7a)** a partir de *L*-histidina **(8)** (KARANEWSKY *et al.*, 1988)

Uma solução de hidrocloreto de *L*-histidina **(7)** (7,75 g; 0,05 mol) foi neutralizada em uma coluna de troca iônica (Amberlite, IRA-401S) sendo eluída com água destilada. As frações que forneceram resultado positivo com ninidrina (coloração violeta) foram reunidas, acidificadas com H_2SO_4 2 mol/ L (50 mL) e concentradas.

O sulfato bruto resultante foi dissolvido em H_2SO_4 10 % (v/v) (50 mL) e tratado, gota a gota, com 50 mL de uma solução aquosa de NaNO_2 (12,95 g; 0,18 mol) durante 2h, à temperatura de 45 a 50°C em banho de silicone.

Após o término da adição, a mistura reacional foi neutralizada em uma coluna de troca iônica (Amberlite, IRA 120-plus), sendo utilizado como eluente uma mistura de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (3: 1, v/v). As frações que forneceram resultado positivo para ninidrina (coloração vermelha intensa) foram reunidas e concentradas.

Foi obtido um sólido amarelo com rendimento de 47%. RMN¹H (D_2O): $\delta = 2,99$ ppm (m, 1H); $\delta = 3,81$ ppm (m, 2H); $\delta = 6,88$ ppm (s, 1H); $\delta = 7,58$ ppm (s, 1H) e IV (KBr): 3421, 3300- 2841, 1633 cm^{-1} (figuras A1 e A2, Apêndice).

- Preparação do ácido imidazol pirúvico (**8**) (CORSON *et al.*, 1932)

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, foram adicionados 2,5 mmol de (**7a**) e 5 mL de água destilada. Esta solução foi mantida sob agitação em banho de gelo, sendo adicionados, a seguir, 2,8 mmol de NaOH (112 mg em 5 mL de água) e 2 g de gelo picado.

Subseqüentemente, ainda sob agitação, adicionou-se lentamente 1,74 mmols de KMnO_4 (275 mg em 5 mL de água) durante 30 minutos. A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 90 minutos em banho de gelo (-4 a -2°C). Após este período, o meio reacional foi testado para verificar o excesso de KMnO_4 , gotejando-o em papel de filtro (Positivo: centro marrom ou preto, borda rosa. Negativo: centro marrom ou preto, borda incolor). O excesso de reagente oxidante foi eliminado com a adição de álcool etílico. Quando todo o permanganato foi consumido, a solução

foi deixada em repouso a fim de decantar o MnO_2 formado. Após a decantação, filtrou-se o meio reacional a vácuo. Na seqüência, concentrou-se o filtrado sob pressão reduzida.

O produto obtido foi purificado em coluna de troca iônica (Amberlite, IRA 120-plus, eluente $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 3:1 v/v) e liofilizado, fornecendo um sólido marrom (91 mg, 24 %). RMN^1H (D_2O): $\delta = 3,09$ ppm (s, 2H), $\delta = 6,64$ ppm (s, 1H), $\delta = 7,30$ ppm (s, 1H). IV (KBr): 3354, 1634, 1579 cm^{-1} .

5.2.2. Extração das proteínas hidrossolúveis de folhas e raízes de *P. pennatifolius* (MORENO *et al.*, 1994)

O material vegetal foi congelado (78 g de raízes e 64 g folhas) em N_2 líquido e triturado em presença de PVPP (0,05 g/g de material) e SiO_2 (1g/g de material) em almofariz. Adicionaram-se 5 mL do tampão extrator/g material vegetal (TRIS-HCl 0,1M pH= 8,0; 0,02% NaN_3 ; 1 mM EDTA e 3 mM DTT) homogeneizando vigorosamente com uma espátula plástica.

A mistura foi descongelada à temperatura ambiente, filtrada em gaze e centrifugada a 10000 g a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi dessalinizado em coluna Sephadex G25 (PD10 Pharmacia) e eluído com o tampão extrator. Alíquotas de aproximadamente 1 mL foram recolhidas e utilizadas no ensaio com *L*-histidina ou rapidamente congeladas em N_2 líquido e conservadas a -20 °C.

5.2.3. Concentração do extrato protéico por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Parte do extrato protéico foi concentrado por adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a fim de se obter uma fração mais ativa para o ensaio. As faixas de saturação para precipitação foram as seguintes: 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%.

5.2.4. Ensaio enzimático para desaminases (RÖTHER *et al.*, 2001)

Em tubos cônicos de 2 mL, para um volume total de 1 mL de incubação, foram misturados:

- 770 μL de tampão TRIS-HCl 0,1 mol/L (pH= 8,0)
- 50 μL de solução de CdCl_2 0,2 mol/L
- 20 μL de solução de GSH 0,1 mol/L
- 100 μL de preparação enzimática

Esses reagentes foram homogeneizados, pré-incubados por 5 minutos, sendo adicionados, a seguir, 60 μL de solução de *L*-histidina 0,1 mol/ L (pH= 8,5), iniciando-se a reação.

A mistura reacional foi mantida sob agitação em banho-maria durante 60 minutos, a 30°C.

Cada ensaio foi acompanhado de um controle sem precursor (*L*-histidina) e de outro sem extrato enzimático.

5.2.5. Ensaio enzimático para aminotransferases (FOREST & WIGHTMAN, 1972)

Em tubos cônicos de 2 mL, para um volume total de 500 μ L de reação, foram misturados:

- 260 μ L de TRIS-HCl 0,5 mol/L
- 100 μ L de preparação enzimática
- 10 μ L de PLP 0,01 mol/L
- 80 μ L de *L*-histidina 62,5 mmol/L (pH= 8,5)

Esses reagentes foram homogeneizados, sendo adicionados, após 10 minutos, 50 μ L de ácido α -ceto-glutárico (0,1 mol/L) a fim de iniciar a reação. O meio reacional foi mantido sob agitação em banho-maria durante 2h a 38°C. A reação foi terminada por adição de 400 μ L de HCl 3 mol/L.

Cada ensaio foi acompanhado de um controle sem precursor *L*-histidina e de outro sem extrato enzimático.

5.2.6. Análise por CLAE da conversão de L-histidina

Com base na metodologia descrita por WADUD *et al.* (2000), foi possível desenvolver a uma condição para separação do substrato L-histidina e dos possíveis produtos da conversão enzimática. As análises foram realizadas em um cromatógrafo à líquido Shimadzu LC 10AD equipado com detetor de ultravioleta SPD 10A UV-VIS e injetor automático. A análise foi realizada em uma coluna de fase reversa Lichrospher NH₂ 7 µm (250 x 4 mm), com gradiente de solvente tendo como eluentes ACN: H₂O (9:1) (**eluente A**) e tampão KH₂PO₄ 10 mmol/L (pH= 3, ajustado com H₃PO₄ 85% p/p) (**eluente B**). O gradiente adotado para análise foi o seguinte:

Condição inicial:	100% eluente A (permanecendo por 5 min)
Gradiente:	Em 5 min até 90% do eluente B (permanecendo por 10 min)
Retorno à condição inicial:	Em 5 minutos retornar a 100% do eluente A (permanecendo por 10 min)

A análise cromatográfica foi feita com fluxo de 1 mL/min do solvente e comprimento de onda de 220 nm para detecção. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. A identificação das substâncias foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos para os padrões nas mesmas condições de análise. A quantificação foi realizada através da curva analítica obtida para os padrões.

5.2.7. Quantificação da atividade enzimática

Determinou-se a atividade enzimática por meio da formação de um nanomol de produto por unidade de tempo, segundo a equação 5.1:

$$\text{Ativ enz} = \frac{[(A_{\text{prod}}/A_{\text{PI}})_{\text{ens}} - (A_{\text{prod}}/A_{\text{PI}})_{\text{brc}}] \times \text{qde}_{\text{PI}}}{R \times t_{\text{ens}} \times 60 \times \text{vol}_{\text{ptn}}}$$

(equação 5.1)

Em que:

Ativ enz = atividade enzimática (nKatal/mL)

A_{prod} = área do produto no ensaio (ens) e no controle (brc)

A_{PI} = área do padrão interno no ensaio (ens) e no controle (brc)

qde_{PI} = quantidade de PI (nmol)

t_{ens} = tempo de reação (min)

R = coeficiente angular da curva de calibração P/PI

vol_{ptn} = volume de preparação enzimática (μL)

5.2.8. Dosagem das proteínas totais em folhas e raízes de *P. pennatifolius*

A concentração de proteínas no extrato bruto foi determinada de acordo com o ensaio descrito por BRADFORD (1976). A variação da absorbância foi observada a 595 nm. As quantidades relativas de proteína nos extratos foram determinadas a partir da curva padrão obtida para BSA (Aldrich), na concentração de 1 a 12 $\mu\text{g/mL}$.

A concentração do extrato protéico total foi utilizada na determinação da atividade específica da enzima.

Figura 5.4: Curva analítica da BSA para a determinação da concentração das proteínas totais

5.2.9. Caracterização da enzima

Uma vez estabelecidos os protocolos de extração e ensaio para a enzima envolvida na biossíntese de pilocarpina em *P. pennatifolius*, foram realizados experimentos para a caracterização da mesma. Os parâmetros determinados foram:

- Determinação do pH ótimo

A determinação do pH ótimo consiste na escolha do melhor tampão para a extração de proteínas. Foram testados os seguintes tampões para o ensaio enzimático: acetato (pH= 4,6); HEPES (pH= 6,7); MES (pH= 7,7) e TRIS (pH= 8,5 e 10) (STOLL & BLANCHARD, 1990). A concentração dos tampões utilizada para os ensaios foi de 0,5 mol/L.

- Velocidade de reação

A determinação da cinética da reação foi realizada para se definir o tempo ótimo para a realização do ensaio enzimático. A atividade para a enzima HAT (histidina aminotransferase) foi determinada em diferentes intervalos de tempo entre 0 e 30 min.

- Concentração de substrato

Este experimento consistiu na determinação da concentração máxima de substrato (*L*-histidina **(7)**) necessária para preencher todos os sítios ativos da enzima, tendo sido determinadas a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a constante de Michaelis (K_m).

- Dependência do cofator PLP

Algumas transferases provenientes de vegetais, por possuírem PLP endógeno, não necessitam desse cofator para apresentarem atividade enzimática (FOREST & WIGHTMAN, 1972). Foram realizados ensaios com e sem PLP, a fim de se verificar a importância desse cofator para o ensaio de aminotransferase do extrato protéico de *P. pennatifolius*.

5.3. Resultados e discussão

O objetivo deste capítulo foi analisar as hipóteses propostas na literatura para a biossíntese de alcalóides imidazólicos, particularmente a pilocarpina. Os ensaios enzimáticos realizados tiveram como objetivo verificar a conversão do substrato imidazólico *L*- histidina, a um dos possíveis intermediários na biossíntese da pilocarpina (figuras 5.2 e 5.3).

Logo, caracterizando-se o intermediário formado, é possível inferir que a *L*-histidina seja um dos possíveis precursores na biogênese dos alcalóides imidazólicos. Os extratos protéicos utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de folhas (órgão de acúmulo) e raízes (possível órgão de biossíntese) de um espécimen de *P. pennatifolius*.

O primeiro passo na determinação da rota biossintética da pilocarpina foi a preparação do ácido imidazol-pirúvico. Esta substância foi necessária como padrão para o ensaio de aminotransferase. As reações de oxidação de álcoois são realizadas, geralmente, por meio de catálise por transferência de fase. Os agentes oxidantes mais comuns são KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e H_2O_2 (SMITH, 1994). Existem poucos relatos a respeito deste tipo reações exclusivamente em meio aquoso (CORSON *et al.*, 1932).

O ácido imidazol-pirúvico foi obtido por oxidação do ácido 2-hidróxi-3-(5-imidazoil)-propanóico com KMnO_4 , em meio aquoso (esquema 5.1). A identidade desta substância foi determinada por RMN^1H e IV (figuras A5

e A6, Apêndice). No espectro de RMN¹H, observou-se o desaparecimento do sinal referente a hidrogênio carbinólico a 3,81 ppm, devido à oxidação do grupo hidroxila no C-2. Além disso, verificou-se também o surgimento de um singlete a 3,09 ppm, relativo a hidrogênios metilênicos mais desprotegidos. No espectro de IV foi observado o aparecimento de uma nova banda de absorção em 1579 cm⁻¹ referente a um grupo carbonila adicional.

Os padrões do substrato e dos possíveis produtos da conversão enzimática foram analisados por CLAE em fase reversa. Através da comparação de seus tempos de retenção (figura 5.5), com aqueles obtidos para as substâncias produzidas enzimaticamente, foi possível sugerir qual a rota biossintética que mais adequadamente explica a biossíntese da pilocarpina.

Figura 5.5: Cromatograma para determinação dos tempos de retenção dos padrões de *L*-histidina, ácido imidazol-pirúvico e ácido urocânico. Coluna Lichrospher NH₂ 7 µm (250 x 4 mm). Eluentes ACN: H₂O (9:1) e tampão KH₂PO₄ 10 mmol/L (pH= 3). Comprimento de onda para detecção 220 nm. Fluxo de 1 mL/ min.

Não foi verificada a formação do ácido *trans*-urocânico (**12**) nos ensaios enzimáticos para desaminases. Tanto no extrato protéico de folhas quanto no extrato protéico de raízes, não foi identificado no cromatograma do ensaio qualquer pico com tempo de retenção igual a 5 minutos (ácido *trans*-urocânico). Em extratos aquosos de folhas e raízes de *P. pennatifolius*, analisados por CLAE (DE ORSI *et al.*, 1995), não foi possível identificar a presença do ácido *trans*-urocânico¹. Estas observações somadas indicam que a proposta biossintética de

¹ Resultados não apresentados.

BROCHMANN-HANSEN *et al.* (1975) não é adequada para explicar a biossíntese dos alcalóides imidazólicos.

Nos ensaios para aminotransferases, foi verificada a atividade para esta enzima **apenas** no extrato protéico das raízes. Através da análise por CLAE, identificou-se no cromatograma referente a este ensaio (figura 5.6) um produto com tempo de retenção igual ao do ácido imidazol-pirúvico **(8)** (aproximadamente 19 minutos).

Figura 5.6: Cromatograma para o ensaio enzimático para aminotransferases com extrato protéico de raízes de *P. pennatifolius*. Coluna Lichrospher NH₂ 7 µm (250 x 4 mm). Eluentes ACN: H₂O (9:1) e tampão KH₂PO₄ 10 mmol/L (pH= 3). Fluxo de 1 mL/ min. Comprimento de onda para detecção 220 nm.

A conversão de *L*-histidina em ácido imidazol-pirúvico é uma etapa conhecida na degradação deste aminoácido em animais, sendo esta reação catalisada pela enzima histidina amônia transferase (HAT, EC 2.6.1.38) (TABOR, 1954; SPOLTER & BALDRIDGE, 1963). A presença de aminotransferases em vegetais superiores é conhecida desde a década de 1950, sendo fundamental no metabolismo primário (degradação de aminoácidos) e secundário (WIGHTMAN & FOREST, 1978).

A quantificação da atividade enzimática da HAT de *P. pennatifolius* foi realizada a partir da curva de calibração construída para o padrão ácido imidazol-pirúvico **(8)** (figura A5, Apêndice). O ácido *trans*-urocânico **(12)** foi escolhido como padrão interno devido a sua semelhança estrutural com o produto formado, por seu tempo de retenção ser distinto das outras substâncias envolvidas na reação e por esta substância não ter sido identificada nos extratos vegetais.

A atividade da HAT (EC 2.6.1.38) em *P. pennatifolius* foi quantificada em 0,530 nKat/mL de acordo com a equação 5.1. A atividade específica foi de 46,09 nKat/mg de proteína (concentração de proteínas no extrato: 11,5 µg/mL). Este valor é comparável àquele relatado para a enzima aspartato aminotransferase presente em *Phaseolus vulgaris* (53,34 nKat/mg) (FOREST & WIGHTMAN, 1972).

Como a HAT não é uma enzima que participa exclusivamente das rotas biossintéticas do metabolismo secundário, sua atividade específica é relativamente maior que a de outras enzimas envolvidas na biossíntese de alcalóides anteriormente estudadas (tabela 5.2) (MORENO *et al.*, 1994).

Tabela 5.2: Atividades de algumas enzimas envolvidas na biossíntese de alcalóides (MORENO *et al.*, 1994)

Enzima	Atividade (nKat/ mL)
Corismato mutase (CM)	0,02
Fenilalanina amônia liase (PAL)	0,0005
Antranilato sintase (AS)	0,0025
Triptofano descarboxilase (TDC)	0,020
Estrictosidina sintase (ST)	0,1
Estrictosidina- β -glucosidase (SG)	2,0

As tentativas de concentração dessa enzima, através da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, resultaram na perda total da atividade catalítica. Este fato pode estar relacionado a modificações irreversíveis na estrutura terciária adequada para que esta enzima apresente atividade.

Quanto à obtenção dos parâmetros cinéticos relativos à caracterização da enzima HAT de *P. pennatifolius* foram obtidos os seguintes resultados:

- pH ótimo

A curva obtida na determinação do pH ótimo para a extração da enzima HAT de *P. pennatifolius* é mostrada a seguir:

Figura 5.7: Variação da atividade enzimática em função do pH do ensaio

O pH no qual esta enzima apresentou sua atividade máxima, de acordo com os tampões utilizados, situou-se entre 8-9. Este resultado demonstra que a HAT presente nas raízes de *P. pennatifolius* tem sua atividade influenciada pelo pH de modo idêntico a outras aminotransferases de espécies vegetais (tabela 5.3).

- Velocidade de reação

A cinética de reação foi observada em cinco intervalos de tempo (0-30 minutos). Verificou-se que o tempo ótimo para conversão do precursor *L*-histidina ao intermediário ácido imidazol-pirúvico está entre 15-20 minutos de ensaio, como ilustra a curva de atividade a seguir.

Figura 5.8: Variação da atividade enzimática em função do tempo

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram feitos com extratos enzimáticos totais. Desta forma, além da enzima de interesse, podem existir outras que utilizam o produto formado como precursor em suas reações. Esse fator pode justificar o decréscimo da concentração de ácido imidazol-pirúvico com o tempo, no ensaio realizado.

- Concentração de substrato

A concentrações do precursor neste experimento variaram de zero a 15 $\mu\text{mol/L}$. A curva obtida para o experimento de saturação foi a seguinte:

Figura 5.9: Variação da atividade enzimática com a concentração de substrato

O valor de $V_{\text{máx}}$ indica a velocidade da reação enzimática quando todos os sítios catalíticos estão preenchidos com o substrato, enquanto que o valor de K_m indica a quantidade de substrato necessária para atingir metade desta velocidade. A determinação desses parâmetros é fundamental para a compreensão do mecanismo de catálise, comparação da atividade de isoenzimas, comparação quantitativa entre dois substratos diferentes, ação de inibidores, etc. (HENDERSON, 1993).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m para esta enzima foram obtidos a partir da equação da reta do gráfico obtido segundo Lineweaver- Burk (figura A7, Apêndice) sendo, respectivamente, 0,36 nkat/mL e 3,11 $\mu\text{mol/L}$. Comparativamente a outras aminotransferases, esses valores foram muitos baixos (tabela 5.3), sugerindo a necessidade de cofatores.

- Dependência de PLP

Com a adição de PLP, observou-se aumento 24% na atividade catalítica da HAT de *P. pennatifolius* ($2,2 \times 10^{-2}$ nKat/ mL sem o cofator e $2,7 \times 10^{-2}$ nKat/ mL com o cofator). Os resultados sugerem uma dependência desse cofator, uma vez que foi utilizado o extrato protéico total, isto é, sem qualquer purificação prévia.

Não é possível afirmar que há uma relação direta entre a adição de PLP e a atividade catalítica de aminotransferases provenientes de vegetais. Algumas possuem este cofator endógeno fortemente ligado à enzima e, mesmo após várias etapas de purificação, possuem valores de atividade semelhantes com ou sem a adição deste cofator (tabela 5.3).

Tabela 5.3: Propriedades de algumas aminotransferases isoladas de diferentes vegetais

Aminotransferases	Km (mmol/L)	pH ótimo	atividade ^a		Referências
			com PLP	sem PLP	
Alanina (EC 2.6.1.2)	2- 3	-	-	-	IRELAND & JOY, 1990
Asparagina (EC 2.6.1.21)	0,0025 ^b	-	-	-	IRELAND & JOY, 1990
Aspartato (EC 2.6.1.1)	-	8,0- 8,5	305,1	306	FOREST & WIGHTMAN, 1972; GIVAN ,1980
Fenilalanina (EC 2.6.1.58)	-	8,8	28,3	30,0	FOREST & WIGHTMAN, 1972; GIVAN ,1980
Glutamato (EC 2.6.1.4)	-	7,0	-	-	GIVAN ,1980
Serina (EC 2.6.1.45)	0,4- 0,9	-	-	-	IRELAND & JOY, 1990
Tirosina (EC 2.6.1.5)	-	-	20,3	20,2	FOREST & WIGHTMAN, 1972
Triptofano (EC 2.6.1.1)	-	-	18,8	19,2	FOREST & WIGHTMAN, 1972

^a enzimas purificadas

^b PLP dependente

5.4. Conclusões

Neste trabalho, foi relatada pela primeira vez a presença da HAT (EC 2.6.1.38) na espécie *Pilocarpus pennatifolius*, podendo esta enzima estar relacionada com o metabolismo de alcalóides imidazólicos. Estes dados, embora preliminares, indicam o aminoácido *L*-histidina (**7**) como um provável precursor do núcleo imidazólico na biossíntese do alcalóide pilocarpina (**1**).

A atividade catalítica dessa enzima (46,09 nKat/ mg de proteína) foi verificada exclusivamente nas raízes da espécie *P. pennatifolius*. Este dado sugere que a formação dos precursores dos alcalóides imidazólicos pode ocorrer nas raízes desta espécie, sendo estes translocados até as folhas, o sítio final de acúmulo (MAAT & BEYERMAN, 1983).

A enzima foi caracterizada quanto ao pH, à velocidade de reação, à concentração de substrato e à dependência do cofator PLP. A análise do conjunto de resultados obtidos mostra que esta enzima apresenta características semelhantes a de outras aminotransferases de vegetais superiores descritas na literatura (tabela 5.2) (GIVAN, 1980; WIGHTMAN & FOREST, 1978).

5.5. Referências bibliográficas

- BAUNMERT A, SCHNEIDER G & GRÖGER D (1986) Biosynthesis of acridone alkaloids. A cell-free system from *Ruta graveolens* cell suspension cultures, *Zeitung Naturforschung C: Bioscience*, **41C**, 187-192.
- BENTLEY R (1999) Secondary metabolite biosynthesis: the first century, *Critical Reviews in Biotechnology*, **19(1)**, 1-40.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- BROCHMANN-HANSEN E, NUNES MA & OLAH CK (1975) On biosynthesis of pilocarpine, *Planta Medica*, **28**, 1-5.
- CORSON BB, DODGE RA, HARRIS AS & HAZEN RK (1932) Ethyl benzoylformate, *Organic Synthesis Collection*, **1**, 241-245.
- COURTOIS D, PETIARD V & TOUCHE A (1996) Pilocarpine production process, USPTO: **5, 569, 593**.
- DE LUCA V & LAFLAMME P (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis, *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 225-233.
- DE LUCA V & ST PIERRE B (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, *Trends in Plant Science*, **5(4)**, 168-173.
- DEUS-NEUMANN B & ZENK MH (1986) Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion- trap mechanism, *Planta*, **167**, 44-53.

- DEWICK PM (2000) Alkaloids *In* Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John-Willey & Sons, New York. 270-374.
- EHMKE A, von BORSTEL K & HARTMANN T (1988) Alkaloid-N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris*, *Planta*, **176**, 83-90.
- FLORES H, VIVANCO JM & LOYOLA-VARGAS VM (1999) 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism, *Trends in Plant Science*, **4(6)**, 220-226.
- FOREST JC & WIGHTMAN F (1972) Amino Acids Metabolism in Plants III. Transamination of free protein amino acids in cell-free extracts of cotyledons and growing tissues of bushbean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.), *Canadian Journal of Biochemistry*, **50**, 813-829.
- GIVAN CV (1980) Aminotransferases in higher plants *In* The Biochemistry of plants– a comprehensive treatise (BJ MIFLIN, editor), vol. 5. Academic Press.
- HENDERSON PJF (1993) Statistical analysis of enzyme kinetic data *In* Enzyme assays - A Practical Approach (EISENHAHL R & DANSON MJ, editors). IRL Press, Oxford.
- IRELAND RJ & JOY KW (1990) Aminotransferases *In* Methods in Plant Biochemistry (DEY PM & HARBONE JB, editors). Academic Press, NY.
- JAMES JO (1950) Alkaloids in the plants *In* The Alkaloids (MANSKE RHF & HOLMES HL, editors). Academic Press, NY.

- KARANEWSKY DS, BADIA MC, CUSHMAN DW, DeFORREST JM, DEJNEKA T, LOOTS, MJ, PERRI MG, PETRILLO EW & POWELL JR (1988) (Phosphinyloxy)acyl Amino Acid Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme (ACE). 1. Discovery of (S)-1-[6-amino-2-[[hydroxy(4-phenylbutyl)phosphinyl]oxy]-L-proline, a novel orally active inhibitor of ACE, *Journal of Medicinal Chemistry*, **31**, 204-212.
- MAAT L & BEYERMAN HC (1983) The imidazole alkaloids *In* The alkaloids - Chemistry and Pharmacology (BOSSI A, editor), vol. 22. Academic Press.
- MORENO PRH, van der HEIJDEN R & VERPOORTE R (1994) Induction of secondary metabolism in *Cataranthus roseus* cell suspension cultures in response to UV irradiation of a benzoic acid derivative, *Heterocycles*, **39(2)**, 457-465.
- MOTHES K (1955) Physiology of alkaloids, *Annual Reviews of Plant Physiology*, **6**, 393-432.
- de ORSI D, GAGLIARDI L, CHIMENTI F & TORNELLI D (1995) High-performance liquid chromatographic determination of urocanic acid isomers in cosmetic products, *Chromatographia*, **41(5/6)**, 370-372.
- ROBERTS MF (1987) Papaver latex and alkaloids storage vacuoles *In* Plant vacuole their importance in solute compartmentation in cells and their application in plant biotechnology (B MARIN, editor), NATO Advanced Institute, Series 134, 513-528.
- ROBINSON R (1955) The Structural Relations of Natural Products. Oxford Press, London.

- RÖTHER D, POPPE L, VIERGUTZ S, LANGER B & RÉTEY J (2001) Characterization of the active site of histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*, *European Journal of Biochemistry*, **268**, 6011-6019.
- SMITH M (1994) Oxidation *In Organic Synthesis: Theory, reactions and methods*, Chapter 3. McGraw-Hill.
- SPOLTER & BALDRIDGE (1962) The metabolism of histidine, *The Journal of Biological Chemistry*, **238(6)**, 2071-2074.
- STOLL VS & BLANCHARD JS (1990) Buffers: principles and practice *In Methods in Enzymology* (DEUTSCHER MP, editor), vol. 182, Academic Press.
- TABOR H (1954) Metabolic studies on histidine, histamine and related imidazoles, *Pharmacology Reviews*, **6**, 229-343.
- VALDEZ IH, WOLFF A, ATKINSON JC, MACYNSKY AA & FOX PC (1993) Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction, *Cancer (Philadelphia)*, **71(5)**, 1848-1851.
- VERPOORTE, R. & MEMELINK, J. (2002) Engineering secondary metabolites Production in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, **13(2)**, 181-187.
- WADUD S, ONODERA R, OR-RASHID MM & AMIN MR (2000) Determination of histidine and related compounds in rumen fluid by liquid chromatography, *Journal of AOAC International*, **83**, 8-15.

- WAGNER G (1982) Compartmentation of plant cells: The role of the vacuole, *Recent Advances in Phytochemistry*, **16**, 1-45.
- WEBER U (1876) Ueber die Wirkung des Pilocarpium muriaticum, *Central. Med. Wiss.*, **44**, 409-422.
- WIERNAN R (1981) Secondary products and cell tissue differentiation *In* The Biochemistry of Plants (CONN EE, editor). Academic Press, NY.
- WIGHTMAN F & FOREST JC (1978) Properties of plant aminotransferases, *Phytochemistry*, **17**, 1455-1471.
- WINK M (1986) Storage of quinolizidine alkaloids in epidermal tissues, *Zeitung Naturforschung C: Bioscience*, **41C**, 375- 380.
- _____ (1987) Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids *In* Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants (CONSTABEL F & VASIL IK, editors). Academic Press, NY.
- _____ (1990) Physiology of secondary products formation in plants *In* Secondary Products of Plant Tissue Culture (CHARLWOOD BV & RHODES MJC, editors). Clarendon Press, Oxford.
- WINK M & MENDE P (1987) Uptake of lupine alkaloids by epidermal cells and suspension - cultured cells of *Lupinus polyphyllus*, *Planta Medica*, **5**, 465-469
- WINK M & WITTE L (1984) Turnover and transport of quinolizidine alkaloids: Diurnal variation of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L, *Planta*, **161**, 519-524.

ZENK MH (1980) Enzymatic synthesis of ajmalicine and related indole alkaloids, *Journal of Natural Products*, **43**, 438-451.

_____ (1985) Enzymology of benzyloquinoline alkaloid formation *In* The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids (PHILLIPSON JD, ROBERTS MF & ZENK MH, editors). Springer-Verlag, Berlin and New York.

ZENK MH, RÜFFER M, AMANN M & DEUS-NEUMANN B (1985) Benzyloquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes, *Journal of Natural products*, **48**, 725-738.

CAPÍTULO 6

**Análise dos constituintes voláteis de
P. pennatifolius Lemm. por CG/ EM**

6.1. Generalidades sobre óleos essenciais

Os óleos essenciais representam uma das mais importantes classes de substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal. São conhecidos por suas propriedades medicinais, pela sua ampla utilização na indústria de alimentos (flavorizantes e aromatizantes) e na de cosméticos (perfumaria) (PHILLIPSON, 1990; SILVA FIGUEIREDO, 1992).

Entre as substâncias que constituem os óleos essenciais predominam os terpenos e os fenilpropanóides. Também são encontrados aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, epóxidos, etc. São originados a partir de duas rotas biossintéticas: a via do isopreno (terpenos) e a via do chiquimato (fenilpropanóides) (SIMÕES & SPITZER, 1999; SILVA FIGUEIREDO, 1992).

De acordo com HABERTLAND (1928), estas misturas de substâncias têm como principal função proteger as plantas contra o ataque de predadores. Os óleos essenciais também desempenham papel importante na reprodução de uma espécie vegetal (atração de polinizadores) e, além disso, colaboram no controle da temperatura (tornam a superfície das folhas brilhantes e refletoras da luz solar, reduzindo a temperatura de 10 a 15°C) (SILVA FIGUEIREDO, 1992).

Como mencionado anteriormente, os óleos voláteis são conhecidos pelas propriedades medicinais que apresentam. Entre algumas das atividades farmacológicas relacionadas aos óleos essenciais estão a antiespasmódica, a capacidade de estimular do sistema secretor e

cardiovascular, a anti-séptica, a antibacteriana, a antiinflamatória e a conservante, além de produzir diversos efeitos sobre o SNC (SIMÕES & SPITZER, 1999; SILVA FIGUEIREDO, 1992).

Quanto à obtenção, os óleos essenciais podem ser extraídos por vários métodos, de acordo com a finalidade a que se destinam e do local onde estão armazenados nas plantas. Os procedimentos mais comuns para extração de óleos são: arraste a vapor (hidrodestilação), extração por solventes orgânicos e CO₂ supercrítico, prensagem e enfloração (SIMÕES & SPITZER, 1999).

6.1.1. Óleos essenciais em espécies do gênero *Pilocarpus*

Algumas espécies de *Pilocarpus*, entre as quais, *P. trachyllophus*, *P. spicatus*, *P. mycrophyllus*, *P. jaborandi* e *P. pauciflorus*, já foram estudadas quanto aos constituintes voláteis das folhas (CRAVEIRO *et al.*, 1979; ANDRADE NETO *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1997; ANDRADE NETO, *et al.*, 2000; ANDRADE NETO *et al.*, 2002). Alguns destes óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (*P. pauciflorus*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. spicatus*) (SANTOS *et al.*, 1997).

Considerando a facilidade de obtenção e análise dos óleos essenciais e a disponibilidade de material vegetal, foi realizada a análise do óleo obtido a partir das folhas de *P. pennatifolius*. A determinação dos constituintes deste óleo volátil permitirá traçar algumas relações com os perfis já determinados para outras espécies de *Pilocarpus*.

6.2. Experimental

6.2.1. Material vegetal

As folhas de *Pilocarpus pennatifolius* foram coletadas no Parque Ecológico da Universidade de Campinas, Campinas (SP) em outubro de 2000. O espécimen voucher (número 30683) está depositado no herbário da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

6.2.2. Extração do óleo essencial de *Pilocarpus pennatifolius*

O óleo foi obtido por destilação por arraste a vapor em um aparelho de Clevenger a partir das folhas secas (TA) e moídas (Farmacopéia Brasileira, 1988). Utilizou-se uma massa de 390g de folhas. O óleo foi extraído da fase aquosa condensada com *n*-pentano, secado sobre Na₂SO₄ anidro e concentrado em evaporador rotatório (TA) sob vácuo. A quantificação dos constituintes presentes no óleo essencial foi realizada através da integração da área relativa a cada sinal no cromatograma, enquanto que a identidade das substâncias foi obtida através da determinação de seus respectivos índices de Kóvats (por coinjeção com uma série homóloga de *n*-alcanos).

A utilização deste índice minimiza as variações de tempo de retenção em função das diferentes condições de medida, sendo recomendável que a análise seja realizada em duas colunas de polaridade diferente.

6.2.3. Cromatografia em fase gasosa

A análise por CG foi realizada em um cromatógrafo HP 5890 series II, equipado com detector por ionização em chama (FID), injetor automático (HP 7673), integrador eletrônico (HP 3396A) e coluna capilar HP-5 (5% fenil 95% metilsilicone, 30 m x 0,32 mm d.i. x 0,25 μ m espessura do filme). Utilizou-se He como gás de arraste. A programação de temperatura do forno foi a seguinte: 50°C (isoterma durante 2 minutos) com taxa de aquecimento de 2°C/min até 290°C (isoterma durante 10 minutos). As temperaturas do detetor e injetor foram 350°C e 100°C, respectivamente.

6.2.4. Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

A análise por CG/EM foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu QP 5000 com detetor de massas quadrupolar operando com ionização por impacto eletrônico a 70 eV e He como gás de arraste (fluxo de 1mL/min). Duas colunas capilares - DB-5 e CARBOWAX 20M (30m x 0,25mm d.i. x

0,25 μ m espessura do filme) - foram utilizadas. A programação da temperatura do forno foi a seguinte:

1. coluna DB-5: de 60°C a 300°C em uma taxa de aquecimento de 5°C/min.

2. coluna Carbowax 20M: de 60°C a 250°C em uma taxa de aquecimento de 3°C/min.

As temperaturas do injetor e do detetor foram, respectivamente, 180°C e 260°C.

6.3. Resultados e discussão

Após a extração das folhas de *P. pennatifolius* em aparelho de Clevenger foi obtido um óleo levemente amarelado com rendimento de 0,31% em massa. Este valor é da mesma ordem de grandeza relatados para as demais espécies de *Pilocarpus* estudadas quanto aos óleos essenciais (CRAVEIRO *et al.*, 1979; ANDRADE NETO *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1997; ANDRADE NETO, *et al.*, 2000; ANDRADE NETO *et al.*, 2002).

A combinação das técnicas descritas anteriormente permitiu a identificação de 99,3% da composição dos constituintes voláteis das folhas de *P. pennatifolius* (tabela 6.1).

Os hidrocarbonetos tridecano (**15**) (56,8%) e pentadecano (**16**) (25,5%) foram os constituintes majoritários do óleo obtido a partir das folhas de *P. pennatifolius* e ainda não haviam sido descritos nos óleos essenciais de outras espécies de *Pilocarpus*. A presença de hidrocarbonetos em espécies de *Pilocarpus* já havia sido relatada nas graxas epi-cuticulares. As espécies de *Pilocarpus* apresentaram um padrão de hidrocarbonetos C₁₄ a C₃₃ (SKORUPA *et al.*, 1998; NEGRI *et al.*, 1998). As cetonas alifáticas 2-undecanona e 2-tridecanona, identificadas como majoritárias em outras espécies de *Pilocarpus* (todas coletadas no Nordeste do Brasil), não foram detectadas em *P. pennatifolius*.

A análise por CG/EM mostrou que cerca de 15% do óleo é constituído de sesquiterpenos (12,3% de hidrocarbonetos e 2,6%

oxigenados). Na figura a seguir são apresentadas as composições dos óleos essenciais de outras espécies de *Pilocarpus*.

Referências: *P. jaborandi*, *P. affinis*, *P. microphyllus*, J. Nat. Prod. (1979). *P. trachyllophus*, J. Essent. Oil Res. (1995). *P. trachyllophus* e *P. jaborandi*, J. Essent. Oil Res. (2000). *P. spicatus*, J. Essent. Oil Res. (2002). *P. pauciflorus*, *P. grandiflorus*, Phytother. Res. (1997).

Figura 6.1: Comparação da composição de óleos essenciais de algumas espécies de *Pilocarpus*

Observando-se a figura 6.1 podemos verificar que a composição do óleo de *P. pennatifolius* é semelhante à composição das espécies *P. pauciflorus*, *P. spicatus* e *P. affinis*, que possuem como constituintes majoritários outras substâncias diferentes de mono-, sesqui- ou diterpenos. Para as demais espécies descritas na figura acima, os constituintes principais, mencionados na literatura, são os mono- e sesquiterpenos.

Tabela 6.1: Composição do óleo essencial das folhas de *P. pennatifolius*, índice de Kováts para cada substância e porcentagem relativa dada por GC/EM

Substância	IKDB5*	IKCW*	%
Monoterpenos hidrocarbonetos			
<i>cis</i> - β -ocimeno (1)	1031	1195	0,2
<i>trans</i> - β -ocimeno (2)	1041	1209	0,2
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			
β -elemeno (3)	1384	1570	2,1
β -cubebeno (4)	1381	1484	0,1
α -copaeno (5)	1367	1432	0,7
α -humuleno (6)	1442	1598	0,1
germacreno B (7)	1546	1815	0,3
β -cariofileno (8)	1409	1580	1,2
δ -cadineno (9)	1515	1778	0,2
γ -muuroleno (10)	1473	1637	6,6
β -borboneno (11)	1375	1460	0,2
biciclogermacreno (12)	1486	1734	0,6
β -selineno (13)	1476	1678	0,2
Sesquiterpenos oxigenados			
espatulenol (14)	1569	2039	2,6
Hidrocarbonetos			
tridecano (15)	1299	1561	56,8
pentadecano (16)	1496	1759	25,5
Outras substâncias			
hexanol (17)	864	1281	0,1
undecanol (18)	1301	1661	0,6
eugenol (19)	1348	2078	0,3
hexadecanoato de metila (20)	1921	2171	0,5
nonadecanal (21)	2107	2540	0,2

* IK DB-5 e IK CW índice de Kováts nas colunas DB-5 e Carbowax 20M respectivamente

O fenilpropanóide eugenol (**19**) foi descrito pela primeira vez no óleo essencial de uma espécie de *Pilocarpus*, constituindo 0,3% da composição total.

Figura 6.2: Substâncias identificadas no óleo essencial de *P. pennatifolius*

Quanto à rota de ciclização dos sesquiterpenos, devemos considerar as seguintes possibilidades a partir dos cátions *E,E* e *E,Z* farnesila:

Figura 6.3: Ciclização de carbocátions levando à formação dos esqueletos eudesmano e cadinano

Comparando-se estas reações com as estruturas dos sesquiterpenos identificados no óleo essencial de *P. pennatifolius*, podemos observar que os esqueletos eudesmano ((**5**), (**12**), (**13**)) e cadinano ((**4**), (**9**), (**11**)) são predominantes, ocorrendo em proporção semelhante (tabela 6.1). Nas demais espécies de *Pilocarpus*, a ciclização ocorre principalmente através da rota do cadinano (CRAVEIRO *et al.*, 1979; ANDRADE NETO *et al.*, 2000, 2002).

6.4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar que o óleo essencial de *P. pennatifolius* possui um perfil semelhante ao das espécies *P. pauciflorus*, *P. spicatus* e *P. affinis*. Nestas espécies, os constituintes majoritários são substâncias oriundas da via do acetato, sendo que os terpenos ocorrem em menor proporção. Em *P. pennatifolius* os hidrocarbonetos tridecano e pentadecano foram majoritários (tabela 6.1). Nas demais espécies de *Pilocarpus* estudadas, as cetonas tridecanona e pentadecanona foram identificadas como constituintes majoritários e, por este motivo, chegou-se a supor que estas substâncias poderiam ser consideradas marcadores taxonômicos para o gênero. Os resultados obtidos para *P. pennatifolius* sugerem estudos mais completos a fim de confirmar esta hipótese. Esta diferença na composição dos óleos essenciais pode estar relacionada a fatores edáficos, climáticos ou populacionais.

Quanto às estruturas dos sesquiterpenos presentes no óleo das folhas de *P. pennatifolius*, pode ser verificado que a ciclização ocorre preferencialmente através das rotas do eudesmano e cadinano, praticamente na mesma proporção (figura 6.3). Nas demais espécies de *Pilocarpus* há um predomínio da rota de ciclização que leva ao anel cadinano.

6.5. Referências bibliográficas

ADAMS RP (1989) *In* Identification of Essential Oil by Ion Trap Mass Spectrometry. Academic Press, San Diego.

ANDRADE NETO M, MAFEZOLI J, CUNHA UA, da SILVEIRA SC & SILVEIRA ER (1995) Volatile constituents of *Pilocarpus trachyllophus* Holmes, *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 671-674.

ANDRADE NETO M, CUNHA UA, MAFEZOLI J & SILVEIRA ER (2000) Volatile constituents of *Pilocarpus trachyllophus* Holmes and *Pilocarpus jaborandi* Holmes (Rutaceae), *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 769- 774.

ANDRADE NETO M, CUNHA UA, MAFEZOLI J & SILVEIRA ER (2002) Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil, *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 319-324.

CRAVEIRO AA, ANDRADE CHS, MATOS FJA & ALENCAR JW (1979) Essential oils from Brazilian Rutaceae. I Genus *Pilocarpus*, *Journal of Natural Products*, **42(6)**, 669-671

Farmacopéia Brasileira (1988) Parte I. Atheneu, São Paulo.

HABERLANDT G (1928) *Physiological plant anatomy*, 2nd edition. London, MacMillan *apud* FIGUEIREDO ACS (1992) *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*: produção de metabólitos secundários *in vivo* e *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa.

- IENNINGS W & SHIBAMOTO T (1980) Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic press, New York.
- NEGRI G, SALATINO MLF, SALATINO A & SKORUPA LA (1998) An aromatic hydrocarbon from the foliar epicuticular wax of *Pilocarpus jaborandi*, *Phytochemistry*, **49(1)**, 127-129.
- SANTOS FA, CUNHA GMA, VIANE GSB, RAO VSN, MANOEL AN & SILVEIRA ER (1997) Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants, *Phytotherapy Research*, **11**, 67-69.
- SILVA FIGUEIREDO AC (1992) *Achillea millefolium* ssp *millefolium*: produção de metabólitos secundários *in vivo* e *in vitro*. Dissertação de Doutorado. Universidade de Lisboa, Lisboa.
- SIMÕES CMO & SPITZER V (1999) Óleos voláteis *In* Farmacognosia - da planta ao medicamento (SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, de MELLO JCP, MENTZ LA & PETROVICK PR, organizadores), 387-415. Editora da UFSC, Florianópolis.
- SKORUPA LA, SALATINO MLF & SALATINO A (1998) Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic meaning, *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 655-662.

CAPÍTULO 7

**Considerações finais sobre o estabelecimento de
culturas *in vitro* de *P. pennatifolius* e sobre a
biossíntese de pilocarpina**

7.1. Conclusão geral

Foi estabelecida uma cultura de células *in vitro* da espécie *Pilocarpus pennatifolius* Lemm. (Rutaceae), capaz de produzir o alcalóide imidazólico pilocarpina (principal alcalóide isolado a partir de espécies de *Pilocarpus*).

O acúmulo de pilocarpina foi observado apenas no estágio final da cultura de células, de maneira semelhante a outros resultados relatados para culturas de células *in vitro* (LINDSEY & YEOMAN, 1983; BANTHORPE, 1994). A concentração do alcalóide na cultura foi determinada por técnicas cromatográficas e, comparando-se com a quantidade de pilocarpina encontrada nas folhas, podemos verificar que a cultura acumula cerca de dez vezes menos pilocarpina (capítulo 4). O estabelecimento de culturas *in vitro* de plantas que produzam metabólitos secundários com propriedades farmacológicas (de interesse comercial), em larga escala, ainda é um objetivo a ser atingido (VERPOORTE *et al.*, 1991).

O estabelecimento de uma cultura de células de *P. pennatifolius* na qual foi verificado o acúmulo de pilocarpina é um ponto de partida para a obtenção desse alcalóide *in vitro*. A otimização das condições de cultivo, o uso de eliciadores (ELIERT, 1987), a regulação enzimática a partir do conhecimento das etapas biossintéticas (VERPOORTE & MEMELINK, 2002) e os estudos de biologia molecular podem contribuir para que o acúmulo deste metabólito seja aumentado no cultivo *in vitro*.

Os ensaios enzimáticos realizados forneceram uma indicação sobre a primeira etapa na biossíntese da pilocarpina, a origem do anel imidazólico desse alcalóide, além da determinação do sítio de sua formação na planta (capítulo 5).

Os resultados obtidos, embora preliminares, indicaram a presença da enzima histidina amino-transferase (HAT, EC 2.6.1.38) realizando a conversão do aminoácido *L*-histidina a ácido imidazol-pirúvico. Vale a pena ressaltar que este é o primeiro trabalho realizado com relação ao estudo das enzimas envolvidas na biossíntese da pilocarpina. A atividade catalítica foi detectada exclusivamente nas raízes de *P. pennatifolius* e foi quantificada em 46,09 nKat/ mg de proteína. A caracterização de alguns parâmetros catalíticos desta enzima indicou que a HAT de *P. pennatifolius* é semelhante a outras aminotransferases descritas em espécies vegetais (GIVAN, 1980).

Outros experimentos importantes para a elucidação desta rota biossintética são a identificação tanto do precursor do anel lactônico como da enzima que realiza sua condensação com a porção imidazólica. A partir da compreensão das etapas subsequentes da biossíntese da pilocarpina será possível interferir na regulação dessas enzimas de modo a otimizar a produção e acúmulo do alcalóide *in vitro*.

Como objetivo secundário, surgido durante a etapa de revisão bibliográfica, foi realizada a determinação da composição do óleo essencial das folhas de *P. pennatifolius* (capítulo 6). Embora o número de espécies de *Pilocarpus* seja pequeno, são poucos os dados fitoquímicos disponíveis, além da presença ou não de pilocarpina.

A análise do óleo essencial de folhas de *P. pennatifolius* por CG e CG/EM indicou como constituintes majoritários os hidrocarbonetos tridecano e pentadecano. Nas demais espécies estudadas, foram identificadas como constituintes principais as cetonas tridecanona e pentadecanona, que chegaram a ser propostas como marcadores taxonômicos para a espécie.

As cetonas identificadas no óleo essencial das demais espécies de *Pilocarpus* como majoritárias (ANDRADE NETO *et al.*, 2002; ANDRADE NETO *et al.*, 1995; CRAVEIRO *et al.*, 1979) não estão presentes no óleo de *P. pennatifolius*. Esses resultados sugerem a necessidade de estudos mais completos, uma vez que se propôs a presença dessas substâncias como marcadores taxonômicos para o gênero.

7.2. Referências bibliográficas

- ANDRADE NETO M, MAFEZOLI J, CUNHA UA, da SILVEIRA SC & SILVEIRA ER (1995) Volatile constituents of *Pilocarpus trachyllophus* Holmes, *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 671-674.
- ANDRADE NETO M, CUNHA UA, MAFEZOLI J & SILVEIRA ER (2002) Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil, *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 319-324.
- CRAVEIRO AA, ANDRADE CHS, MATOS FJA & ALENCAR JW (1979) Essential oils from Brazilian Rutaceae. I Genus *Pilocarpus*, *Journal of Natural Products*, **42(6)**, 669-671
- BANTHORPE DV (1994) Secondary metabolism in plant tissue culture - scope and limitations, *Natural Product Reports*, **11 (3)**, 303-328.
- ELIERT U (1987) Elicitation: Methodology and Aspects of Application *In* Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants- Cell Culture in Phytochemistry (CONSTABEL F & VASIL IK, editors), **4**, 153-196. Academic Press.
- GIVAN CV (1980) Aminotransferases in higher plants, *In* The Biochemistry of plants - a comprehensive treatise (MIFLIN BJ, editor), vol. 5. Academic Press, New York.
- LINDSEY K & YEOMAN MM (1983) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures, *Journal of Experimental Botany*, **34(145)**, 1055-1065.

VEPOORTE R, VAN DER HEIJDEN R, VAN GULIK WM & TEN HOOPEN HJG
(1991) *Plant Biotechnology for the Production of Alkaloids: present status and prospects* In *The Alkaloids*, **40**, 1-187.

VERPOORTE R & MEMELINK J (2002) Engineering Secondary Metabolites Production in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, **13(2)**, 181-187.

APÊNDICE

Figura A1: Espectro de RMN^1H para o ácido 2-hidróxi-3-(5-imidazoil)-propanóico (7a) obtido em um aparelho Varian DPX-300, com frequência de 300 MHz para o núcleo de hidrogênio

Figura A2: Espectro de IV para ácido 2-hidróxi-3-(5-imidazoil)-propanóico (7a)

Figura A3: Espectro de RMN^1H para o ácido 2-imidazol-pirúvico (8) obtido em um aparelho Varian DPX-300, com frequência de 300 MHz para o núcleo de hidrogênio

Figura A4: Espectro de IV para ácido 2-imidazol-pirúvico (8)

Figura A5: Curva de calibração para o ácido imidazol-pirúvico a partir da razão das áreas do padrão (AIP) e do padrão interno (AU) obtidas por CLAE

AIP = ácido imidazol-pirúvico
AU = ácido urocânico

Figura A6: Gráfico Lineaweaver- Burk para determinação de $V_{\max}$ e K_m