



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Piauí - UFPI

**Prospecção tecnológica, perfil químico sazonal de alcaloides imidazólicos, aspectos
polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* Stapt ex
Wardleworth (Jaborandi)**

David Fernandes Lima

Teresina – PI

2016

DAVID FERNANDES LIMA

**Prospecção tecnológica, perfil químico sazonal de alcaloides imidazólicos, aspectos
polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* Stapt ex
Wardleworth (Jaborandi)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da RENORBIO
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza
de Almeida Leite

Teresina – PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

L732p Lima, David Fernandes.
Prospecção tecnológica, perfil químico sazonal de alcaloides imidazólicos, aspectos polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* Stapt ex Wardleworth (Jaborandi) / David Fernandes Lima. -- 2016.
114 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.
“Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.”

1. *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). 2. Alcaloides - Sazonalidade. 3. Prospecção tecnológica. 4. *Pilocarpina*. 5. *Epiisopiloturina*. I. Título.

CDD 615.7


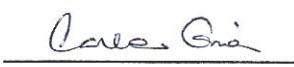


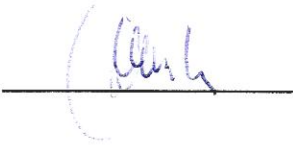
FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: DAVID FERNANDES LIMA

TÍTULO DO PROJETO: "Prospecção tecnológica, perfil químico sazonal de alcaloides imidazólicos, aspectos polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* Stapt ex Wardleworth (Jaborandi)".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Carla Eiras, UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva – UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 08 de julho de 2016.

HORÁRIO: 14h30

LOCAL: Auditório do Campus de Parnaíba/UFPI.

Agradecimentos

À Deus e Nossa Senhora de Fátima, por estarem sempre presentes na minha vida, dando força, coragem e determinação.

Aos meus pais, José Humberto Viana Lima e Elita Fernandes Lima, pelos exemplos de força, coragem, incentivo, orações e o amor incondicional.

À minha esposa Luiza Cristina Oliveira Duarte, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus filhos, Bianca Cristina Fernandes Duarte e Cauã Fernandes Duarte, simplesmente por existirem em minha vida.

Aos meus irmãos, José Humberto Viana Lima Júnior, Henrique Fernandes Lima e Guirlanda Fernandes Lima, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, por acreditar nos sonhos dos seus alunos e nos dar força e determinação para seguir em frente mesmo diante das adversidades. Sem o seu apoio desde o início para ingresso no mestrado e doutorado nada disso teria sido possível.

À Anidro do Brasil Extrações S.A e a Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação LTDA, empresas do Grupo Centroflora, o meu muito obrigado pelos anos de parceria científica e troca de experiências.

À Luciene Costa Vasconcelos, pelo apoio, amizade e anos de convívio na empresa Anidro do Brasil Extrações S.A.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, *Campus* Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, pelo apoio técnico aqui representados pela técnica Dra. Leiz Vêras e pela Professora Dra. Ivanilza Moreira de Andrade.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos (*in memoriam*), Prof^a. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal e Prof^a. Mary Anne Medeiros Bandeira, pelo exemplo de profissionais e seres humanos, a quem devo o amor pelas plantas medicinais.

Aos amigos de turma do doutorado RENORBIO: Daniel Dias Rufino Arcaño, José Couras Filho e Irisdalva Sousa Oliveira pelo apoio, amizade e companheirismo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo suporte técnico através do Portal Periódicos.

Ao RENORBIO/ Ponto focal Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho.

Dedicatória

À minha família e a Deus, pelo apoio e amor incondicionais.

Epígrafe

“... No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz bem feito ou não faz...”

(Ayrton Senna)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
Da	Dalton
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI	Epiisopiloturina
EPO	Escritório Europeu de Patentes (<i>European Patent Office</i>)
EPS	Epiisopilosina
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
ISP	Isopilosina
ISSR	Sequências intercaladas a repetições simples (<i>Inter sample-simple sequence repeat</i>)
LC/ MS	Cromatografia líquida/ Espectroscopia de massas (<i>Liquid chromatography/ Mass spectrometry</i>)
m/m	Massa/ massa
MAC	Macaubina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIL	Pilocarpina
PIS	Pilosina
pmol	picomol
r.p.m	Rotações por minuto
TBE	Tris-borato EDTA
USPTO	Escritório de marcas e patentes dos Estados Unidos (<i>United States Patent and Trademark Office</i>)
UV	Ultra violeta
V	Voltagem

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Imagens de estruturas morfológicas da espécie *Pilocarpus microphyllus*. (A) Destaque para os folíolos apicais de *Pilocarpus microphyllus* em crescimento de espécie cultivada no estado do Piauí, Brasil. (B) Frutos de *P. microphyllus* coletados por comunidade extrativista no estado do Piauí. Fotos: (A) Arquivo pessoal, 2012. (B): Arquivos da indústria Anidro do Brasil Extrações S.A, 2012.....28
- FIGURA 2 – Estrutura química planar do alcaloide imidazólico epiisopiloturina extraído da espécie *Pilocarpus microphyllus*. Adaptado de VÉRAS et. al., 2013; VÉRAS, 2014.....30
- FIGURA 3 – Número de publicações das principais espécies do gênero *Pilocarpus* do período de 1993 a 2012 na base de dados da Web of Science.....36
- FIGURA 4 – As publicações das principais espécies da planta *Pilocarpus* no contexto mundial pesquisado na base de dados Web of Science.....37
- FIGURA 5 – Participação dos países em artigos publicados na Web of Science (*P. microphyllus*) do período de 1993 a 2012.38
- FIGURA 6 – Aspectos tecnológicos mais pesquisados pelos autores com *Pilocarpus microphyllus*.....40
- FIGURA 7 – Número de patentes depositadas por ano para o gênero *Pilocarpus*.....41
- FIGURA 8 – Países que mais depositaram patentes envolvendo *Pilocarpus*.....42
- FIGURA 9 – Países que mais patentearam envolvendo *Pilocarpus microphyllus*.....42

FIGURA 10 – Patentes por código de classificação internacional de acordo com o potencial tecnológico.....	43
FIGURA 11 – Patentes por código de classificação internacional de acordo com o potencial tecnológico.....	43
FIGURA 12 – Apresenta a fórmula estrutural, fórmula molecular e massa molar da epiisopiloturina.....	57
FIGURA 13 – Demonstra a identificação da epiisopiloturina por cromatografia líquida de alta eficiência contra padrão de referência de epiisopiloturina 1,94 mg/mL e pilocarpina 5,0 mg% nas condições cromatográficas estabelecidas no método.....	58
FIGURA 14 – Apresenta a estrutura do alcaloide, epiisopiloturina base, íntegra (A) e fragmentada MS2 (B), MS3 (C), analisado por espectrometria de massas, demonstrando que o isolamento foi realizado com sucesso.....	59
FIGURA 15 – Apresenta a estrutura do alcaloide, epiisopiloturina nitrada, íntegra (A) e fragmentada MS2 (B), analisado por espectrometria de massas, demonstrando que a modificação foi realizada com sucesso.....	60
FIGURA 16 – <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth (jaborandi). (A) <i>P. microphyllus</i> com destaque para os folíolos terminais (Foto: Arquivos Anidro do Brasil Extrações S.A.). (B) <i>P. microphyllus</i> colhida por comunidades extrativistas utilizando tesoura de poda. (Foto: Arquivos Anidro do Brasil Extrações S.A.).....	67
FIGURA 17 – Cromatogramas e espectro de massas dos alcaloides padrões de <i>Pilocarpus microphyllus</i> analisados por LC/MS. (A) Pilocarpina, mostrando o tempo de retenção de 15,05 minutos e peso molecular na espectrometria de massas, <i>electron spray ionization</i> (ESI) (M+H ⁺) em 209 Da. (B) Epiisopiloturina, mostrando o tempo de	

retenção de 17,05 minutos e peso molecular na espectrometria de massas, *electron spray ionization* (ESI) (M+H⁺) em 287 Da.....74

FIGURA 18 – Precipitação e teor de pilocarpina (%) nas estações seca e chuvosa. (A) Distribuição das chuvas (mm) durante as estações seca e chuvosa. [0,00 mm; 109,69 mm ($p = 0,0003$), respectivamente] na plantação de *P. microphyllus*, estado do Piauí, nordeste do Brasil. (B) Porcentagem de PIL % (m/m) nas estações seca e chuvosa [0,727; 0,683 ($p = 0,5637$), respectivamente] da AM01. (C) Porcentagem de PIL % (m/m) nas estações seca e chuvosa [0,560; 0,350 ($p = 0,0149$), respectivamente] da AM02. (D) Porcentagem de PIL % (m/m) nas estações seca e chuvosa [0,687; 0,415 ($p = 0,0030$), respectivamente] da AM03.....75

FIGURE 19 – Perfis cromatográficos típicos obtidos por análise via CLAE das três populações cultivadas de *P. microphyllus*. (A) Grupo AM01 (jaborandi linha verde). (B) Grupo AM02 (jaborandi linha tradicional). (C) Grupo AM03 (jaborandi linha tradicional). Pico número 1: pilocarpina e pico número 2: epiisopiloturina.....77

FIGURA 20 – Pilocarpina (% m/m) durante um ano obtido por análise via CLAE. Os dados de cada ponto representam os valores médios \pm desvio padrão de uma amostra de folhas extraídas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre AM01, AM02 e AM03 pelo teste de Tukey ao nível de 5%.....78

FIGURA 21 – Análise de Coordenadas Principais de 11 variáveis morfológicas quantitativas e 111 marcadores moleculares binários de três grupos de *Pilocarpus microphyllus* (AM01, AM02, AM03) representando duas linhagens cultivadas. Linha verde (preto: AM01); Linha tradicional (vermelho: AM02, azul: AM03).....85

FIGURA S1 – Padrões ISSR nos grupos AM01, AM02, AM03 *Pilocarpus microphyllus* cultivada (analisados com software GenAlEx 6.5).....90

FIGURA S2 – *Pilocarpus microphyllus* folíolos terminais evidenciando o peciólulo. Fileira superior: grupo AM01 (linha verde) exemplares de 1 a 5. Fileira mediana: grupo AM02 (linha tradicional) exemplares de 6 a 10. Fileira inferior: grupo AM03 (linha tradicional) exemplares de 11 a 15.....90

FIGURA S3 – Análise de componentes principais de 11 variáveis morfológicas quantitativas, mostrando a projeção dos dois primeiros componentes principais. Preto: Grupo AM01 (linha verde). Vermelho e azul: grupos AM02 e AM03 (linha tradicional).....91

FIGURA S4 – Análise linear discriminante de duas linhas (verde, tradicional) de *Pilocarpus microphyllus* cultivado usando onze variáveis morfológicas quantitativas. Preto: grupo AM01 (linha verde). Vermelho: grupos AM02 e AM03 (linha tradicional).....92

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Espécies do gênero <i>Pilocarpus</i> de distribuição no Brasil seguidas de seus respectivos estados da federação e referência.....	27
TABELA 1 – Busca de publicações e patentes por gênero e espécie da planta estudada nas bases de dados.....	35
TABELA 2 – Número de publicações e patentes com gênero e espécie da planta estudada.....	39
TABELA 3 – Iniciadores utilizados para a geração de marcadores polimórficos ISSR em genótipos de <i>Pilocarpus microphyllus</i> , evidenciando os respectivos níveis de loci polimórficos.....	71
TABELA 4 – Teor de pilocarpina (% , m/m) na AM01, AM02 e AM03 obtidos por CLAE durante um ano.....	79
TABELA 5 – Teor de episopiloturina (% , m/m) na AM01, AM02 e AM03 obtidos por CLAE durante um ano.....	81
TABELA 6 – Dados da variação genética dos 15 indivíduos dos três grupos de <i>Pilocarpus microphyllus</i> (AM01, AM02, AM03) analisados via software GenAlEx 6.5.....	82
TABELA 7 – Análise de variância molecular (AMOVA) dos três grupos de <i>Pilocarpus microphyllus</i> cultivado, analisado pelo software GenAlEx 6.5.....	83
TABELA 8 – Distâncias genéticas emparelhadas (valores de PhiPT) entre os três grupos (AM01, AM02, AM03) de <i>Pilocarpus microphyllus</i> domesticado, com base em dados de marcadores ISSR analisados via software GenAlEx 6.5.....	83
TABELA S1 – Condições ambientais registradas durante a coleta de <i>Pilocarpus microphyllus</i> nas estações chuvosa e seca.....	93

TABELA S2 – Padrões totais de bandas para dados binários (haplóides) pela população.....	93
--	----

Resumo

O presente estudo descreve a sazonalidade dos alcaloides imidazólicos da espécie *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi) cultivada no estado do Piauí, Brasil, com foco na utilização como matéria-prima para o isolamento de fitofármacos pela indústria farmacêutica nacional. O Capítulo I apresenta breve revisão sobre o gênero *Pilocarpus* e a espécie *P. microphyllus* e seus principais alcaloides. No Capítulo II a prospecção tecnológica destaca a importância da espécie devido ao uso do alcaloide pilocarpina (PIL) no tratamento do glaucoma e xerostomia e abre perspectivas para aplicação biotecnológica dos alcaloides secundários. A base *Web of Science* para gênero *Pilocarpus* resultou em 56 artigos e para a espécie *P. microphyllus* 17 entre 1993 a 2012. O Brasil se destaca com a publicação de 16 artigos, no entanto na busca por patentes o Japão lidera na proteção refletindo a falta de cultura no Brasil de patentear tecnologias. O capítulo III apresenta a patente: processo de extração, purificação e isolamento do alcaloide epiisopiloturina (EPI), submetida INPI/ BR 102012 0183013, co-titularidade UFPI e Anidro S.A. O capítulo IV apresenta a sazonalidade dos alcaloides, PIL e EPI, em três populações (AM01, AM02 e AM03) cultivadas durante um ano. Os resultados evidenciaram PIL como principal alcaloide e o teor diferindo entre as populações em todos os meses, exceto setembro. O grupo jaborandi linha verde (AM01) apresentou um alto teor de PIL em comparação com jaborandi linha tradicional (AM02 e AM03), que tiveram teores semelhantes. O teor de PIL diminuiu gradualmente nas três populações no período chuvoso. Quanto ao teor de EPI, AM01 apresentou significativamente menor teor em todos os meses, demonstrando não ser a melhor variedade para a extração do alcaloide promissor EPI contra a esquistossomose. Marcadores ISSR e análise morfológica separaram claramente as populações, em concordância com resultados das análises químicas. Em conclusão, este estudo evidencia pela primeira vez a correlação entre os estudos químicos com os alcaloides imidazólicos e os marcadores polimórficos moleculares e morfológicos de *P. microphyllus* cultivado no estado do Piauí, destacando os benefícios potenciais de uma abordagem multidisciplinar com o objetivo de fornecer subsídios à indústria para seleção de possíveis variedades de interesse medicinal e conservação das populações nativas.

Palavras-chaves: *Pilocarpus microphyllus*, jaborandi, sazonalidade, alcaloides, prospecção tecnológica, pilocarpina, epiisopiloturina.

Abstract

This study describes the seasonal change in imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi) species cultivated in the state of Piauí, Brazil, focusing on the use as raw material for the phytochemical isolation by the national pharminochemical industry. Chapter I presents a brief review of the *Pilocarpus* genus and *P. microphyllus* species and its main alkaloid. In Chapter II technological forecasting highlights the importance of the species due to the use of pilocarpine (PIL) alkaloid in the treatment of glaucoma and xerostomia and opens perspectives for biotechnological application of secondary alkaloids. The *Web of Science* for *Pilocarpus* genus results in 56 articles and for *P. microphyllus* species 17, between 1993-2012. Brazil stands out with the publication of 16 articles, but in the patents search Japan leads in protecting reflecting the lack of Brazil's patent technology culture. Chapter III presents the patent: extraction, purification and isolation process of epiisopiloturine (EPI) alkaloid submitted to INPI / BR 102012 0183013, assignee UFPI and Anidro S.A. Chapter IV presents the seasonal change of PIL and EPI alkaloids in three cultivated populations (S01, S02 and S03) for one year. The results showed that PIL is the main alkaloid and its levels differed among populations in all months, except September. The jaborandi green line group (S01) showed a high PIL content compared to jaborandi traditional line (S02 and S03), which had similar alkaloid contents. PIL content gradually decreased in the three populations in rainfall periods. Concerning EPI content, S01 group presented significantly lower EPI content in all months, demonstrating that it is not the best source for extraction of this promising EPI alkaloid against schistosomiasis. ISSR markers and morphological analysis clearly separated S01 from S02 and S03, being in good agreement with chemical analysis results. In conclusion, this study shows for the first time a correlation between the chemical of imidazole alkaloids with molecular polymorphic markers and morphological of *P. microphyllus* cultivated in Piauí state, highlights the potential benefits of a multidisciplinary research approach aiming at supporting both industry selection of medicinal interest possible varieties and conservation of natural resources.

Keywords: *Pilocarpus microphyllus*, jaborandi, seasonality, alkaloids, technological forecasting, pilocarpine, episopiloturine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1. GÊNERO <i>PILOCARPUS</i>	26
3.2. ESPÉCIE <i>PILOCARPUS MICROPHYLLUS</i>	27
3.3. ALCALOIDES DA ESPÉCIE <i>PILOCARPUS MICROPHYLLUS</i>	29
4. CAPÍTULO II – ARTIGO PUBLICADO: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA ESPÉCIE <i>PILOCARPUS MICROPHYLLUS</i> (REVISTA GEINTEC).....	31
RESUMO.....	32
4.1. INTRODUÇÃO.....	33
4.2. METODOLOGIA.....	34
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.4. CONCLUSÃO.....	44
4.5. AGRADECIMENTOS.....	44
5. CAPÍTULO III – PATENTE: PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA	45
5.1. INVENTORES.....	47
5.2. CAMPO DA INVENÇÃO.....	49
5.3. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO.....	49
5.4. SUMÁRIO DA INVENÇÃO.....	51
5.5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.....	51
5.5.1. EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO INDUSTRIAL DO RESÍDUO DE EPIISOPILOTURINA.....	51
5.5.2. PRÉ-PURIFICAÇÃO INDUSTRIAL.....	52
5.5.3. ISOLAMENTO POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	52
5.5.4. NITRAÇÃO DA EPIISOPILOTURINA LIVRE.....	53

5.5.5. IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA MOLECULAR.....	53
5.6. BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURAS	53
5.7. REINVINDICAÇÕES.....	55
5.8. RESUMO.....	56
5.9. FIGURAS.....	57
6. CAPÍTULO IV – ARTIGO SUBMETIDO: PERIÓDICO PLOS ONE.....	61
RESUMO.....	64
6.1. INTRODUÇÃO.....	65
6.2. MATERIAL E MÉTODO.....	66
6.2.1. MATERIAL VEGETAL.....	66
6.2.2. AMOSTRAGEM E COLETA DE PILOCARPUS MICROPHYLLUS.....	67
6.2.3. EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES NAS FOLHAS DE PILOCARPUS MICROPHYLLUS.....	67
6.2.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	68
6.2.5. ALCALOIDES PADRÕES.....	68
6.2.6. CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	69
6.2.7. VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS QUANTITATIVAS.....	69
6.2.8. MARCADORES MOLECULARES.....	69
6.2.9. ANÁLISE DE DADOS.....	72
A. ANÁLISES QUÍMICAS.....	72
B. ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	72
C. VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DA POPULAÇÃO.....	73
D. ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES.....	73
6.3. RESULTADOS.....	77
6.3.1. ALCALOIDES PADRÕES.....	73
6.3.2. CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	74
6.3.3. SAZONALIDADE DE PIL.....	76
6.3.4. SAZONALIDADE DE EPI.....	80

6.3.5. ANÁLISES MOLECULARES.....	81
A. DIVERSIDADE E RELAÇÕES GENÉTICAS INTRAPOPULACIONAIS.....	81
B. DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES.....	82
6.3.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO JABORANDI (<i>P. MICROPHYLLUS</i>).....	84
6.3.7. CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS.....	85
6.4. DISCUSSÃO	86
6.5. AGRADECIMENTOS.....	89
6.6. INFORMAÇÕES DE APOIO.....	90
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	94
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICE.....	104
APÊNDICE 1 – COMPROVANTE DE PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE	104
APÊNDICE 2 – PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE PELO NUCLÉO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA UFPI.....	105
APÊNDICE 3 – SUBMISSÃO MANUSCRITO AO PERIÓDICO PLOS ONE.....	106
APÊNDICE 4 – CARTA DE ACEITE ARTIGO EM PARCERIA EMBRAPA COM A ESPÉCIE <i>P. MICROPHYLLUS</i>.....	107
APÊNDICE 5 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO	108

1. Introdução

A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapt ex Wardleworth (Rutaceae), conhecida popularmente como jaborandi, se destaca como uma das mais importantes da biodiversidade brasileira devido à exportação anual de toneladas de sais de pilocarpina, especialmente o cloridrato (BRANDAO et al., 2008). Este fitofármaco está presente em farmacopéias de inúmeros países devido ao uso medicinal no controle do glaucoma (AGBAN et. al., 2016) e tratamento da xerostomia (GIL-MONTOYA et.al., 2016). *P. microphyllus* é nativa e não endêmica do Norte e Nordeste do Brasil de ocorrência nos estados do Piauí, Pará e Maranhão (PINHEIRO, 2002). Durante muitas décadas o extrativismo não sustentável de *P. microphyllus* para extração em larga escala de pilocarpina resultou na diminuição do número de espécimes em populações nativas, diminuição de altura e tamanho dos arbustos, perda de vigor, levando a espécie a ser incluída na lista da flora brasileira ameaçada de extinção (IBAMA, 2008). Diante deste fato as indústrias que atualmente beneficiam a espécie têm investido em estudos de domesticação e cultivo em larga escala, bem como em projetos de extrativismo sustentável.

A partir do ano de 2009, a indústria farmoquímica Anidro do Brasil Extrações S.A em parceria com a Agência Alemã de Cooperação Técnica com o Brasil (GIZ), Instituto Floravida, Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Piauí (SEMAR-PI), Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Crédito Fundiário e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), iniciou o projeto intitulado “Valorização do Jaborandi” no estado do Piauí. A abrangência deste projeto no Piauí são os Territórios dos Cocais Piauienses com foco nos municípios de Matias Olímpio, São João do Arraial, Luzilândia e Porto. Estas localidades apresentam como semelhança as desigualdades sociais, fragilidade da organização social e econômica, ausência de um arranjo produtivo extrativista consolidado, além da inexistência de políticas públicas que promovam o uso sustentável dos recursos naturais. Atualmente o projeto já realizou o cadastro individual e capacitação técnica de mais de 300 colhedores em manejo sustentável da espécie, promoveu a implantação de viveiros de produção de mudas para o reflorestamento de áreas devastadas, realizou o mapeamento, inventário e monitoramento de áreas de

manejo sustentável em assentamentos e propriedades particulares (VEGEFLORA, 2010).

A empresa Anidro S.A também deu início em 2011 a implantação de uma fazenda de cultivo em larga escala de *P. microphyllus* na região do perímetro irrigado dos Tabuleiros Litorâneos, situado no município de Parnaíba, estado do Piauí. Todavia, desde 2003 a empresa vem realizando estudos de domesticação na mesma área através da plantação em pequena escala de exemplares da espécie, obtendo bons resultados de adaptabilidade da mesma na região litorânea do estado do Piauí.

Diante da implantação do “Projeto de Valorização do Jaborandi” e fazenda de cultivo no estado do Piauí e a repercussão positiva de ambos no âmbito social, econômico e ambiental da região, surgiu à necessidade da empresa Anidro S.A avaliar o perfil de alcaloides imidazólicos na fazenda de cultivo nos Tabuleiros Litorâneos, a fim de verificar a sazonalidade dos mesmos e a existência de possíveis variedades da mesma espécie presentes na plantação. Vale ressaltar que o extrativismo da espécie nativa ocorre no período de estiagem (agosto a dezembro) principalmente devido à impossibilidade dos coletores realizarem a secagem das folhas ao sol no período do inverno (janeiro a julho). Diante de tal fato é de suma importância a determinação do perfil de alcaloides imidazólicos durante todo o ano bem como comprovar cientificamente qual a melhor época de coleta promovendo assim um aumento do rendimento dos alcaloides na massa verde obtida. Aliado a isto a observação da existência de variabilidade genética nas coleções cultivadas através do uso de marcadores moleculares e morfológicos da espécie complementam este estudo multi e interdisciplinar, onde a química, a botânica e a biologia molecular constituem ferramentas importantes para auxiliar a indústria e a comunidade local no desenvolvimento econômico, social e ambiental da região.

A Anidro do Brasil Extrações S.A possui parceria na forma de convênio com a Universidade Federal do Piauí (UFPI), por intermédio do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC) no *Campus* de Parnaíba, neste convênio se consolidou desde 2009, atividades de pesquisa, estágios, extensão e prospecção tecnológica. Como resultados positivos desta parceria podem ser exemplificadas o desenvolvimento de técnicas voltadas a obtenção de outros alcaloides imidazólicos oriundos da espécie para aplicações biotecnológicas, sendo depositadas pelo nosso grupo de pesquisa no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) no ano de 2009 a patente intitulada “Processo de Obtenção de Epiisopiloturina e sua Aplicação no

Combate à Infecções Parasitárias” (LEITE et al., 2009) e em meados de 2012 depositada a segunda patente desta parceria intitulada “Processo de Extração, Purificação e Isolamento do alcaloide Epiisopiloturina” (LEITE et al., 2012). Além das patentes, até o presente momento, já foram publicadas dissertações de mestrado e teses doutorado, inúmeros artigos científicos em periódicos internacionais de alto impacto e diversas comunicações em congressos nacionais e internacionais também fruto desta parceria. Atualmente o alcaloide epiisopiloturina se destaca como uma molécula promissora contra as formas jovens e adultas e inibição da ovoposição do helminto *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose (VÉRAS et al., 2012; VÉRAS et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015). Diante do exposto acima o presente trabalho é de grande relevância para região agregando maior valor a espécie e possibilitando sua exploração sustentável.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar, quantificar e avaliar a sazonalidade dos alcaloides imidazólicos da espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth (Jaborandi) no estado do Piauí, Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar prospecção tecnológica do gênero *Pilocarpus* e da espécie *P. microphyllus*.
- Padronizar metodologias de extração, purificação, isolamento, identificação e quantificação via CLAE dos alcaloides imidazólicos secundários da espécie *P. microphyllus*;
- Identificar e quantificar mensalmente via CLAE os alcaloides imidazólicos da espécie *P. microphyllus* cultivada no estado do Piauí, município de Parnaíba, Brasil;
- Avaliar as possíveis influências agronômicas e ambientais no perfil de alcaloides imidazólicos da espécie *P. microphyllus* cultivada;
- Realizar análises utilizando marcadores polimórficos moleculares e morfológicos da espécie *P. microphyllus* cultivada para comparar seus padrões taxonômicos com o perfil de alcaloides;
- Investigar de forma preliminar a diversidade genética em coleções cultivadas de *P. microphyllus* no estado do Piauí, Brasil;

Capítulo I

Revisão de Literatura

Gênero *Pilocarpus* espécie *Pilocarpus microphyllus*

3. Capítulo I – Revisão de literatura

3.1 Gênero *Pilocarpus*

A biodiversidade brasileira é considerada como uma das maiores do planeta, onde são estimadas mais de 56 mil espécies de plantas correspondendo aproximadamente 19% da flora mundial (GIULIETTI et al., 2005). Apesar do grande número de espécies apenas 0,4 % da flora brasileira apresenta relatos de investigação (BRASIL, 2012).

Dentro deste contexto se destaca o gênero *Pilocarpus* Vahl pertencente à família Rutaceae, conhecido no Brasil como jaborandi. O nome “jaborandi” vem do tupi-guarani “*yaborã-di*” que significa planta que faz babar, devido à ação agonista colinérgica da pilocarpina em receptores muscarínicos do tipo M3 nas glândulas salivares promovendo um aumento considerável na salivação (LIMA, 2008; MIURA, 2009).

O gênero *Pilocarpus* compreende atualmente 16 espécies neotropicais de distribuição entre os trópicos de câncer e capricórnio, ocorrendo principalmente na América Latina (KAASTRA, 1982; ROMERO, 2005). A maioria de seus representantes ocorre no Brasil, predominantemente em sua porção oriental onde são encontradas 15 espécies sendo 12 destas endêmicas (QUADRO 1), constituindo o centro de diversidade genética do gênero (SKORUPA, 1996; SKORUPA 2003).

QUADRO 1 – Espécies do gênero *Pilocarpus* de distribuição no Brasil seguidas de seus respectivos estados da federação e referência.

ESPÉCIES	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	MA, PA, PI	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	BA, PE, CE	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus riedelianus</i>	AL, PE, BA, ES, PB	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus spicatus</i>	RJ, ES, BA, PE, PB, CE, SP	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus trifoliolatus</i>	PA	Skorupa e Pirani , 2004
<i>Pilocarpus grandiflorus</i>	ES, BA, AL	Skorupa, 2003
<i>Pilocarpus trachylophus</i>	MG, BA, PI, MA, CE	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus pennatifolius</i>	BA, GO, MG, SP, PR, SC, RS, MT, MS, PE	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus giganteus</i>	BA, MG, RJ, SP, ES	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus peruvianus</i>	AC, RO, MT	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus pauciflorus</i>	BA, SC, PR, SP, RJ, ES	Skorupa, 2003
<i>Pilocarpus alatus</i>	PA; MA	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus manuensis</i>	AC	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus sulcatus</i>	BA; MG	Skorupa, 1996
<i>Pilocarpus carajaensis</i>	PA	Skorupa, 1996

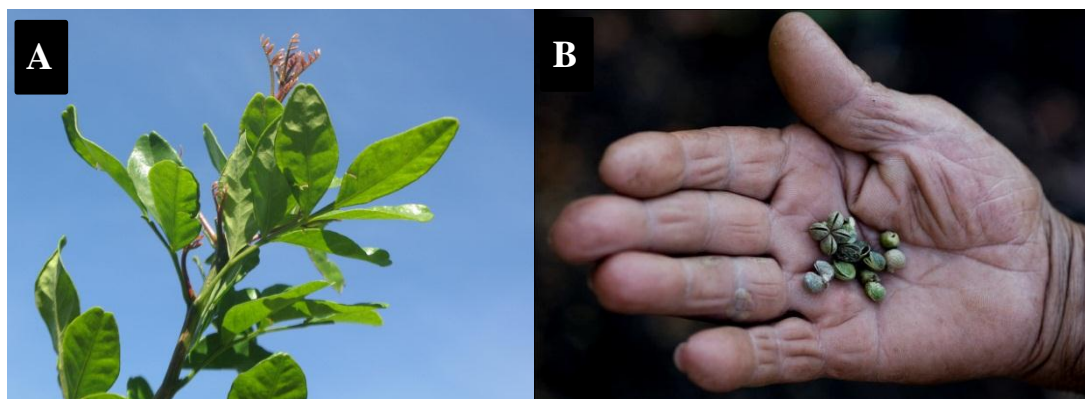
3.2 Espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth (Rutaceae)

A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth (Rutaceae) se destaca como uma das mais importantes da flora brasileira já utilizada há séculos pelos indígenas e comunidades tradicionais. Esta espécie se apresenta como um arbusto de cerca de 1 metro de altura de ocorrência nas regiões Nordeste (Maranhão e Piauí) e Norte (Pará) do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2016). Está presente em florestas ombrófilas densas, mas também onde as matas são menos densas, sendo frequentemente encontrada em afloramentos rochosos, regionalmente denominados canga, que são reservas minerais cobertas com vegetação savânica. No centro da mata é encontrado preferencialmente em ambientes mais iluminados como em clareiras (VEGEFLORA, 2010).

O arbusto *P. microphyllus* apresenta caule pubescente, alado, formando canalículo. Folhas alternas 4,5 – 12,5 x 3,5 – 6,5 cm, opostas ou subverticiladas, verde

oliva, cartácea, imparipenadas, raras paripenadas, raque alada, pubescente, arqueadas formando canalículo; pecíolo canaliculado, pubescente. Folíolos 1,2 – 4,2 x 1- 1,7 cm, variando de 3-9 (-11), coloração verde escuro na face adaxial e verde claro na face abaxial, sésseis, opostos, lâmina do folíolo cartácea, glabra, elíptica a estreitamente ovada, ápice emarginado, base assimétrica, ráquila pubescente, margem inteira; venação braquidódroma, nervura central proeminente na face adaxial, plana ou levemente proeminente na abaxial, nervuras secundárias de 4-9. Frutos dispostos em cachos contendo cápsulas deiscentes de córtex acinzentado e liso. Flores amarelo-esverdeadas, pequenas e arranjadas em recemos compactos (SKORUPA, 2000a; SKORUPA, 2000b) (FIGURA 1)

FIGURA 1 – Imagens de estruturas morfológicas da espécie *Pilocarpus microphyllus*. (A) Destaque para os folíolos apicais de *Pilocarpus microphyllus* em crescimento de espécie cultivada no estado do Piauí, Brasil. (B) Frutos de *P. microphyllus* coletados por comunidade extrativista no estado do Piauí.



Fonte: (A) Arquivo pessoal, 2012. (B): Arquivos da indústria Anidro do Brasil Extrações S.A, 2012.

Atualmente a espécie é explorada comercialmente única e exclusivamente como fonte do alcaloide imidazólico pilocarpina utilizado para o tratamento do glaucoma e xerostomia (AGBAN et. al., 2016; GIL-MONTOYA et.al., 2016). Este ingrediente ativo farmacêutico (*Active Pharmaceutical Ingredient* “API”) é extraído, purificado e isolado há décadas da espécie *P. microphyllus* devido a mesma apresentar os maiores teores do ativo em relação as outras espécies do gênero *Pilocarpus* (SANDHU et al., 2006; BRANDAO et al., 2008).

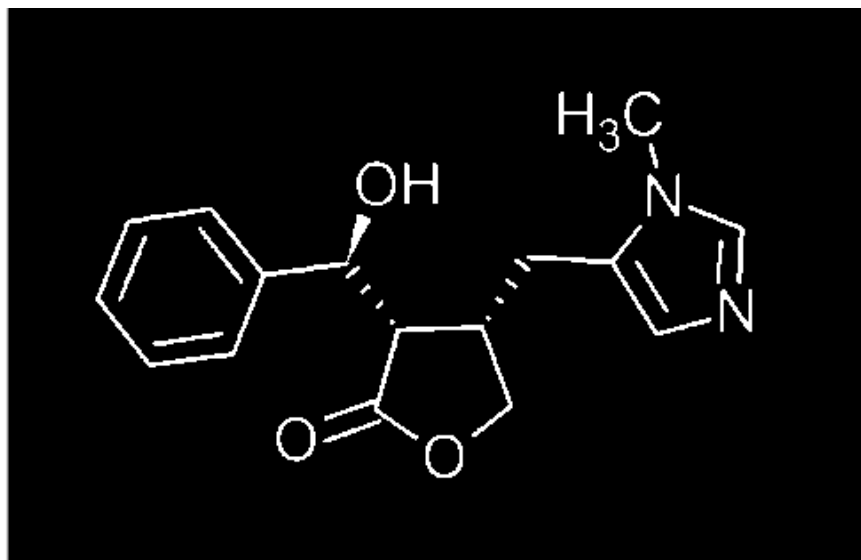
3.3 Alcaloides do gênero *Pilocarpus* e da espécie *Pilocarpus microphyllus*

As drogas vegetais alcaloídicas são ainda hoje fonte de obtenção de fitofármacos, bem como constituem uma fonte inesgotável de novas moléculas bioativas. Apesar dos grandes avanços tecnológicos nos campos da síntese e semi-síntese orgânica nas últimas quatro décadas, a indústria de obtenção de alcaloides ainda é extrativa. São empregadas técnicas de extração dos alcaloides totais da matéria-prima vegetal para posterior purificação, onde substâncias de alta pureza são requeridas pelas indústrias farmacêuticas a fim de produzir medicamentos seguros, eficazes e biodisponíveis (LIMA, 2008).

A espécies do gênero (*Pilocarpus* sp.) constitui uma fonte sustentável de alcaloides imidazólicos onde até a presente data foram identificados as seguintes estruturas: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nor-7(11)-dehidro-pilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina, N,N-dimetiltriptamina, plastidesmina, (1H)-4-metoxi-2-quinolona, dictamina, 3-nor-8(11)-dehidro-pilocarpina, anidropilosina e pilosinina (SANTOS e MORENO, 2004; ABREU et al., 2007; VÉRAS et.al., 2013).

Apesar da grande variedade de estruturas químicas descritas para o gênero, apenas a pilocarpina é utilizada na terapêutica atual. Nos últimos 7 anos o alcaloide imidazólico epiisopiloturina (FIGURA 2) tem despontado em relação aos demais devido sua promissora e potente ação esquistossomicida (MIURA, 2009; LEITE et.al., 2009; LEITE et.al., 2012; VÉRAS et.al., 2012; VÉRAS et al., 2013; VÉRAS, 2014; GUIMARÃES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015).

FIGURA 2 – Estrutura química planar do alcaloide imidazólico epiisopiloturina extraído da espécie *Pilocarpus microphyllus*.



Fonte: Adaptado de VÉRAS et. al., 2013; VÉRAS, 2014.

Capítulo II

Artigo publicado – Revista GEINTEC:

Prospecção Tecnológica da espécie *Pilocarpus*
microphyllus

4. Capítulo II – Prospecção Tecnológica do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): espécie economicamente importante no Norte e Nordeste do Brasil

Este capítulo transcreve na íntegra os resultados publicados em periódico nacional na forma de artigo na Revista **GEINTEC: Gestão, Inovação e Tecnologias** em março de 2015 (Qualis Capes B4, B4 = FI $\geq 0,0$ e $< 0,6$ + Scielo, Biotecnologia).

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*): ESPÉCIE ECONOMICAMENTE IMPORTANTE NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

David Fernandes Lima¹; Rogério Almiro Oliveira Silva²; Lana Grasiela Alves Marques³; Leiz Maria Costa Vêras¹; Evelyne Rolim Braun Simões⁵; José Roberto de Souza de Almeida Leite¹; Maria Rita de Moraes Chaves Santos⁶; Cláudia Pessoa⁷

¹Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC. Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio – Universidade Federal do Piauí – UFPI – Parnaíba/PI – Brasil

david@vegeflora.com.br; leiz.veras@gmail.com; jrsaleite@gmail.com

²Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio – Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina/PI – Brasil

rogerio.ufpi@gmail.com

⁵Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio – Universidade Federal do Ceará – UFC Fortaleza/CE – Brasil

evelyne_simoese@hotmail.com

⁶Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC – Universidade Federal do Piauí – UFPI Teresina/PI – Brasil

mrita@ufpi.edu.br

^{3,7} Universidade Federal do Ceará – UFC – Fortaleza/CE – Brasil
lanagrasielela@gmail.com; cpessoa@ufc.br

Revista GEINTEC – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – 2015. Vol. 5/n. 1/ p.1626-1638 1626 D.O.I.: 10.7198/S2237-0722201500010003

Resumo

A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew é uma planta nativa do Norte e Nordeste do Brasil de ocorrência no leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e ao norte do Piauí. É uma das espécies medicinais brasileiras de maior destaque constando em farmacopéias de todo o mundo, devido ao uso de seu princípio ativo pilocarpina. Ao utilizar a base de periódicos *Web of Science* com o gênero *Pilocarpus*, o resultado foi de 56 artigos e para a espécie *Pilocarpus microphyllus* o resultado

encontrado foi de 17 artigos. A busca por patentes foi utilizando a base de patentes *Derwent Innovation Index*, INPI, EPO e USPTO obtendo um resultado contrastante com o número de artigos, considerando o Japão em destaque na proteção da pesquisa envolvendo *Pilocarpus*. O gênero *Pilocarpus* com ênfase na espécie *Pilocarpus microphyllus* por meio dos artigos publicados e das patentes concedidas tanto no Brasil como em outros países destaca a relevante importância econômica e industrial da espécie bem como estabelece perspectivas futuras na descoberta de novas aplicações farmacológicas e biotecnológicas dos outros alcaloides que até o momento permanecem desconhecidas.

Palavras-chave: Jaborandi; *Pilocarpus*; *Pilocarpus microphyllus*; Prospecção tecnológica.

4.1. Introdução

O jaborandi é sinônimo vulgar de várias plantas silvestres do Brasil e países vizinhos, das famílias *Piperaceae* e *Rutaceae*, que possuem propriedades medicinais (CORRÊA, 1969). A família *Rutaceae* possui cerca de 150 gêneros e 1500 espécies (CRONQUIST, 1988). No Brasil se encontram 15 espécies, sendo que 12 delas ocorrem exclusivamente no território brasileiro, com maior ocorrência em sua porção oriental, constituindo o centro de diversidade genética do gênero (SKORUPA, 2003).

A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew é nativa do Norte e Nordeste do Brasil de ocorrência no leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e ao norte do Piauí, movimentando o extrativismo de toneladas todos os anos nestes estados (PINHEIRO, 1997; LIMA, 2008). É uma das espécies medicinais brasileiras de maior destaque constando em farmacopéias de todo o mundo, devido ao uso de seu princípio ativo pilocarpina (LEWIS & ELVIN-LEWIS, 1977), sendo ainda na atualidade de grande relevância para as indústrias farmacêuticas e farmoquímicas nacionais e internacionais. Das folhas desta espécie são processados os sais cloridrato de pilocarpina, nitrato de pilocarpina, além de sua forma livre (pilocarpina base) utilizados na formulação de colírios para tratamento do glaucoma (TSAI et al., 2003; NORDSTROM et al., 2005; LIMA, 2008), sendo esta patologia de ampla ocorrência mundial e responsável pela exportação deste ativo para Europa, Estados Unidos, Japão, China e Índia movimentando milhões de dólares todos os anos.

Outras aplicações terapêuticas da pilocarpina foram elucidadas posteriormente, como por exemplo, o seu uso na forma oral para o tratamento da xerostomia (BAPTISTA NETO, 2004), mediante tratamento de radioterapia após neoplasias de cabeça e pescoço, sendo aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1994 (MOURA, 2003). Atualmente a importância do *P. microphyllus* reside na pesquisa e desenvolvimento da aplicação farmacológica e biotecnológica de outros alcaloides imidazólicos presentes nesta espécie, como recentemente a aplicação do alcaloide epiisopiloturina e epiisopilosina no combate a doenças negligenciadas (VERAS et. al., 2012; LEITE et. al., 2009; ROCHA, 2013) e a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do mesmo (SILVA et.al., 2013).

Diante da importância e uso desta espécie, a mesma foi explorada durante décadas no norte e nordeste do Brasil de maneira insustentável, a ponto de atualmente constar na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2008), sendo de extrema importância iniciativas que agreguem potencial tecnológico que dêem sustentabilidade a espécie devido a relevante importância para diversas comunidades extrativistas de baixa renda no norte e nordeste do Brasil nos estados federativos brasileiros do Piauí, Maranhão e Pará.

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção tecnológica a fim de se avaliar o perfil quantitativo das publicações e proteções com o gênero *Pilocarpus* e da espécie *Pilocarpus microphyllus*, no indexador *Web of Science* e a base de dados de patentes, *Derwent Innovation Index*, *European Patent Office* (EPO), no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil.

4.2. Metodologia

Para levantamento de dados foi utilizada a base de artigos da *Web of Science* e a base de dados de patentes *Derwent Innovation Index*, *European Patent Office* (EPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

O levantamento foi feito em maio de 2013 na base de artigos e patentes, utilizando como palavras-chave os termos “*Pilocarpus*” e “*Pilocarpus microphyllus*”. Os termos em inglês foram utilizados para as bases internacionais, enquanto que os termos em português foram utilizados para a busca de documentos na base nacional,

sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos no título e/ou resumo. Nesta pesquisa foi utilizado o *software Vantage Point* para tratamento bibliométrico, geração dos dados quantitativos e identificação de indicadores científicos. Os gráficos de depósitos de patentes que se referem ao ano e países estão com os dados das bases citadas.

4.3. Resultados e Discussão

Utilizando a base de periódicos *Web of Science* empregou-se como palavra-chave o gênero *Pilocarpus* resultando em 56 artigos e refinando para a espécie *Pilocarpus microphyllus* o resultado encontrado foi de 17 artigos. Os dados levantados por patentes resultaram num total de 97 documentos depositados entre 1918 (ano do primeiro depósito) a 2009. Durante a utilização de busca das patentes foram recuperados apenas os documentos que já tenham sido publicados (TABELA 1).

TABELA 1 – Busca de publicações e patentes por gênero e espécie da planta estudada nas bases de dados.

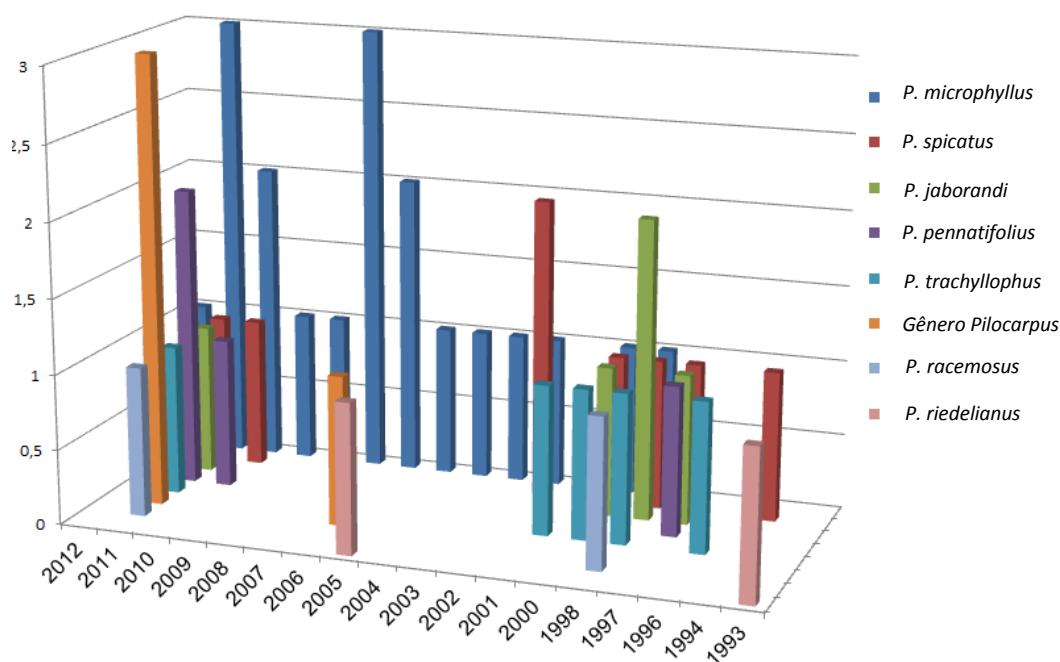
Palavras-chave	Artigos – <i>Web of Science</i>	Patentes – <i>Derwent Innovation Index</i>	EPO	USPTO	INPI
<i>Pilocarpus</i>	56	35	29	4	9
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	17	10	5	—	5

A FIGURA 3 representa os resultados das publicações com o gênero *Pilocarpus* do período de 1993 a 2012. Sete espécies de *Pilocarpus* se destacam na busca, *P. microphyllus*, *P. spicatus*, *P. jaborandi*, *P. pennatifolius*, *P. trachyllophus*, *P. racemosus* e *P. riedelianus*, dentre estas citadas apenas a espécie *P. racemosus* não ocorre em território brasileiro, sendo encontrada na Venezuela, Colômbia, México, El Salvador, Costa Rica, Cuba, Haiti e Porto Rico (SKORUPA, 1996).

A espécie *P. microphyllus* se encontra em destaque no número de publicações a partir do ano de 1999 (FIGURA 3), sendo esta espécie a mais importante do ponto de vista econômico de exploração industrial devido ao elevado teor do alcaloide

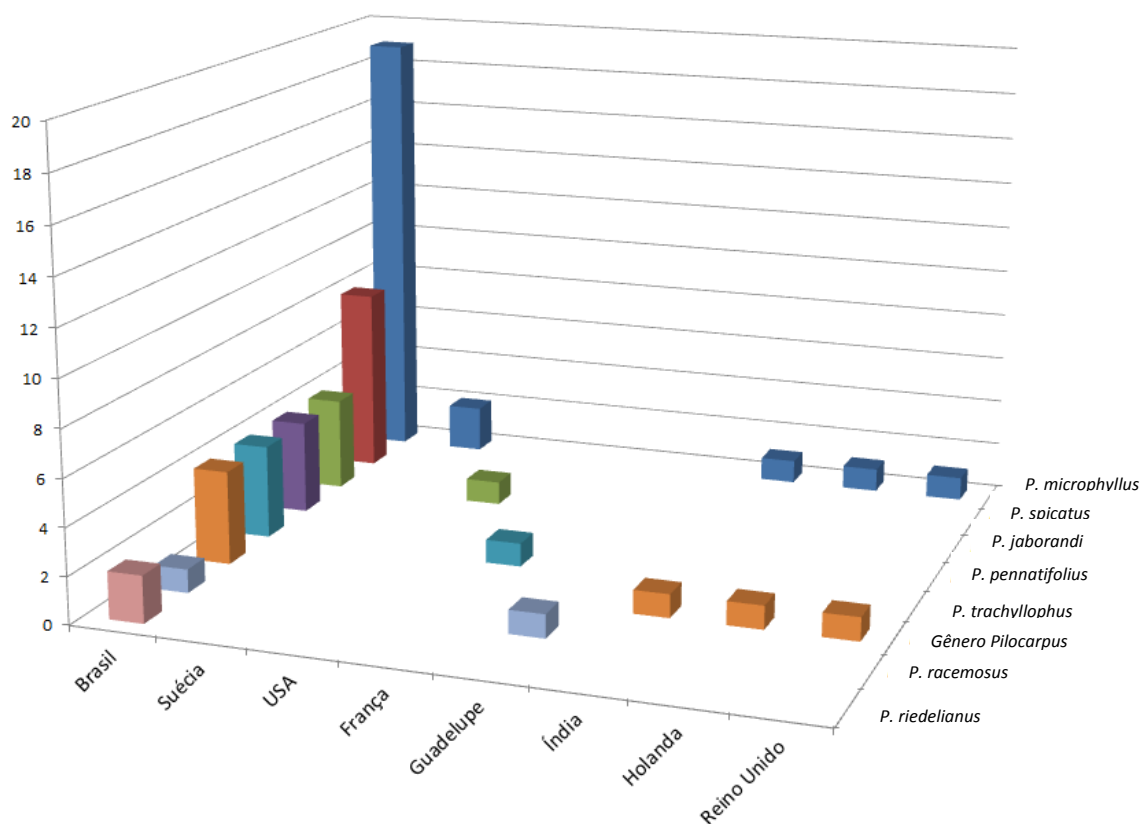
imidazólico pilocarpina em relação às outras espécies do gênero *Pilocarpus* de ocorrência nacional (PINHEIRO, 2002).

FIGURA 3 – Número de publicações das principais espécies do gênero *Pilocarpus* do período de 1993 a 2012 na base de dados da *Web fo Science*.



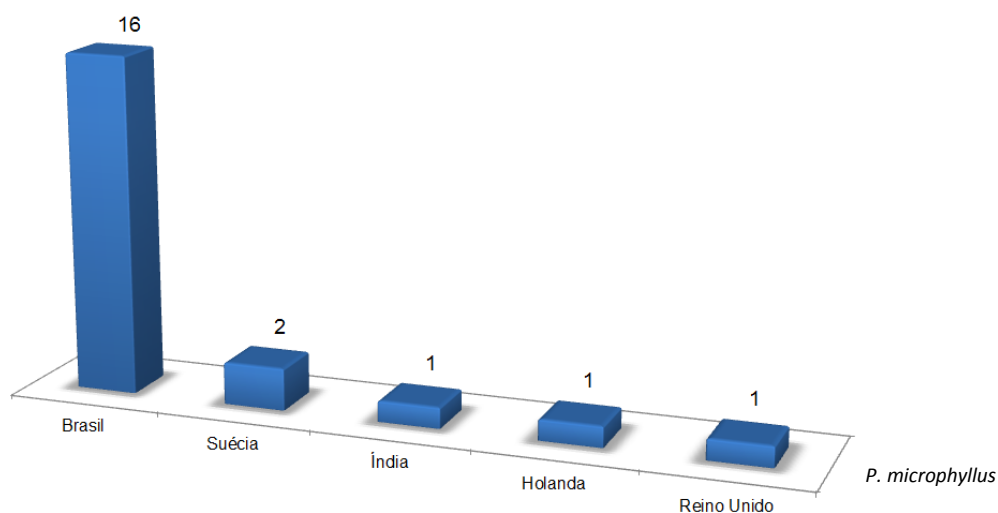
É de grande relevância destacar também que a espécie *P. microphyllus* foi selecionada dentre as outras para estudos de domesticação e implantação de extensas áreas de cultivo no estado do Maranhão e Piauí, sendo a mesma nativa e não endêmica no Norte e Nordeste do Brasil com registro de ocorrência no Pará, Piauí e Maranhão (PINHEIRO, 2002; LIMA, 2008; ROCHA, 2013). Isto justifica o maior número de publicações de *P. microphyllus* na base de dados *Web of science* em detrimento as outras espécies do mesmo gênero (FIGURA 4).

FIGURA 4 – As publicações das principais espécies da planta *Pilocarpus* no contexto mundial pesquisado na base de dados *Web of Science*.



O Brasil foi o país que mais desenvolveu pesquisas com as diversas espécies de *Pilocarpus*, por serem amplamente distribuídas em todo território nacional (SKORUPA, 2003; ROCHA, 2013). No entanto outros países como Suécia, Índia, Holanda e Reino Unido também realizaram publicações com a espécie *P. microphyllus* (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Participação dos países em artigos publicados na *Web of Science* (*P. microphyllus*) do período de 1993 a 2012.



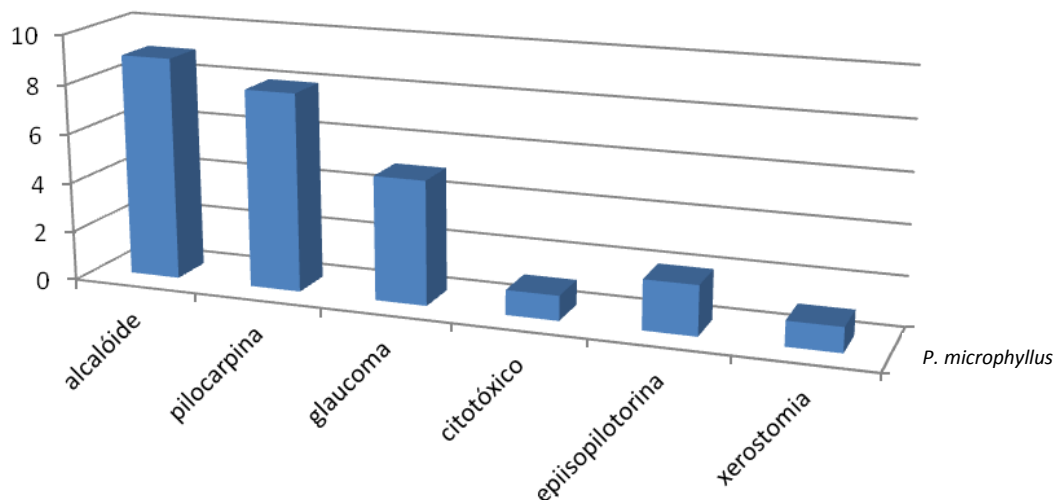
Ao verificar as principais áreas nas quais foram publicados os artigos na *Web of Science* com a espécie *P. microphyllus*, constata-se que a área de Fitotecnia surge em primeiro lugar com 39,38% das publicações, seguido da área Química e Farmacologia com 26,78% e 25,00%, respectivamente (TABELA 2). É possível observar que a maioria dos trabalhos publicados se concentram nas áreas de botânica/agronomia e química destacando principalmente classificações e ocorrência das espécies bem como a identificação e isolamento de constituintes químicos, dentre outros. Com relação a área de aplicação biológica/ farmacologia o destaque dos trabalhos está com alcaloide imidazólico de interesse industrial pilocarpina, onde os outros alcaloides permanecem em sua grande maioria inexplorados quanto a aplicação terapêutica.

TABELA 2 – Número de publicações e patentes com gênero e espécie da planta estudada.

Áreas de Interesse	Registros	%
Fitotecnia	22	39,38
Química	15	26,78
Farmacologia	14	25,00
Bioquímica e Biologia Molecular	10	17,85
Agricultura	4	7,14
Tecnologia de Alimentos	4	7,14
Ciência Ambiental	3	5,35
Medicina Int. Complementar	3	5,35
Outras	8	14,28

A espécie *P. microphyllus* contém outros alcaloides imidazólicos descritos na literatura com possível potencial farmacológico, biotecnológico e/ou como protótipos na obtenção de novas moléculas, tais como a macaubina, isopilocarpina, epiisopilosina, epiisopiloturina, isopilosina, pilosina e seus isômeros em concentrações variáveis (LUCIO et al., 2000; LORENZI et al., 2002; SANTOS e MORENO, 2004; BENTO et al., 2010; SAWAYA et al., 2011; VERAS et al., 2012), dentre os mesmos apenas a epiisopiloturina e epiisopilosina (ROCHA, 2013) apresentam publicações relacionadas a aplicação biológica. A maioria das publicações e patentes se concentram em torno da pilocarpina, suas aplicações no tratamento do glaucoma e xerostomia e a química dos alcaloides (FIGURA 6). A pesquisa e desenvolvimento de novas aplicações para a *P. microphyllus* irão agregar maior valor a espécie e consequentemente beneficiará inúmeras comunidades extrativistas de baixo poder econômico e Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) no Norte e Nordeste do Brasil.

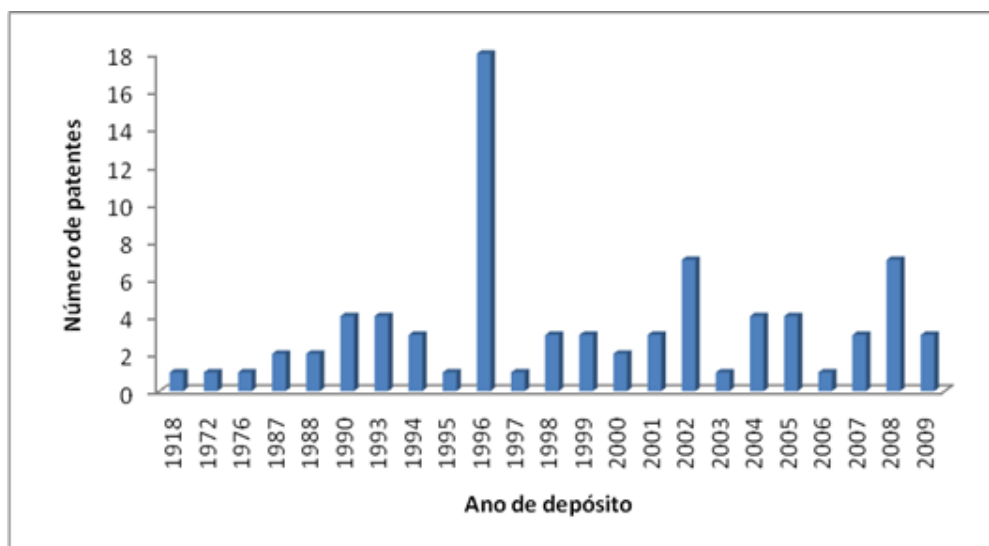
FIGURA 6 – Aspectos tecnológicos mais pesquisados pelos autores com *Pilocarpus microphyllus*.



Por outro lado, o aumento da produção científica de pesquisadores brasileiros ainda não é suficiente para desencadear impactos importantes para o desenvolvimento econômico no país. O número de patentes depositadas por brasileiros está longe dos números de artigos publicados.

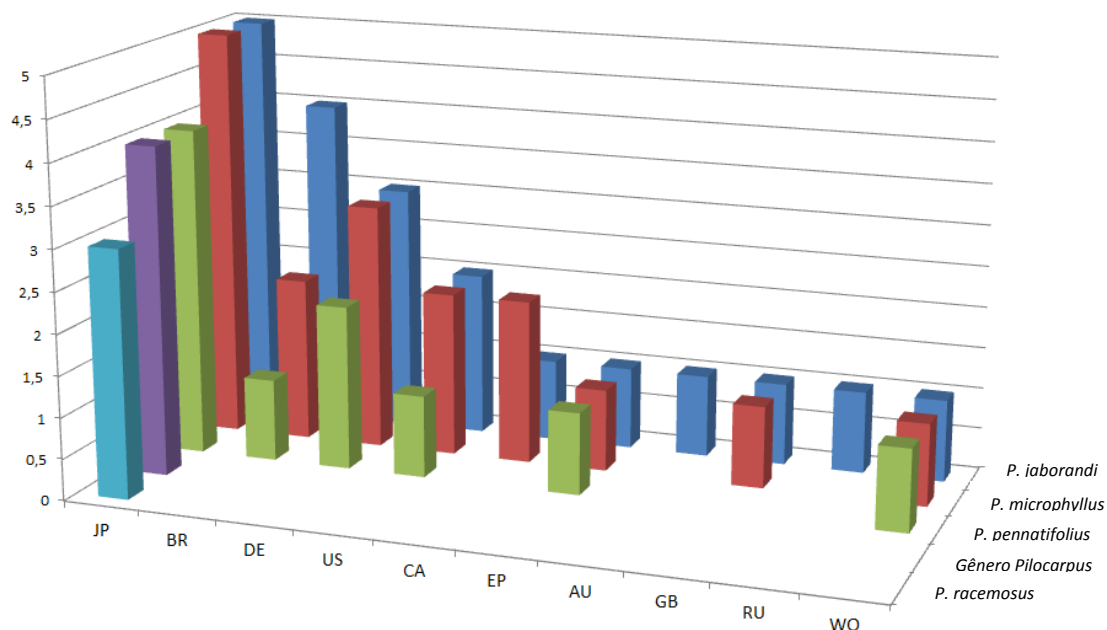
A proteção de pesquisas envolvendo *Pilocarpus* iniciou em 1918 com a publicação de uma patente e em 1972 com uma patente e quatro anos depois um depósito de uma patente em 1976 ambos do Canadá. Depois de 1987, constatou-se um aumento nos anos seguintes, com uma evolução do número de patentes. O auge foi o depósito de um número expressivo de 18 patentes em 1996 (FIGURA 7 e 8).

FIGURA 7 – Número de patentes depositadas por ano para o gênero *Pilocarpus*.



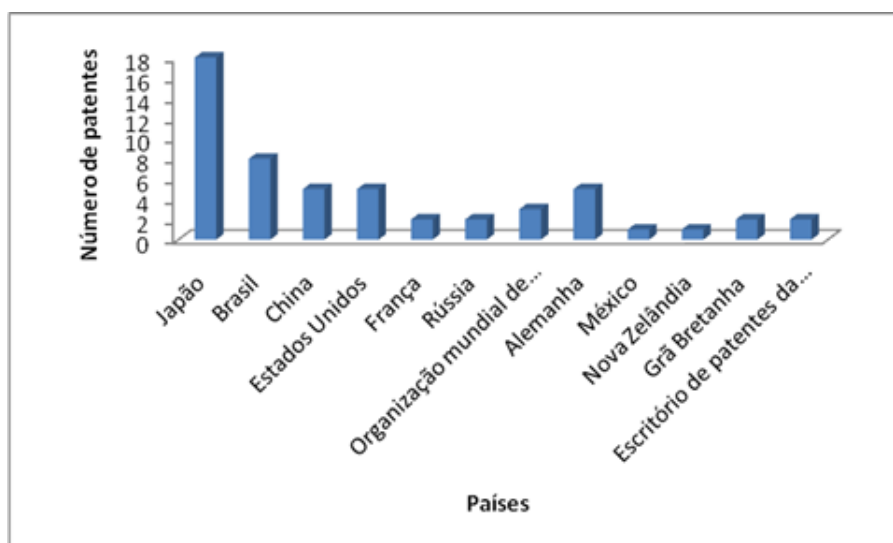
O Brasil ocupa o topo do *ranking* em número de publicações de artigos em periódicos envolvendo *Pilocarpus*, com um total de 56 artigos científicos, seguido da Suécia que conta com apenas dois artigos publicados (FIGURA 4). Este resultado é contrastante com o número de patentes depositadas por país, considerando que o Japão se destaca na proteção da pesquisa envolvendo *Pilocarpus*, com um número expressivo de patentes de cinco espécies, em detrimento de apenas três espécies de *Pilocarpus* depositadas no Brasil (FIGURA 8). Supõe-se, por estes resultados, que o Japão detêm certo pioneirismo, em relação a países emergentes como o Brasil, no que concerne à proteção de sua pesquisa.

FIGURA 8 – Países que mais depositaram patentes envolvendo *Pilocarpus*.



O Brasil possui baixa competitividade e pouco esforço tem sido empregado em inovar na área de produtos tecnológicos, possivelmente deve-se à imaturidade do sistema de inovação (articulação eficiente entre governo, empresas e universidades, capaz de promover um sistema de P & D), o Brasil não possui uma produção expressiva nas espécies de *Pilocarpus* refletindo ainda mais à falta de cultura de proteger as tecnologias desenvolvidas por meio da propriedade industrial (FIGURA 8 e 9).

FIGURA 9 – Países que mais patentearam envolvendo *Pilocarpus microphyllus*.



As FIGURAS 10 e 11 apresentam os códigos da classificação internacional de patentes da base *Derwent Innovation Index* e do INPI, EPO e USPTO, respectivamente, limitando-se nos primeiros 4 dígitos. Para se ter uma visão geral das diferentes áreas de pesquisa e aplicação, o código A61K é o que mostrou uma maior ocorrência e refere-se a especificamente a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas. Nesta mesma classe o código A61P direciona-se a atividades terapêuticas de compostos químicos ou de preparação medicinais.

FIGURA 10 – Patentes por código de classificação internacional de acordo com o potencial tecnológico.

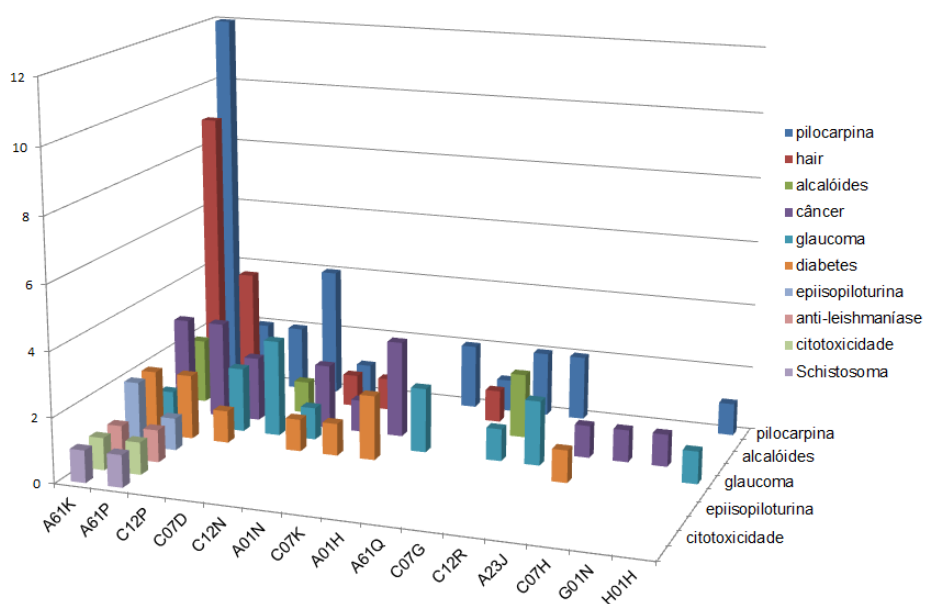
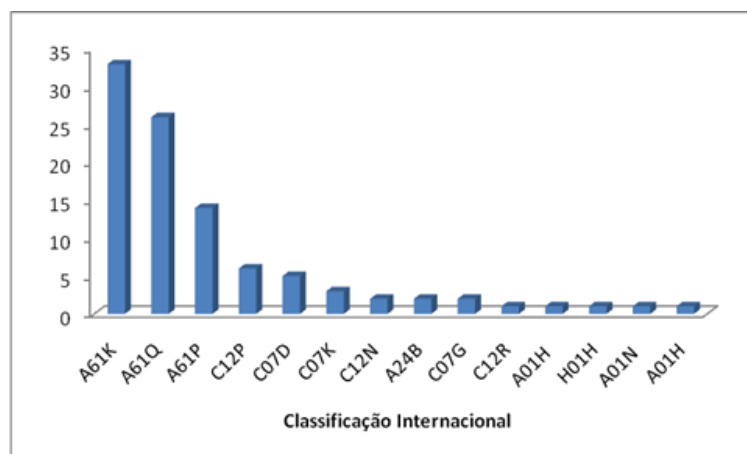


FIGURA 11 – Patentes por código de classificação internacional de acordo com o potencial tecnológico.



4.4. Conclusão

O estudo de prospecção tecnológica com o gênero *Pilocarpus* com ênfase na espécie *Pilocarpus microphyllus* por meio dos artigos publicados e das patentes concedidas tanto no Brasil como em outros países destacou a relevante importância mundial desta espécie como fonte do alcaloide pilocarpina utilizado há décadas no tratamento do glaucoma e xerostomia, no entanto as perspectivas futuras com a espécie residem no fato da descoberta de novas aplicações farmacológicas e biotecnológicas dos outros alcaloides que até o presente momento permanecem em sua grande maioria desconhecidas e inexploradas. O incentivo por parte do Governo Federal em apoiar pesquisas relacionadas a espécies nativas brasileiras, principalmente as de ocorrência em áreas de menor renda *per capita* e IDH como no Norte e Nordeste do Brasil seriam de extrema importância para agregar valor a espécie e estimular o desenvolvimento econômico destas regiões.

Este estudo nos revela também que as universidades brasileiras têm potencial de geração de novas tecnologias passíveis de patenteamento e desenvolvimento de produtos, os resultados apontaram 56 artigos indexados em relação aos outros países que apresentaram menores números de publicações. Esses valores em números no Brasil são bastante relevantes em relação às publicações, porém indicam um gargalo nos registros das patentes.

4.5. Agradecimentos:

CNPq, CAPES, FUNCAP

Capítulo III

Patente

Processo de Extração, Purificação e Isolamento do
Alcaloide Epiisopiloturina

5. Capítulo III – Patente

Este capítulo transcreve na íntegra a patente intitulada: processo de extração, purificação e isolamento do alcaloide episopiloturina, submetida e aprovada no Núcleo de Inovação Tecnológica (NINTEC/ UFPI) sob o número **00121** e depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) sob o número **BR 102012 0183013** em julho de 2012 (APÊNDICES 1 e 2).

A presente patente tem co-titularidade entre a Universidade Federal do Piauí (UFPI) e a indústria farmoquímica Anidro do Brasil Extrações S.A. A empresa está situada na cidade de Parnaíba, estado do Piauí, sendo responsável pela produção e exportação dos sais de pilocarpina para todo o mundo a partir da extração, purificação e isolamento dos alcaloides utilizando como matéria-prima a espécie *Pilocarpus microphyllus* de origem nativa e cultivada.

Processo de Extração, Purificação e Isolamento do Alcaloide Epiisopiloturina

5.1. Inventores

5.1.1. Nome completo: Leiz Maria Costa Vêras

Qualificação: Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

CPF: 841.003.203-10

Endereço residencial: Rua Dr. Vieira da Cunha, 587, Parnaíba–PI.

CEP: 64.218-700

Telefone residencial: (86) 9925-0530

Telefone comercial: (86) 3323 5125

E-mail: leiz.veras@gmail.com

Instituição/empresa: Universidade Federal do Piauí (UFPI) - Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC).

5.1.2. Nome completo: Yuri Dias Macedo Campelo

Qualificação: Aluno de Iniciação Científica, PIBITI/CNPq.

CPF: 02758549301

Endereço residencial: Conjunto Tancredo Neves, Quadra:02; Bloco:18, APT. 101. Teresina-PI

CEP: 64076-085

Telefone residencial: [\(86\) 3235-4122](tel:(86)3235-4122)

Telefone comercial: (86) 9462-7380

E-mail: yd.dias@hotmail.com

Instituição/empresa: Universidade Federal do Piauí-UFPI/ Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-BIOTEC.

5.1.3. Nome completo: Maria Adelaide Guimarães

Qualificação: Estudante de Biomedicina - Bolsista PIBITI/CNPq

CPF: 02489817302

Endereço residencial: Rua Desembargador Freitas Nº 1198, Bairro Nova Parnaíba. Parnaíba–PI.

CEP: 64218-490

Telefone residencial: [\(86\) 3322-8843](tel:(86)3322-8843)

Telefone comercial:

E-mail: ade_guimaraes@yahoo.com.br

Instituição/empresa: Universidade Federal do Piauí-UFPI/ Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-BIOTEC.

5.1.4. Nome completo: Marianne Moraes Vieira

Qualificação: Aluno de Iniciação Científica, PIBITI/CNPq.

CPF: 000.947.103-09

Endereço residencial: Rua Odilo Falcão, 860, APT. 302 - Bairro: São Cristovão - Teresina-PI

CEP: 64056-070

Telefone residencial: (86) 3232 7825 / (86) 9903 3747

Telefone comercial:

E-mail: mariannemorais@yahoo.com.br

Instituição/empresa: Universidade Federal do Piauí-UFPI/ Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-BIOTEC.

5.1.5. Nome completo: David Fernandes Lima

Qualificação: Farmacêutico – Mestre em Farmacologia

CPF: 75591979300

Endereço residencial: Rua Canadá, Quadra 06 Casa 06. Parnaíba-PI.

CEP: 64200-000

Telefone residencial: (86) 99469209 (86) 98013693

Telefone comercial: (86) 33236202/ 33236205

E-mail: david@vegeflora.com.br

Instituição/empresa: Anidro do Brasil Extrações S.A.

5.1.6. Nome completo: Paulo Robério Pinho

Qualificação: Químico Industrial

CPF: 242 097 753 - 04

Endereço residencial: Travessa Santa Helena, 90. Parnaíba-PI.

CEP: 64.215-140

Telefone residencial: 86 3321 1400

Telefone comercial: 86 3323 6202

E-mail: roberio@vegeflora.com.br

Instituição/empresa: Anidro do Brasil Extrações S.A.

5.1.7. Nome completo: Luciene Costa Vasconcelos

Qualificação: Farmacêutica, com especialização em Saúde pública e MBA em Gestão de Negócios.

CPF: 806693366-53

Endereço residencial: Rua Telius Ferraz nº 250, Parnaíba-PI.

CEP: 64202470

Telefone residencial: 86 33224697

Telefone comercial: 86 33236202

E-mail: Luciene@vegeflora.com.br

Instituição/empresa: Anidro do Brasil Extrações S.A.

5.1.8. Nome completo: José Roberto de Souza de Almeida Leite

Qualificação: Professor Pesquisador Doutor

CPF: 02758549301

Endereço residencial: Loteamento Nova Aldeota 2819 – Bairro Reis Velloso – Parnaíba – Piauí.

CEP: 64000-000

Telefone residencial: [\(86\) 88549286](tel:(86)88549286)

Telefone comercial: (86) 3323-5846

E-mail: jrsaleite@gmail.com e jrleite@pq.cnpq.br

Instituição/empresa: Universidade Federal do Piauí-UFPI/ Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia / BIOTEC.

Processo de Extração, Purificação e Isolamento do Alcaloide Epiisopiloturina.

5.2. Campo da Invenção

A presente invenção encontra-se no campo da biotecnologia e refere-se à extração industrial, purificação e isolamento do alcaloide epiisopiloturina na sua forma base e posterior processo de nitração, obtendo-se assim um farmoquímico natural de origem vegetal para aplicações em medicina e fins biotecnológicos.

5.3. Fundamentos da Invenção

Alcaloides são substâncias de caráter básico, derivadas principalmente de plantas, mas que também podem ser encontradas em fungos, bactérias e até mesmo em animais, as quais contêm, em sua fórmula, basicamente: nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono, e que podem influenciar o metabolismo destes organismos produtores. Possuem importância política, econômica e social, além da biológica (SIMÕES et al., 2002).

A palavra alcaloide deriva do árabe *al-quali* que corresponde ao nome vulgar do vegetal onde a soda foi inicialmente extraída (de *alcali*, básico, com o sufixo *-oide*, "-semelhante a"). Este grupo de compostos apresenta difícil definição, devido à grande diversidade de estruturas químicas, propriedades físico-químicas e ações farmacológicas (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2002). Podem existir no estado livre nas plantas, bem como na forma de sais ou óxidos. Eles também correspondem aos principais agentes terapêuticos naturais com ação; anestésica, analgésica, psico-estimulantes e neurodepressores, entre outras atividades farmacológicas (SIMÕES et al., 2002). Existe um consenso entre diversos autores e pesquisadores da área de química, de que alcaloides verdadeiros são compostos que possuem um ou mais nitrogênio(s) pertencente(s) a um anel heterocíclico com propriedades básicas, apresentando intensa atividade biológica quando interagem com organismos vivos (COSTA, 1994; ROBBERS, et al., 1997; SIMÕES et al., 2002; LIMA, 2008). Esta definição exclui os demais compostos nitrogenados como os obtidos por síntese orgânica, aminoácidos, aminas simples, vitaminas, peptídeos, ácidos nucleicos, porfirinas, nucleotídeos e compostos nitro e nitroso (ROBBERS, et al., 1997).

Nos últimos cento e cinquenta anos isolaram-se milhares de alcaloides (COSTA, 1994) e atualmente, devido aos avanços das técnicas de avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas, foi possível descobrir novas aplicações de alcaloides

centenários, como é o caso da pilocarpina, isolado em 1875 e utilizado há décadas para o tratamento do glaucoma, sendo hoje utilizado também em casos de xerostomia (LIMA, 2008).

A partir de espécies de jaborandi (*Pilocarpus* sp) já foram identificadas as estruturas dos seguintes alcaloides: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nor-7(11)-dehidro-pilocarpina, *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina, *N,N*-dimetil-triptamina, plastidesmina, (1*H*)-4-metoxi-2-quinolone e dictamina (SANTOS e MORENO, 2004).

Industrialmente a espécie de maior interesse é a denominada vulgarmente de jaborandi do Maranhão, *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi, devido ao maior teor de pilocarpina, sendo esta espécie selecionada para estudos relacionados à domesticação.

Quimicamente, segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), a pilocarpina é o composto (3*S*,4*R*)-3-etil-4- [(3-metillimidazol-4-il) metil]oxolan-2-ona, uma lactona do ácido pilocárpico que tem como núcleo fundamental um anel imidazólico. Trata-se de um líquido oleoso e xaroposo, embora seus sais se cristalizem facilmente (ROBBERS, et al., 1997) e, além disso, é um composto estável, com duração de ação de cerca de um dia. Vários alcaloides já foram identificados a partir do gênero *Pilocarpus*, porém a maioria está, ainda, em fase de testes e/ou ainda não possui aplicação farmacológica conhecida (SANTOS e MORENO, 2004).

Na domesticação e cultivo em escala comercial de *P. microphyllus*, chamou a atenção o elevado teor do alcaloide epiisopiloturina (FIGURA 12), estando este quase nas mesmas proporções do alcaloide de interesse pilocarpina, despertando assim a atenção para o aproveitamento desta molécula, onde até o momento é um subproduto (resíduo) do processamento industrial das folhas de jaborandi para extração e purificação da pilocarpina (MIURA, 2009).

Diante das exigências ambientais e da incessante busca do homem em descobrir novas moléculas farmacologicamente ativas, o aproveitamento de resíduos industriais, aliado à pesquisa científica são de salutar importância para o crescimento, desenvolvimento e descoberta de novos fármacos nas indústrias farmacêuticas e farmoquímicas. Durante o processamento industrial das folhas de *P. microphyllus* para extração e purificação do alcaloide imidazólico pilocarpina, são produzidos resíduos sólidos e líquidos. Um dos principais resíduos sólidos é uma mistura de carvão ativo, areia diatomácea, substâncias graxas, pigmentos e epiisopiloturina (50 a 70%).

Diante do exposto, podemos também inferir que a importância do processo pode ser avaliada na obtenção de fitofármacos como a epiisopiloturina de forma a levar baixo impacto ambiental, já que a matéria-prima é de fonte renovável e sustentável. Para a obtenção deste alcaloide não é necessário o uso maciço de produtos derivados do petróleo, como é o caso de processos de obtenção de produtos estritamente sintéticos.

A partir da busca de anterioridade nos bancos de patentes nacionais (INPI) e internacionais (Espacenet e USPTO) foi encontrada apenas uma patente contendo a palavra-chave epiisopiloturina (do português) e/ou epiisopiloturine/epiisopiloturin (do inglês). A patente identificada foi de número PI0904110-9 A2 e diz respeito à utilidade do alcaloide para doenças infectocontagiosas como esquistossomose e leishmaniose (INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial. PI0904110-9 A2. Processo de obtenção de epiisopiloturina e sua aplicação no combate às infecções parasitárias. Revista da Propriedade Industrial. n. 2108, seção I. 2011). Embora, durante a busca datada de 20 de dezembro de 2011, não foi identificado nenhum pedido de patente relacionado a processo de obtenção do referido alcaloide, de origem natural ou mesmo sintético.

5.4. Sumário da Invenção

A presente invenção trata de um processo de extração, purificação e isolamento do alcaloide epiisopiloturina a partir das folhas da espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi (JABORANDI). Mais particularmente, a invenção refere-se à extração e pré-purificação industrial deste alcaloide seguida de isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa além da nitração do mesmo. A extração foi baseada na alcalinização das folhas e extraída com solventes, como o tolueno e cloreto de metileno, para o isolamento foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A nitração foi realizada com a adição de etanol absoluto e ácido nítrico, a fim de torná-lo mais solúvel evitando assim a utilização de solventes tóxicos para a utilização em tecidos/sistemas animais e vegetais.

5.5. Descrição detalhada da Invenção

5.5.1. Extração e obtenção industrial do resíduo de epiisopiloturina.

As folhas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) de origem sustentável destinadas

à extração e purificação industrial de pilocarpina são alcalinizadas com uma solução de carbonato de potássio e são extraídas (extração sólido-líquido) com solventes, tolueno e cloreto de metileno (fase orgânica). A fase orgânica é submetida a uma extração líquido-líquido com uma solução aquosa de ácido sulfúrico, onde o alcaloide epiisopiloturina encontra-se dissolvido na forma de sulfato. A solução ácida de sulfato de epiisopiloturina (teor médio: 2%) obtida é resfriada e alcalinizada com solução amoniacal e imediatamente tratada com carvão ativo e areia diatomácea. Após o tratamento a solução é filtrada e obtêm-se a epiisopiloturina livre na fase sólida retida no filtro misturada ao carvão, areia diatomácea e outras impurezas do processo industrial. O filtrado resultante da fase anterior segue o processo industrial para obtenção da pilocarpina e o resíduo sólido gerado na filtração segue para pré-purificação industrial e posterior isolamento da epiisopiloturina a nível laboratorial.

5.5.2. Pré-purificação Industrial

O resíduo industrial (teores: 50-70% de epiisopiloturina; 5-10% de pilocarpina) foi dissolvido com uma solução aquosa de ácido clorídrico e filtrado sob vácuo em filtro industrial do tipo lentilha, como meio filtrante o tecido bramante e papel de filtro, para eliminação do carvão e areia diatomácea. O filtrado contendo o cloridrato de epiisopiloturina foi alcalinizado com hidróxido de amônio PA, nesta fase ocorreu a precipitação do alcaloide livre onde o mesmo é novamente filtrado sob vácuo. O objetivo principal desta etapa é a eliminação de impurezas como carvão e areia diatomácea a fim de ser submetido à purificação em cromatografia líquida de alta eficiência preparativa.

5.5.3. Isolamento por meio de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa

O resíduo anteriormente obtido (cerca de 510 mg/50 mL) na concentração de 10 mg/mL foi dissolvido com a fase móvel (fosfato de potássio 5%), filtrado com membranas de 0,45 µm e submetido a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa – HPLC (Shimadzu Prominence, AUTOSAMPLE SIL-10AF, CTO-20A, DGU-20A₅, LC-6AD, CBM-20A, SPD-20A). As condições cromatográficas estabelecidas foram: coluna LiChrospher 60 RP Select B (250 x 25 mm, 5 µm) fase reversa revestida com grupamento octil; fase móvel: fosfato de potássio a 5% com pH ajustado para 2,5; fluxo = 10 mL/min; estufa = 50°C; detector = 216 nm (ultravioleta). O volume de injeção foi de 1000 µL, as frações foram coletadas e obteve-se um volume de 500 mL na concentração teórica de 100

mg/L. A solução obtida foi alcalinizada pH 9 a 9,5 e submetida a extração líquido-líquido com clorofórmio PA (fase orgânica) afim de eliminarmos o fosfato de potássio da fase móvel e obter o alcaloide epiisopiloturina livre. A fase orgânica foi então concentrada em banho-maria a temperatura de 50°C e resultando em 38 mg de epiisopiloturina livre.

5.5.4. Nitração da epiisopiloturina livre

50 mg de epiisopiloturina base foi dissolvido sob agitação com 10 mL de etanol absoluto P.A., foi adicionado ácido nítrico P.A até atingir pH=4. A mistura (epiisopiloturina base/etanol absoluto/ácido nítrico) foi evaporada até 2 mL e em seguida resfriada na temperatura entre 0–5°C por 1 (uma) hora. Após este período a mistura foi centrifugada (3500 rpm) por 5 minutos e obteve-se o nitrato de epiisopiloturina insolúvel e precipitado no meio. Para confirmação da nitração foi comparado o perfil cromatográfico da epiisopiloturina base com o nitrato de epiisopiloturina e para confirmação da estrutura química foi realizada a espectroscopia de massa.

5.5.5. Identificação, quantificação e confirmação de estrutura química molecular.

A epiisopiloturina livre obtida foi identificada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando padrão de referência para comparação dos respectivos tempos de retenção (FIGURA 13). A quantificação do produto foi de 38 mg obtido por cromatografia líquida de alta eficiência pelo método de área 100%, sendo considerados satisfatórios teores $\geq 90\%$. A identificação foi feita por espectrometria de massas (AMAZON SL, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), onde foi utilizado “*electrospray*” e “*ion trap*” como forma de ionização, fragmentação e detecção (FIGURAS 14 e 15).

6. Breve Descrição das Figuras

A **FIGURA 12** Apresenta a fórmula estrutural, fórmula molecular e massa molar da epiisopiloturina

A **FIGURA 13** demonstra a identificação da epiisopiloturina por cromatografia líquida de alta eficiência contra padrão de referência de epiisopiloturina 1,94 mg/mL e pilocarpina 5,0 mg% nas condições cromatográficas estabelecidas no método.

A **FIGURA 14** apresenta a estrutura do alcaloide, epiisopiloturina base, íntegra (A) e fragmentada MS^2 (B), MS^3 (C), analisado por espectrometria de massas, demonstrando que o isolamento foi realizado com sucesso.

A **FIGURA 15** apresenta a estrutura do alcaloide, epiisopiloturina nitrada, íntegra (A) e fragmentada MS^2 (B), analisado por espectrometria de massas, demonstrando que a modificação foi realizada com sucesso.

7. REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA **caracterizado pela** epiisopiloturina a ser obtida preferencialmente a partir da espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi (JABORANDI) através de processo de extração industrial do alcaloide baseado na extração sequencial em meio alcalino e ácido e posterior precipitação e filtração do resíduo final, seguida por métodos de cromatografia, preferencialmente, líquida.

2. PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** resíduo para purificação ser obtido, preferencialmente, por um processo de pré-purificação laboratorial baseado na acidificação e filtração com posterior alcalinização, filtração e dissolução em etanol seguido de nitração do produto obtido.

3. PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizado pelo** resíduo purificado obtido, preferencialmente, por processo laboratorial tornando-o em forma de sal orgânico, preferencialmente, por nitração ou halogenação.

4. PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado pelo** produto purificado ser obtido, preferencialmente, por técnicas de purificação e isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa e posterior identificação, quantificação e confirmação de estrutura química molecular.

5. PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado pelo** produto purificado ser sob forma de sal orgânico, farmacêuticamente aceitável.

6. PROCESSO DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ALCALOIDE EPIISOPILOTURINA de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 e 4, **caracterizado pelo** produto purificado adicionado a um veículo compatível a fim de atingir um produto farmacêuticamente aceitável.

8. RESUMO

Processo de Extração, Purificação e Isolamento do Alcaloide Epiisopiloturina

A presente invenção trata de um processo de extração, purificação e isolamento do alcaloide epiisopiloturina a partir das folhas da espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi (JABORANDI). Mais particularmente, a invenção refere-se à extração industrial deste alcaloide seguida de pré-purificação a nível laboratorial, purificação e isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa.

9. FIGURAS

FIGURA 12 – Apresenta a fórmula estrutural, fórmula molecular e massa molar da epiisopiloturina

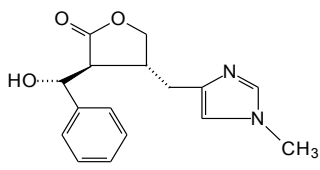
FÓRMULA ESTRUTURAL	 <p>The chemical structure of epiisopiloturina is shown. It consists of a five-membered furanose ring with a carbonyl group (=O) at the 2-position. At the 3-position, there is a hydroxyl group (-OH) attached with a wedge bond. At the 4-position, there is a methylimidazole ring attached with a dashed bond. The methylimidazole ring has a methyl group (-CH₃) attached to the nitrogen atom.</p>
FÓRMULA MOLECULAR	$C_{16}H_{18}N_2O_3$
MASSA MOLAR	286,33 g/mol

FIGURA 13 – Demonstra a identificação da epiisopiloturina por cromatografia líquida de alta eficiência contra padrão de referência de epiisopiloturina 1,94 mg/mL e pilocarpina 5,0 mg% nas condições cromatográficas estabelecidas no método.

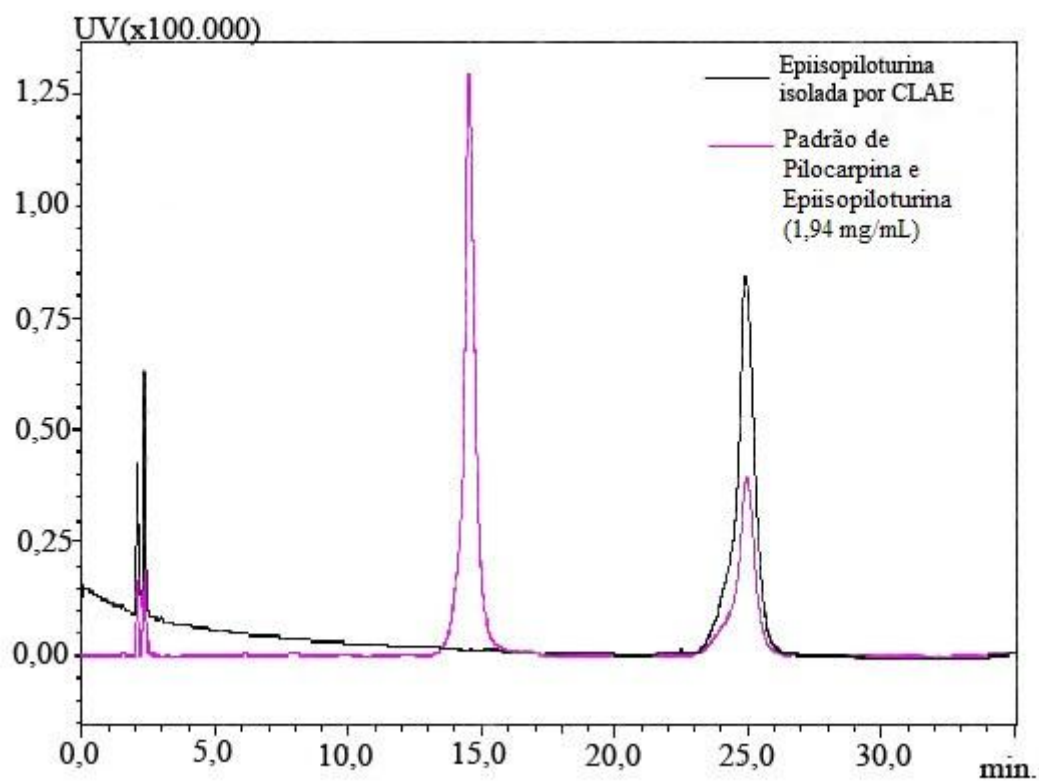


FIGURA 14 – Apresenta a estrutura do alcaloide, episopiloturina base, íntegra (A) e fragmentada MS² (B), MS³ (C), analisado por espectrometria de massas, demonstrando que o isolamento foi realizado com sucesso.

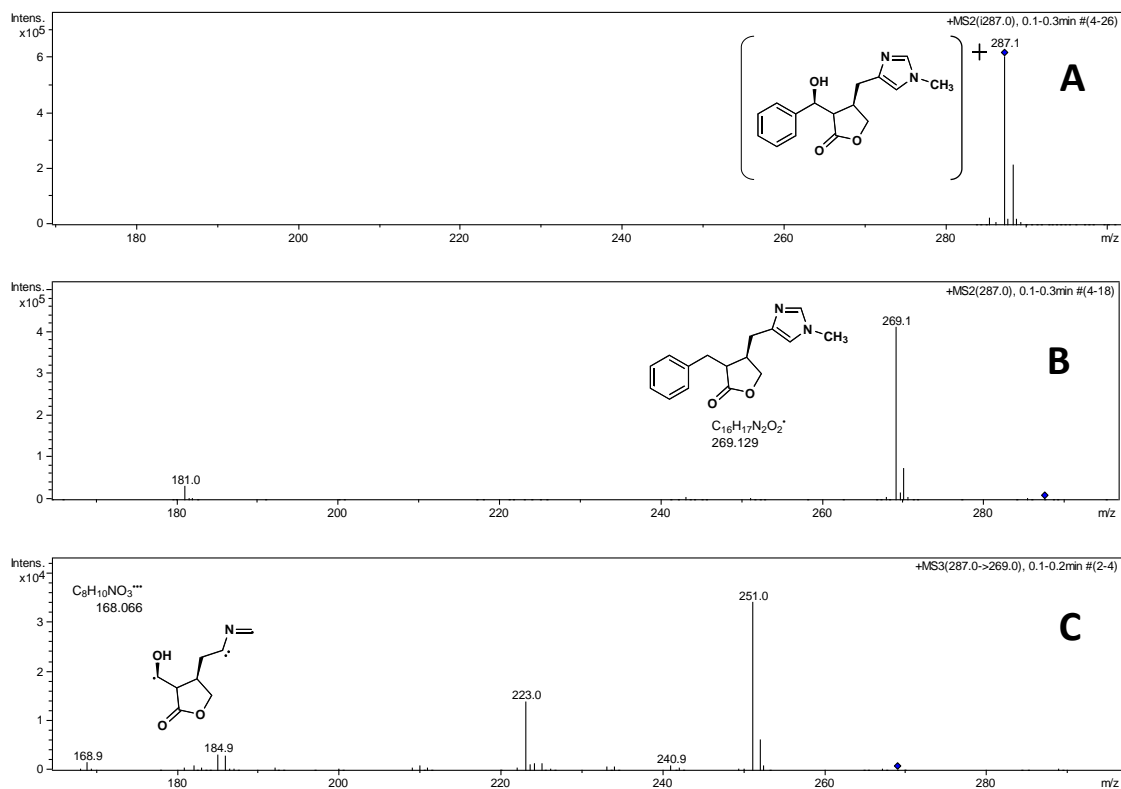
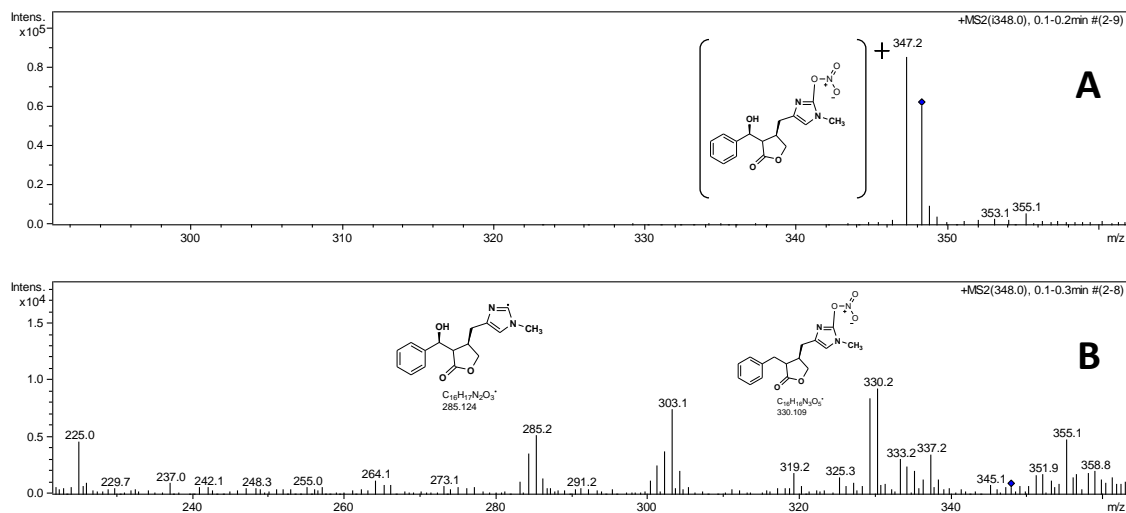


FIGURA 15 – Apresenta a estrutura do alcaloide, episopiloturina nitrada, íntegra (A) e fragmentada MS² (B), analisado por espectrometria de massas, demonstrando que a modificação foi realizada com sucesso.



Capítulo IV

Artigo submetido ao Periódico PloS One

Alterações Sazonais dos Principais Alcaloides do
Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex
Wardleworth), uma Espécie Economicamente
Importante da Flora Brasileira

6. Capítulo IV – Artigo submetido ao periódico PloS One.

Este capítulo apresenta o artigo submetido ao periódico PloS One, Qualis CAPES A1, intitulado: Alterações Sazonais dos Principais Alcaloides do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), uma Espécie Economicamente Importante da Flora Brasileira. Submissão em: 09/05/2016, (APÊNDICE 3).

Alterações Sazonais dos Principais Alcaloides do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), uma Espécie Economicamente Importante da Flora Brasileira.

Título curto: Alterações Sazonais dos Principais Alcaloides de *Pilocarpus microphyllus*

David Fernandes Lima^{1,2,3¶}, Luiza Ianny de Lima^{1¶}, Jefferson Almeida Rocha^{4¶}, Ivanilza Moreira de Andrade^{1¶}, Liliana Gonçalves Grazina^{1,5¶}, Caterina Villa^{1,5¶}, Liliana Meira^{1,5¶}, Leiz Maria Costa Vêras^{1&}, Iábita Fabiana Sousa Azevedo^{6&}, Adriele Giaretta Biase^{6&}, Joana Costa^{5&}, Maria Beatriz P.P. Oliveira^{5&}, Isabel Mafra^{5&}, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{1*}

¹ Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, *Campus* Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Paulo Afonso, Bahia, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

⁴ Grupo de Pesquisa em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, Grajaú, Maranhão, Brasil

⁵ Requite-Laqv, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁶ Departamento de Estatística e Experimentação Agronômica, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

* Autor para correspondências

E-mail: jrsaleite@gmail.com (JRSAL)

¶ Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho.

& Estes autores também contribuíram igualmente para este trabalho.

Resumo

Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardleworth (jaborandi, Rutaceae) é uma das mais importantes espécies medicinais brasileiras devido a presença da pilocarpina (PIL), um alcaloide usado no tratamento do glaucoma e xerostomia. Além da PIL, esta espécie contém outro alcaloide, epiisopiloturina (EPI), que tem demonstrado efetividade contra a esquistossomose. O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças sazonais de PIL e EPI em três populações cultivadas de *P. microphyllus* do nordeste do Brasil durante um ano, incluindo as estações seca e chuvosa. O perfil de alcaloides foi correlacionado com os padrões fenotípicos e genéticos nas caracterizações morfológicas e moleculares. PIL foi o principal alcaloide e o seu teor diferiu entre as populações em todos os meses, exceto setembro. A população AM01 (linha verde) mostrou um teor especialmente elevado de PIL comparada com as populações AM02 e AM03 (linha tradicional), que tiveram teores similares de alcaloides. O teor de PIL diminuiu gradualmente nas três populações na estação chuvosa. O teor de EPI foi significativamente distinto entre a linha verde (AM01) e a linha tradicional (AM02 e AM03). AM01 apresentou significativo baixo teor de EPI em todos os meses, demonstrando que esta não é a melhor fonte para extração de EPI. Os marcadores Sequências Intercaladas a Repetições Simples “*Inter Simple Sequence Repeat*” (ISSR) e análises morfológicas claramente separaram AM01 de AM02 e AM03, em concordância com os resultados da química dos alcaloides. Este estudo mostra a primeira correlação entre os marcadores químicos, morfológicos e moleculares de *P. microphyllus* e destaca os benefícios potenciais de uma abordagem de pesquisa multidisciplinar destinada a apoiar a indústria e a conservação dos recursos naturais.

6.1. Introdução

Jaborandi é o nome vernacular de várias espécies de plantas medicinais nativas do Brasil e países vizinhos pertencentes as famílias Piperaceae e Rutaceae (CORRÊA, 1969). O gênero *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) é representado no Brasil por 15 espécies onde 12 são endêmicas, ocorrendo principalmente na parte oriental do país, que é o centro da diversidade genética do gênero (SKORUPA, 2003; STEVENS, 2016; FLORA DO BRASIL, 2016).

De acordo com a literatura (SANTOS e MORENO, 2004; ABREU et al., 2007) as espécies de *Pilocarpus* contém muitos metabólitos secundários, especialmente os alcaloides. Muitos alcaloides tem sido identificados, denominados pilocarpina, pilosina, anidropilosina, 3-nor-8(11) dihidropilocarpina, pilosinina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nor-7(11)-dehidropilocarpina, *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina, *N,N*-dimetil-triptamina, plastidesmina, (1*H*)-4-metoxi-2-quinolona e dictamina .

A espécie de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth é nativa do norte e nordeste do Brasil, ocorrendo naturalmente na porção leste do Pará, noroeste e norte dos estados do Maranhão e Piauí. Dentro do gênero esta espécie apresenta os maiores teores de pilocarpina (PIL) nas suas folhas, podendo variar de 0,5% a 1% (PINHEIRO, 1997). É uma das espécies medicinais brasileiras mais importantes devido a PIL ser utilizada no tratamento do glaucoma e xerostomia (AGBAN et al., 2016; GIL-MONTOYA, 2016). O Brasil é, até o presente momento, o único fornecedor deste ingrediente para as indústrias farmacêuticas internacionais, exportando toneladas de cloridrato de PIL e nitrato de PIL todos os anos (BRANDÃO et. al., 2008).

A espécie foi domesticada e é cultivada nos estados do Maranhão e Piauí, mas ainda é colhida a partir de populações nativas em algumas localidades. Entretanto, desde 2008, *P. microphyllus* foi inserida na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2008; ROCHA et. al., 2014). A propagação de cultivares para pesquisa e aplicação industrial são fundamentais para conservação biológica, como também na redução da pressão sobre as populações nativas. Inúmeras comunidades de baixa renda dependem do extrativismo de *P. microphyllus* durante estações do ano específicas e empresas utilizam esta espécie para extração industrial de PIL, conseqüentemente informações sobre a sazonalidade dos teores de alcaloides irá beneficiar ambos os grupos.

Durante muitos anos, a atividade biológica da maioria dos alcaloides encontrados em *P. microphyllus* permaneceu em grande parte desconhecida com exceção da PIL. Entretanto, outro alcaloide, epiisopiloturina (EPI), tem atraído o interesse da comunidade científica. EPI foi identificada pela primeira vez em 1978 (VOIGTLANDER et. al., 1978) e hoje é considerada uma alcaloide promissor no combate a esquistossomiose (VÉRAS et. al., 2012). As atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de EPI foram determinadas (SILVA et. al., 2013) os parâmetros químicos foram desenvolvidos para o isolamento em escala industrial e sua caracterização espectroscópica (VÉRAS et. al., 2013). Nosso grupo está conduzindo outros estudos, como a aplicação nanofarmacêutica da EPI em sistemas lipossomiais (GUIMARÃES et al., 2014) e caracterização térmica e pré-formulações de protótipos de EPI com excipientes farmacêuticos (MELO et. al., 2014). EPI é obtida da biomassa de rejeitos industriais da produção industrial de PIL (VÉRAS et. al., 2013), consequentemente sua aplicação farmacêutica resultará em benefícios ambientais e aumentará a importância econômica da espécie.

O objetivo principal deste trabalho consiste em identificar, quantificar e avaliar as mudanças sazonais de dois principais alcaloides imidazólicos, PIL e EPI, em três populações (AM01; AM02; AM03) de *P. microphyllus* cultivado no estado do Piauí, Brasil, ao longo do período de um ano, abrangendo as estações seca e chuvosa. Caracterizações morfológicas e moleculares foram realizadas nas mesmas populações e correlacionadas aos perfis de alcaloides para investigar a diversidade genética de coleções cultivadas de *P. microphyllus* no Piauí.

6.2 Material e Método

6.2.1 Material vegetal

Amostras de *P. microphyllus* cultivado (FIGURA 16A) foram obtidas de coleções mantidas na fazenda da Anidro do Brasil Extrações S.A. (3°6'S, 41°47'W), que são plantações situadas no município de Parnaíba, estado do Piauí, Brasil. Amostras prova foram coletadas e identificadas pela Dra. Ivanilza Moreira de Andrade (Departamento de Biologia, Universidade Federal do Piauí) e depositadas no herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) na Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brazil, sob os números 2866 (AM01), 2869

(AM02) e 2874 (AM03). Os nomes dos táxons botânicos e seus autores seguiram a Lista da Flora do Brasil de 2020 (FLORA DO BRASIL, 2016), a descrição e as ilustrações foram feitas a partir de amostras coletadas durante o estudo.

FIGURA 16 – *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth (jaborandi). (A) *P. microphyllus* com destaque para os folíolos terminais (B) *P. microphyllus* colhida por comunidades extrativistas utilizando tesoura de poda.



Fonte: Arquivos Anidro do Brasil Extrações S.A.

6.2.2 Amostragem e coleta de *Pilocarpus microphyllus*

Quinze plantas adultas entre 0,5 e 2,0 m de altura foram selecionadas e identificadas de acordo com coloração da folha e a morfologia geral. As plantas foram categorizadas em três grupos, cada um com cinco exemplares morfologicamente semelhantes: AM01 (plantas 1-5), AM02 (6-10) e AM03 (11-15). AM01 representou a "jaborandi linha verde" uma forma de *P. microphyllus* informalmente reconhecida como distinta dentro da indústria extrativa do jaborandi. Os outros dois grupos (AM02 e AM03) foram designadas de "jaborandi linha tradicional." As amostras para análise química foram colhidas entre os dias 25 e 30 de cada mês durante um ano. Os ramos jovens foram colhidas com tesouras de poda (FIGURA 16B). O material foi seco ao sol, até o teor de água medido por pelo analisador de umidade OHAUS® MB45 fosse inferior a 15%.

6.2.3 Extração de alcaloides nas folhas de *P. microphyllus*

Folhas secas e em pó de *P. microphyllus* (5 g) foram extraídas com clorofórmio e com uma solução alcalina de hidróxido de amônio a 10% (m/V) em pH 12. Esta mistura foi agitada durante 30 minutos (Agitador Orbital, Nova ética® modelo 109), filtrou-se com algodão e foi realizada a partição com uma solução de ácido sulfúrico a 5%. A solução ácida foi separada e as folhas foram extraídas e particionadas novamente. As soluções ácidas ricas em alcaloides foram homogeneizadas e analisadas por CLAE.

6.2.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A solução ácida rica em alcaloides foi diluída (1:10) com a fase móvel (fosfato de potássio, KH_2PO_4 5% (m/V) , pH 2,5), filtrada com uma membrana de poro de 0,45 μm e analisada por CLAE (Sistema LaChron Elite®, L-2000; Merck-Hitachi, Tóquio, Japão). A coluna foi RP 60 Merck / LiChrospher®, select B, 5 μm , 250 x 25 mm, com fluxo de 1 mL / min e volume de injeção de 20 μL . O forno foi regulado para 50 ° C e detector UV a 216 nm. Padrões externos foram utilizados para identificar e quantificar os alcaloides (VÉRAS et. al., 2013). Todos os solventes utilizados na análise de CLAE foram da Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha).

6.2.5 Alcaloides padrões

PIL foi isolada, purificada e fornecida pela empresa Anidro do Brasil Extrações S.A., fornecedor internacional deste produto químico. EPI foi isolada e purificada pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), utilizando métodos descritos em nossos estudos anteriores (VÉRAS, et. al., 2012, 2013). PIL e EPI foram dissolvidos em ácido fórmico-acetonitrila a 1% (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e analisadas por *LC-MS* (Sistema AmaZon SL, Bruker Daltonics; Bremen, Alemanha) para confirmar a estrutura e a pureza antes da utilização como padrões. As condições utilizadas para a detecção por espectrometria de massas foram como se segue: electrospray no modo positivo e o fluxo do gás de nebulização em 2,5 L/min., tensão de interface a 4,5 kV, temperatura do bloco de aquecimento a 230 ° C, hélio como gás de dissociação de colisão induzida a 17 kPa . Todos os solventes utilizados na análise por *LC-MS* foram solventes de grau CLAE da Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha).

6.2.6 Condições ambientais

Todas as plantas amostradas foram cultivadas na mesma localidade, sob as mesmas condições agronômicas de irrigação e clima (temperatura, umidade e pluviosidade). A precipitação foi medida diariamente em mm com um pluviômetro calibrado. A temperatura (°C) e umidade (%) foram registradas com um termohigrômetro calibrado digital (Cole-Parmer[®], modelo EW-90080-03) durante as coletas. Os médias harmônicas foram calculadas para cada parâmetro, levando em consideração as estações seca e chuvosa.

6.2.7 Variáveis morfológicas quantitativas

Os 11 caracteres morfológicos seguintes foram medidos em cm nas 15 plantas: comprimento e largura das folhas compostas imparipenadas, comprimento do pecíolo, número de folíolos por folha, comprimento e largura da lâmina do folíolo terminal, comprimento e largura do folíolo terminal do peciólulo, comprimento e largura de um dos pares mais distais dos folíolos laterais e número de veias secundárias nos folíolos (MITTEROECKER & BOOKSTEIN, 2011).

6.2.8 Marcadores moleculares

A extração do DNA e as análises de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) foram realizadas nas mesmas 15 amostras individuais das medidas morfológicas. O DNA foi extraído a partir do material folha seca em sílica, seguindo o protocolo (DOYLE & DOYLE, 1987) modificado para microtubos, utilizando-se areia autoclavada e tampão modificado a 2% (m/V) de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) para romper as membranas celulares (BRODY & KERN, 2004). Compostos secundários foram isolados com uma mistura de 24: 1 de clorofórmio e álcool isoamílico e precipitação com isopropanol. O precipitado foi lavado três vezes com etanol a 70%. O precipitado foi dissolvido em 100 µL do tampão tris-ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). A qualidade do DNA foi verificada através de eletroforese

em gel utilizando agarose a 1% (m/V) com solução tampão TBE (Tris-borato EDTA) e brometo de etídio a 100 V durante 30 min.

Onze iniciadores ISSR polimórficos foram utilizados em estudos anteriores (ROCHA et al., 2014) (TABELA 3). As amostras foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando uma versão modificada do protocolo (SAMARAKOON et. al., 2013). Os extratos de DNA foram diluídos 10 vezes para otimizar a amplificação. As condições da PCR foram realizadas com um volume final de 10 μ L, contendo 1,0 μ L de extrato de DNA, 7,5 pmol de cada iniciador (Tabela 4) e 5 μ L de TopTaq Master Mix TM (Qiagen Biotechnology). O programa do termociclador Esco[®] SwiftTM MaxPro incluiu uma desnaturação inicial (pré-fundida) a 94 ° C durante 90 s, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 40 s, anelamento a 47 ° C durante 45s e a extensão 72 ° C durante 90 s, com um ciclo final adicional de 94 ° C durante 45 s, 44°C durante 45 s e 72 ° C durante 10 min. (WOLFE et. al., 1998).

TABELA 3 – Iniciadores utilizados para a geração de marcadores polimórficos ISSR em genótipos de *Pilocarpus microphyllus*, evidenciando os respectivos níveis de loci polimórficos.

Iniciadores [repetições]^a	Loci polimórfico
844 [(CT)₈ RC]	14
CHRIS [(CA)₇ YG]	13
DAT [(GA)₇ RG]	9
ISSR-4 [(AC)₈ YT]	9
ISSR-6 [(AG)₈ YT]	8
843 [(CT)₈ RA]	9
JOHN [(AG)₇ YC]	5
MANNY [(CAC)₄ RC]	10
MAO [(CTC)₄ RC]	12
OMAR [(GAG)₄ RC]	14
TERRY [(GTG)₄ RC]	8

^a Bases degeneradas usadas: Y (C ou T), R (A ou G).

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com tampão SB (hidróxido de sódio a 10 mM, pH 8,5 com ácido bórico) durante 2 h a 100 V (BRODY & KERN, 2004), corado com brometo de etídio (1,0 mg/L, durante 30 min) e descorados em água destilada durante 5 minutos. O gel de agarose foi visualizado sob luz ultravioleta e uma imagem digital foi obtida utilizando um sistema de documentação fotográfica (L-PIX, Loccus Biotecnologia). Para cada corrida do gel, um controle negativo (água) foi utilizado para detectar quaisquer problemas de contaminação. Cinco a dez por cento das quantificações foram repetidas aleatoriamente em todos os casos para garantir a reprodutibilidade das bandas observadas. Os géis foram analisados utilizando GelCompar II[®] versão 5.0 (*Applied Maths NV*, Saint-Martens-Latem, Bélgica) para alinhar as bandas de acordo com o marcador e para identificar os fragmentos de 200-1500 (pares de bases). Os resultados foram utilizados para construir uma matriz binária genética em que cada célula foi atribuída com a presença (1) ou ausência (0) de um dado fragmento (banda). Esta matriz foi usada para posterior análise.

6.2.9 Análise de dados

A. Análises químicas

Todos os dados de teor de alcaloides foram expressos em porcentagem (% , m/m) como valores da média \pm desvio padrão. Os resultados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade usando os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Quando os pressupostos não foram atendidos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. O teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças estatísticas dentro e entre as amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote ExpDes.pt no software R versão 3.2.3 e com SAS 9.3 software (SAS, 2016). Os gráficos foram construídos utilizando R (R CORE TEAM, 2016) e OriginPro 8.5 (ORIGINPRO, 2010).

B. Análises Morfológicas

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA), utilizando distância Euclidiana entre os indivíduos computados a partir da matriz de 11 variáveis morfológicas quantitativas foi utilizada para explorar as relações de similaridade entre os indivíduos. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para visualizar as principais tendências de variação morfológica no conjunto de dados. O teste "vara quebrada" (*broken stick*) foi aplicado para determinar quais componentes principais foram significativos na análise.

A Análise Discriminante Linear (LDA) foi utilizada para analisar a mesma matriz morfológica quantitativa, mas com os quinze indivíduos classificados em dois grupos, um composto da população "verde" AM01 e a outra consiste de duas populações "tradicionais" AM02 e AM03. Para esta análise as colunas da matriz de dados (as variáveis) foram normalizadas para média zero e variância unitária. Todas as análises foram realizadas com a versão PAST 2.02 (HAMMER et. al., 2001).

C. Variabilidade genética e estrutura da população

A matriz ISSR binária de 15 linhas e 111 colunas foram analisadas utilizando GenAlEx 6.5 software (PEAKALL & SMOUSE, 2012; BLYTON & FLANAGAN, 2012) para estimar a variabilidade genética dentro e entre as três populações. Os valores para os seguintes parâmetros foram registrados: o número de loci (N), número de loci exclusivo (NE), proporção de locos polimórficos, heterozigosidade média esperada (He) e Índice de Shannon (I). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et. al., 1992), tal como implementada na GenAlEx 6.5 com base no cálculo do parâmetro PhiPT foi utilizada para verificar o grau de estrutura genética dentro e entre os grupos de três; 999 permutações foram usadas para os testes de significância.

D. Análises morfológicas e moleculares

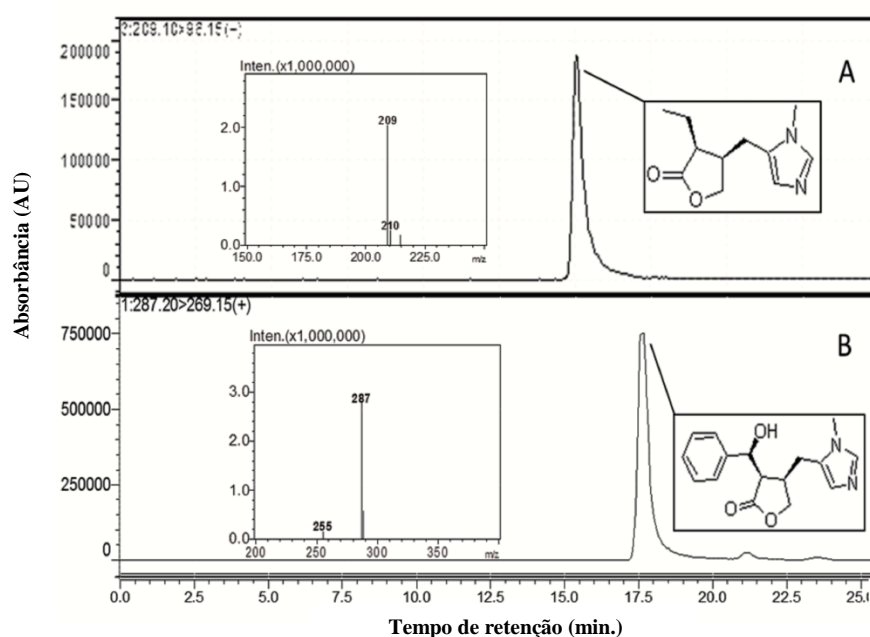
Uma matriz de pares de distâncias de Gower entre os 15 indivíduos calculados a partir da matriz combinada de 11 variáveis morfológicas quantitativas e 111 marcadores moleculares ISSR, foram analisadas com PCoA para investigar as relações de similaridade entre os indivíduos. O índice de Gower é uma medida de dissimilaridade que pode combinar variáveis binárias e quantitativas, tal como implementada na versão PAST 2.02 (HAMMER et. al., 2001).

6.3 Resultados

6.3.1 Alcaloides padrões

As estruturas de PIL (FIGURA 17A) e EPI (FIGURA 17B) foram confirmadas por LC-MS e comparadas com os dados da literatura: PIL ((3S, 4R) -3-etil-4 - [(1-metilimidazol-4-il) metil] oxolan-2-ona)) (ANDRADE-NETO, 1996; ABREU et. al., 2007; ABREU et. al., 2010) e EPI (2 (3H) -furanona, di-hidro-3- (hidroxifenilmetil) -4 - [(1-metil-1H-imidazol-4-il) metil] -, [3S- [3a (R *), 4b]]) (VÉRAS et.al., 2013).

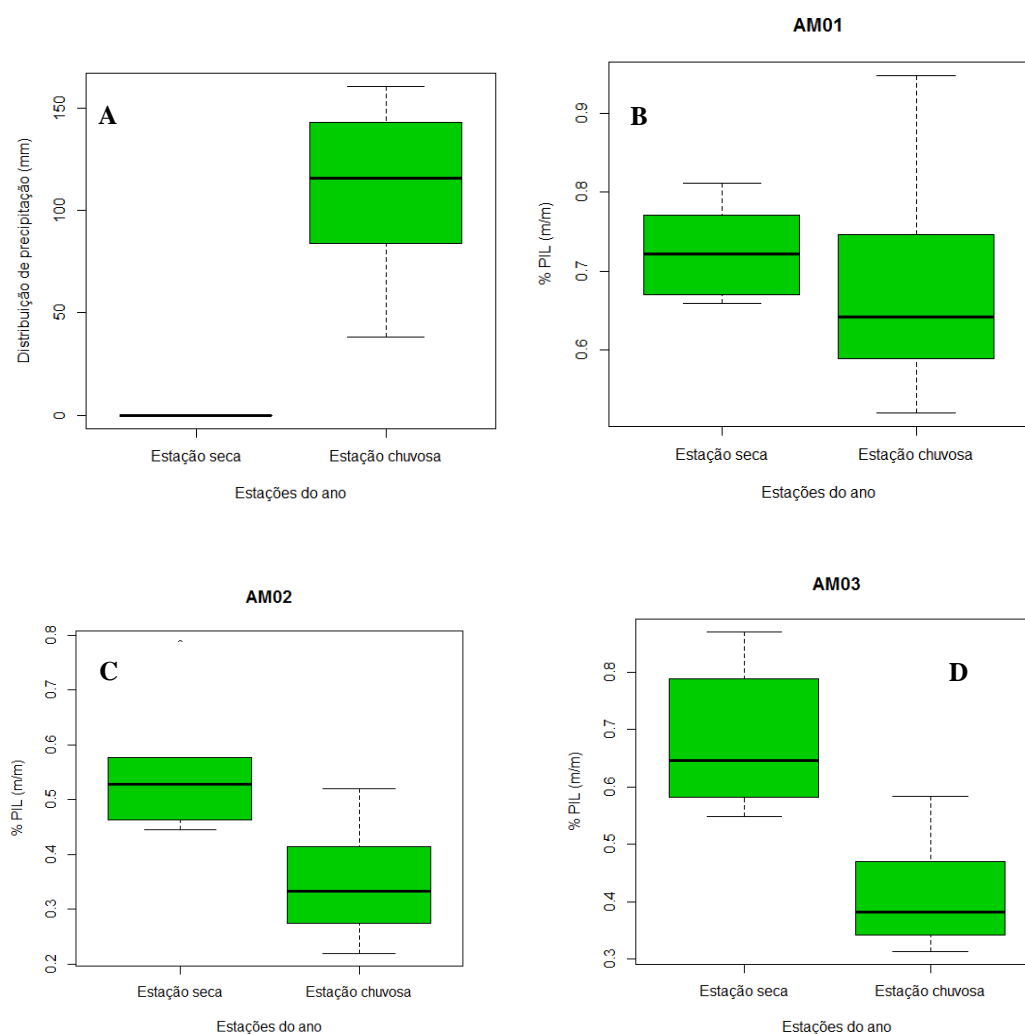
FIGURA 17 – Cromatogramas e espectro de massas dos alcaloides padrões de *Pilocarpus microphyllus* analisados por LC/MS. (A) Pilocarpina, mostrando o tempo de retenção de 15,05 minutos e peso molecular na espectrometria de massas, *electron spray ionization* (ESI) ($M+H^+$) de 209 Da. (B) Epiisopiloturina, mostrando o tempo de retenção de 17,05 minutos e peso molecular na espectrometria de massas, *electron spray ionization* (ESI) ($M+H^+$) de 287 Da.



6.3.2 Condições ambientais

Nenhuma precipitação foi registrada durante a estação seca, de agosto a dezembro (0 mm). Na estação chuvosa (janeiro a julho) foi registrada precipitação média de 109,69 mm (FIGURA 18A). Durante a coleta na estação seca a temperatura e umidade médias foram de $32,42 \pm 2,03$ °C e $54,08 \pm 9,66\%$, respectivamente. Na estação chuvosa a temperatura e umidade médias foram de $33,75 \pm 0,95$ °C e $58,97 \pm 5,47\%$, respectivamente (TABELA S1).

FIGURA 18 – Precipitação e teor de pilocarpina (%) nas estações seca e chuvosa. (A) Distribuição das chuvas (mm) durante as estações seca e chuvosa. [0,00 mm; 109,69 mm ($p = 0,0003$), respectivamente] na plantação de *P. microphyllus*, estado do Piauí, nordeste do Brasil. (B) Porcentagem de PIL % (m/m) nas estações seca e chuvosa [0,727; 0,683 ($p = 0,5637$), respectivamente] da AM01. (C) Porcentagem de PIL % (m/m) nas estações seca e chuvosa [0,560; 0,350 ($p = 0,0149$), respectivamente] da AM02. (D) Porcentagem de PIL % (m/m) nas estações seca e chuvosa [0,687; 0,415 ($p = 0,0030$), respectivamente] da AM03.



6.3.3 Sazonalidade de PIL

Os perfis cromatográficos mostraram que PIL é o principal alcaloide imidazólico nas amostras cultivadas (FIGURA 19). O teor de PIL exibiu interação significativa entre os grupos (AM01, AM02, AM03) e os meses. Este variou ao longo do ano e de acordo com os meses, exceto em setembro, quando o teor de PIL para as três populações foram os mesmos (FIGURA 20). O teor de PIL dos três grupos demonstrou normalidade ($p = 0,9278$) e a homogeneidade da variância ($p = 0,3128$) e foi analisado por parcelas divididas no tempo pelos meses. As diferenças entre os três grupos foram comparadas pelo teste de Tukey, tendo sido observado que o teor de PIL em todos os pares de grupos foi significativamente diferente em 5% ($p = 0,000$) (FIGURA 20).

FIGURA 19 – Perfis cromatográficos típicos obtidos por análise via CLAE das três populações cultivadas de *P. microphyllus*. (A) Grupo AM01 (jaborandi linha verde). (B) Grupo AM02 (jaborandi linha tradicional). (C) Grupo AM03 (jaborandi linha tradicional). Pico número 1: pilocarpina e pico número 2: epiisopiloturina.

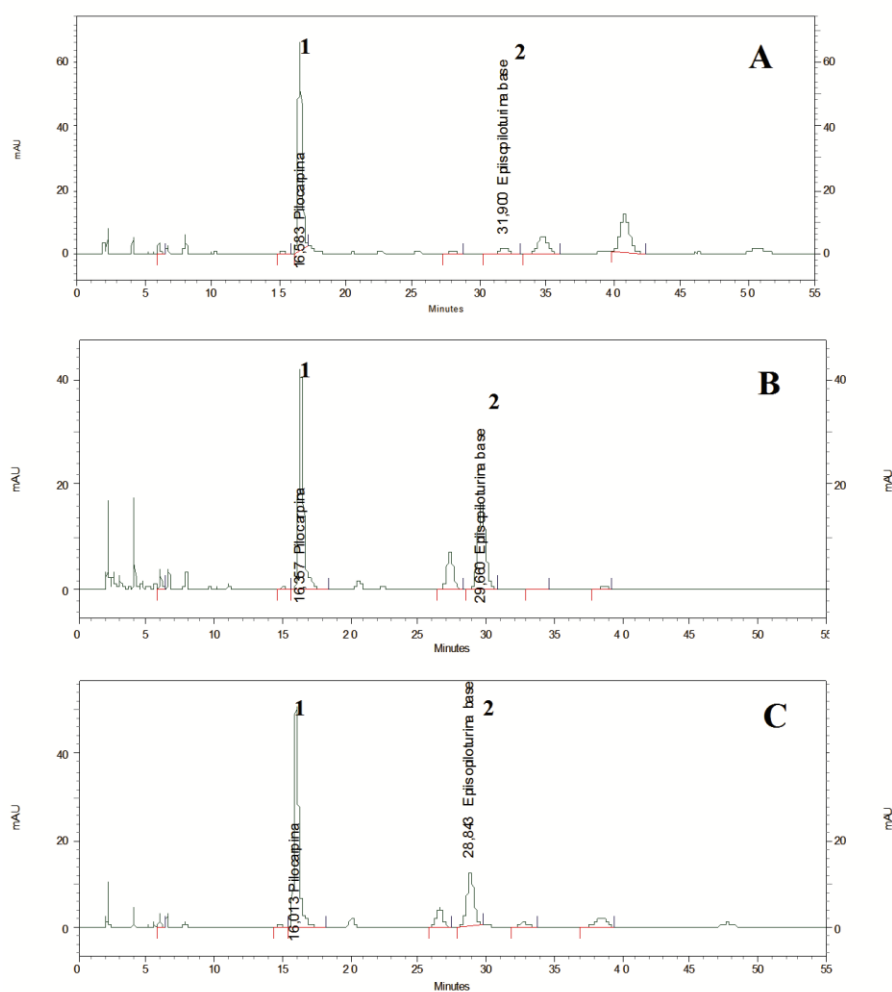
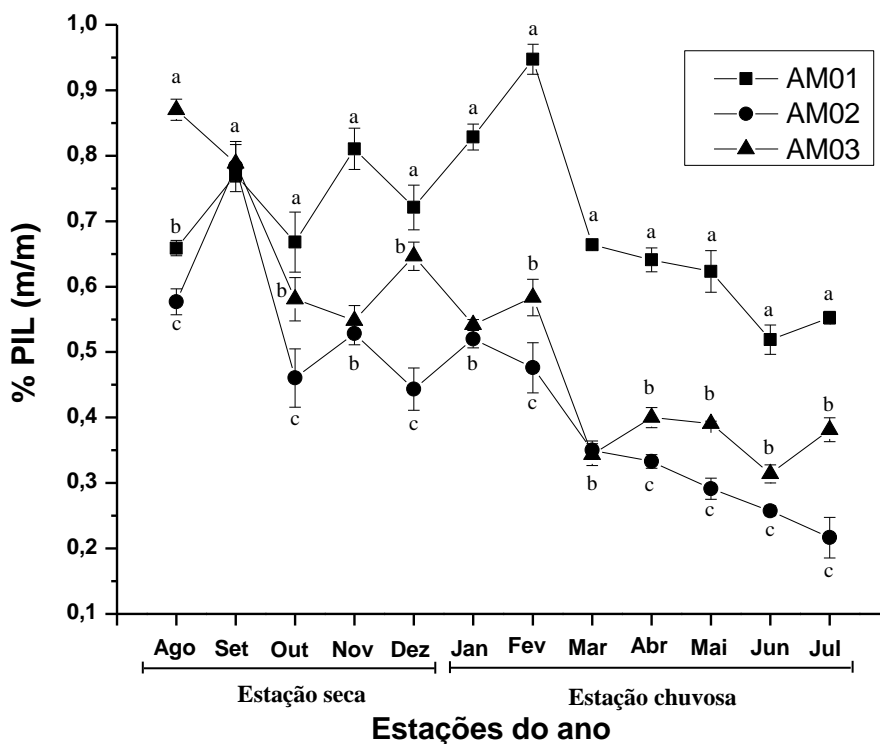


FIGURA 20 – Pilocarpina (% m/m) durante um ano obtido por análise via CLAE. Dados de cada ponto representam os valores médios \pm desvio padrão de uma amostra de folhas extraídas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre AM01, AM02 e AM03 pelo teste de Tukey ao nível de 5%



O teor de PIL da AM01 foi significativamente elevado diferindo de AM02 e AM03 utilizando comparações múltiplas de Tukey das médias (FIGURA 20). AM02 e AM03 também mostrou diferenças significativas no teor de PIL, apesar de terem perfis cromatográficos semelhantes (FIGURA 19). A amostra AM01 teve teor adequado para a extração industrial de PIL ($> 0,500\%$) durante todos os meses, com teores mais elevados em janeiro, fevereiro, setembro e novembro (TABELA 4). Os níveis de PIL permaneceram constantes durante março, abril e maio e diminuíram para os níveis mais baixos, próximos a $0,500\%$ m/m em junho e julho.

TABELA 4 – Teor de pilocarpina (% m/m) na AM01, AM02 e AM03 obtidos por CLAE durante um ano.

Meses	AM01	AM02	AM03
	Teor de PIL (% m/m) ¹		
Ago.	0,659 ^{d,e} ± 0,012	0,577 ^b ± 0,020	0,870 ^a ± 0,016
Set.	0,770 ^{b,c} ± 0,010	0,785 ^a ± 0,038	0,789 ^b ± 0,029
Out.	0,670 ^{d,e} ± 0,046	0,463 ^{c,d,2} ± 0,044	0,582 ^{c,d} ± 0,033
Nov.	0,811 ^b ± 0,032	0,529 ^{b,c} ± 0,017	0,548 ^d ± 0,023
Dez.	0,722 ^{c,d} ± 0,034	0,445 ^{d,2} ± 0,032	0,647 ^c ± 0,022
Jan.	0,828 ^b ± 0,020	0,520 ^{b,c} ± 0,013	0,542 ^d ± 0,008
Fev.	0,947 ^a ± 0,023	0,478 ^{c,d,2} ± 0,038	0,584 ^{c,d} ± 0,028
Mar.	0,663 ^{d,e} ± 0,006	0,350 ^{e,2} ± 0,014	0,344 ^{e,f,2} ± 0,010
Abr.	0,641 ^e ± 0,018	0,333 ^{e,2} ± 0,010	0,400 ^{e,2} ± 0,015
Maio	0,624 ^e ± 0,032	0,291 ^{e,f,2} ± 0,016	0,391 ^{e,2} ± 0,000
Jun.	0,519 ^f ± 0,022	0,257 ^{f,g,2} ± 0,007	0,314 ^{f,2} ± 0,014
Jul.	0,552 ^f ± 0,009	0,219 ^{g,2} ± 0,031	0,382 ^{e,2} ± 0,018

¹ Os dados representam os valores médios ± desvio padrão de uma amostra de extração das folhas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indica diferenças significativas entre os mesmos, (5% de probabilidade pelo teste de Tukey).

² Os valores em cinza escuro não atendem aos parâmetros para extração industrial (< 0,500% m/m).

AM02 mostrou teor significativamente alto de PIL somente em setembro e o teor diminuiu para níveis < 0,500% em outubro, dezembro e de fevereiro a julho (TABELA 4). AM03 apresentou teor significativamente alto de PIL em Agosto e Setembro. De outubro a fevereiro os teores de PIL foram adequados para a extração industrial, enquanto que de março a julho diminuiu (< 0,500%), como na AM02. O teste de Tukey não mostrou diferenças significativas no teor de PIL da amostra AM01 entre as estações seca e chuvosa ($p = 0,5637$) (FIGURA 18B). AM02 e AM03 mostraram diferenças significativas entre o teor de PIL por estação do ano, como mostrado na FIGURA 18C e 18D ($p = 0,0149$ e $p = 0,0030$, respectivamente). Os valores médios de PIL na AM02 e AM03 não foram adequados para a extração industrial durante grande parte da estação chuvosa (TABELA 4 e FIGURA 20).

6.3.4 Sazonalidade de EPI

Os dados de teor de EPI não cumpriram os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância, de modo que o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre as médias, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas, no nível de significância de 5%. Os teores de EPI diferiram significativamente ($p = 0,00037$) entre os três grupos (TABELA 5). O teste de comparação múltiplas de Dunn mostrou que AM01 foi diferente de AM02 ($p = 0,0000$) e AM03 ($p = 0,0017$). No entanto, não houve diferença significativa no conteúdo de EPI entre AM02 e AM03 ($p = 0,0943$).

TABELA 5 – Teor de epiisopiloturina (% m/m) na AM01, AM02 e AM03 obtidos por CLAE durante um ano.

	AM01	AM02	AM03
Meses	Teor de EPI (% m/m) ¹		
Ago.	0,056 ± 0,002	0,532 ± 0,011	0,216 ± 0,003
Set.	0,056 ± 0,008	0,244 ± 0,017	0,595 ± 0,027
Out.	0,019 ± 0,003	0,293 ± 0,021	0,155 ± 0,015
Nov.	0,040 ± 0,005	0,345 ± 0,009	0,249 ± 0,018
Dez.	0,038 ± 0,004	0,278 ± 0,008	0,140 ± 0,007
Jan.	0,031 ± 0,004	0,353 ± 0,008	0,230 ± 0,005
Fev.	0,037 ± 0,003	0,383 ± 0,028	0,228 ± 0,015
Mar.	0,028 ± 0,000	0,286 ± 0,060	0,229 ± 0,061
Abr.	0,045 ± 0,002	0,288 ± 0,007	0,156 ± 0,014
Mai	0,023 ± 0,002	0,331 ± 0,025	0,273 ± 0,001
Jun.	0,037 ± 0,003	0,316 ± 0,007	0,284 ± 0,016
Jul.	0,044 ± 0,007	0,302 ± 0,058	0,333 ± 0,045
TMT ²	0,038 ^{c,α} ± 0,011	0,330 ^{a,β} ± 0,072	0,258 ^{b,β} ± 0,116

¹ Os dados representam os valores médios ± desvio padrão de uma amostra de extração das folhas em triplicata. Os valores médios seguidos pela mesma letra não são diferentes estatisticamente ao nível de significância de 5% na estatística por Kruskal-Wallis ($p = 0,00037$). Para o teste de comparações múltiplas de Dunn as médias seguidas pela mesma letra grega são estatisticamente iguais ao nível de significância de 5%. AM01 difere significativamente de AM02 ($p = 0,0000$) e AM03 ($p = 0,0017$). Nenhuma diferença foi evidenciada entre AM02 e AM03 ($p = 0,0943$), com o teste de comparações múltiplas de Dunn.

² TMT: teor médio total

6.3.5 Análises moleculares

A. Diversidade e relações genéticas intrapopulacionais

Os 11 marcadores ISSR (TABELA 3) geraram 111 loci (N) das AM01, AM02 e AM03, com 8 a 12 obtidos por pares de iniciadores (média de 10,9 loci/ par de

iniciador). A porcentagem média de loci polimórficos (P) foi de 57,06% (TABELA 6). A população com a maior variabilidade genética foi a AM03 ($P = 67,56\%$, $He = 0,274$, $I = 0,400$), seguido por AM01 ($P = 53,15\%$, $He = 0,203$, $I = 0,302$). Todas as populações apresentaram pelo menos uma banda exclusiva (privado) (TABELA S2; FIGURA S1).

TABELA 6 – Dados da variação genética dos 15 indivíduos dos três grupos de *Pilocarpus microphyllus* (AM01, AM02, AM03) analisados via software GenAlEx 6.5.

População	%P ^a	N ^b	Na ^c	Ne ^d	I ^e	He ^f	uHe ^g
AM01	53,15	5	1,333	1,344	0,302	0,203	0,254
			±0,075	±0,034	±0,028	±0,019	±0,024
AM02	50,45	5	1,279	1,343	0,293	0,199	0,249
			±0,077	±0,036	±0,028	±0,020	±0,024
AM03	67,56	5	1,568	1,481	0,400	0,274	0,342
			±0,065	±0,036	±0,027	±0,019	±0,024

^a %P: porcentagem de loci polimórficos; ^b N: tamanho da amostra; ^c Na: número de alelos; ^d Ne: número de alelos efetivos; ^e I: índice de informações; ^f He: heterozigosidade esperada; ^guHe: heterozigosidade esperada imparcial

Dados representam os valores médios ± desvio padrão.

B. Diferenciação genética entre populações

A AMOVA mostrou que a maior parte da variação genética (91%) foi expressa dentro das populações, com apenas 9% entre elas. No entanto, o teste de permutação mostrou diferença significativa na variação entre populações (TABELA 7). Os valores de PhiPT de populações emparelhadas (hemimatriz inferior) mostrou diferenças significativas entre AM01 e AM02 mais AM03 (hemimatriz superior mostra os valores- p) (TABELA 8).

TABELA 7 – Análise de variância molecular (AMOVA) dos três grupos de *Pilocarpus microphyllus* cultivado, analisado pelo software GenAlEx 6.5.

Fonte	GL ^a	SS ^b	MQ ^c	VE ^d	PV ^e (%)
Entre Pops ^f	2	47,467	23,733	1,620	9
Dentro Pops ^f	12	187,600	15,633	15,633	91
Total	14	235,067		17,253	100

Estat ^g	Valor ⁱ	P ^j (rand >= data)
PhiPT^h	0,094	0,002

GL^a: graus de liberdade; SS^b: Soma dos quadrados; MQ^c: média dos quadrados; VE^d: variação estimada; PV^e (%): porcentagem de variação entre e dentro das populações; Pops^f: população; Estat^g: estatística utilizada para estimar a estrutura; PhiPT^h: análoga a estatística F, usado para dados genéticos dominantes para estimar o grupo entre e dentro da estrutura do grupo; Valorⁱ: valor de PhiPT; P^j(rand >= data): probabilidade de se obter um valor de PhiPT de 0,094 ou mais, se não se verificarem diferenças entre os três grupos.

TABELA 8 – Distâncias genéticas emparelhadas (valores de PhiPT) entre os três grupos (AM01, AM02, AM03) de *Pilocarpus microphyllus* cultivado, com base em dados de marcadores ISSR analisados via software GenAlEx 6.5.

Populações emparelhadas - Valores de PhiPT			
	AM01	AM02	AM03
AM01	0,000	0,008 ^a	0,007 ^a
AM02	0,126 ^b	0,000	0,093 ^a
AM03	0,111 ^b	0,045 ^b	0,000

^aHemimatriz superior: valor de *p* do teste de permutação (9,999 permutações). ^bHemimatriz inferior: valores de PhiPT.

6.3.6 Caracterização morfológica do jaborandi (*P. microphyllus*)

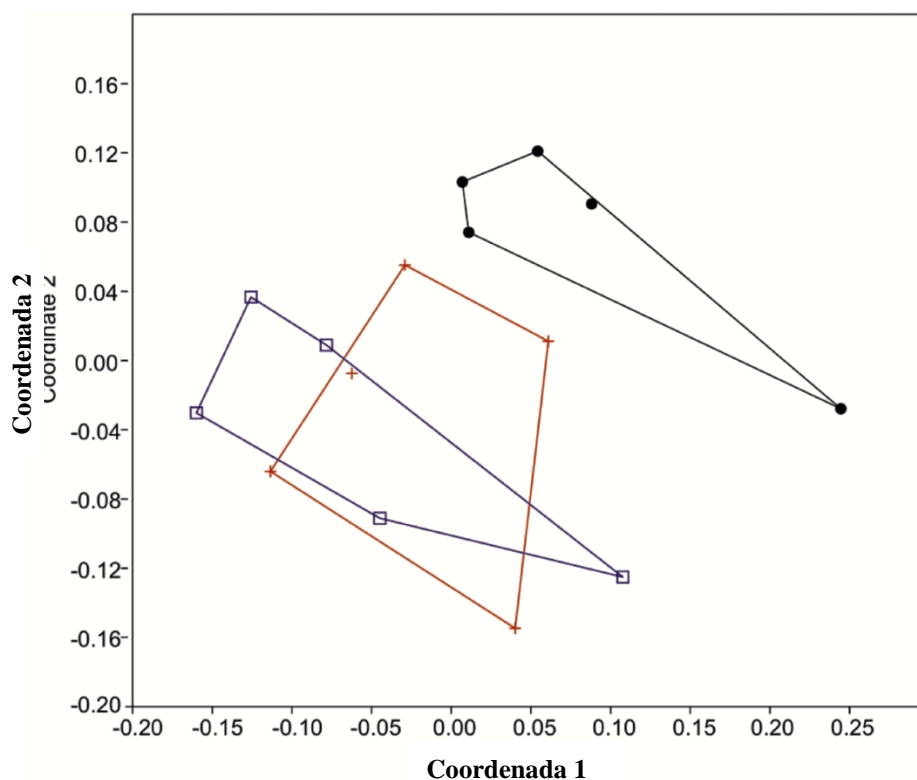
A descrição de *P. microphyllus* está de acordo com as características observadas nas plantas usadas neste estudo: arbusto cerca de 40 cm comprimento; caule alado, pubescente; estípula pubescente, 1–2 mm comprimento; folhas 2–12,7 × 2,1–7,5 cm (FIGURA S2), imparipinada, raramente paripinada, cartácea, pecíolo 0,3–3,7 cm, canaliculado, pubescente; peciólulo alado, canaliculado, verde oliva, pubescente, 1,3–11,9 cm; raque 1–15,5 cm, pubescente; folíolos 1–11 × 0,9–8 cm, sésil exceto para o folíolo terminal, verde escuro adaxialmente, verde pálido abaxialmente, cartácea, glabra, elíptica a estreitamente ovada, ápice arredondado a emarginado ou retuso, base assimétrica a atenuada, raque inteira; venação brochidodromous, nervura principal proeminente adaxialmente, venação secundária 6–13; folíolo terminal ovado, elíptico, ápice arredondado a emarginado ou retuso, base atenuada; ; glândulas punctadas presentes. Inflorescência racemo, 13,5–39,2 cm comprimento, flor amarela esverdeada, fruto cápsula branca. Floração e frutificação de Março a Julho.

Os indivíduos dos três grupos substancialmente sobrepostos quando os dois primeiros componentes principais (54,8% da variância) derivados das 11 variáveis morfológicas foram representados graficamente, apesar dos componentes principais dois e três (35,5% da variância) parcialmente separa AM01 a partir dos outros dois grupos. O *scree plot* (ponto de inflexão) e o *broken stick test* (teste da “vara quebrada”) (no PAST) mostrou que os primeiros quatro componentes (82,7% da variância) foram significativas na PCA (FIGURA S3). A LDA mostrou uma clara separação entre a linha verde (AM01) e tradicional (AM02 e AM03) ao longo do eixo discriminante, mas o Hotelling t^2 teste não foi significativo ($t^2 = 74.1$, $F = 1.6$, $P = 0.4$) por causa do pequeno tamanho da amostra (FIGURA S4). As variáveis que mais contribuíram para a separação foram as seguintes: a linha verde apresentou mais folíolos e a lâmina do folíolo terminal foi mais ramificada com um peciólulo mais longo e estreito, enquanto a linha tradicional apresentou um pecíolo mais longo e o peciólulo do folíolo terminal foi mais curto e largo.

6.3.7 Correlação entre os dados moleculares e morfológicos

O PCoA dos marcadores ISSR e variáveis morfológicas quantitativas claramente separou AM01 (linha verde) de AM02 e AM03 (ambos linha tradicional) ao longo dos dois primeiros principais eixos coordenados, como mostrado na FIGURA 21. Estes eixos representam 36,8% da variância total.

FIGURA 21 – Análise de Coordenadas Principais de 11 variáveis morfológicas quantitativas e 111 marcadores moleculares binários de três grupos de *Pilocarpus microphyllus* (AM01, AM02, AM3) representando duas linhagens cultivadas. Linha verde (preto: AM01). Linha tradicional (vermelho: AM02, azul: AM03)



6.4 Discussão

Este estudo combinou vários métodos distintos para avaliar a variação química morfológica e genética em *P. microphyllus*. Estudos morfométricos multivariados que utilizam métodos estatísticos para explorar a variabilidade morfológica entre as espécimes são frequentemente utilizados para identificar diferenças fenotípicas dentro das espécies (BLACKITH, 1971; CRUZ, 1990; MARCUS, 1990; REYMENT, 1991; HENDERSON, 2006). Marcadores ISSR podem refletir a variação entre e dentro de pequenas populações a custos relativamente baixos, porque são caracterizados por um elevado grau de polimorfismo (LIU & WENDEL, 2001; WOLFE, 2005). *Pilocarpus microphyllus* foi previamente estudada usando amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (MOURA et. al., 2005) para avaliar a variabilidade genética de um germoplasma. Os autores não encontraram correlação entre os resultados de RAPD para amostras de populações nativas e um genótipo melhorado da Merck que teve a matéria seca e área foliar maior. Sandhu et al. 2006 não encontraram correlação entre marcadores RAPD e teor de PIL em 20 genótipos de *P. microphyllus* do estado de Maranhão (Brasil). Em contraste, os nossos resultados mostraram clara diferenças genéticas e fenotípicas entre as duas linhas cultivadas, incluindo teor de alcaloides. Os marcadores ISSR são conhecidos por serem altamente polimórficos em *P. microphyllus* (ROCHA et. al., 2014) e será informativo para futuros estudos sobre a diversidade genética de populações nativas.

Os dados morfológicos e de DNA polimórficos revelaram diversidade significativa nas linhas de *P. microphyllus*, apesar do pequeno tamanho da amostra utilizada neste estudo piloto. Estes resultados indicam que mais estudos de populações nativas, bem como dados mais detalhados a partir de linhas atualmente cultivadas, terão importantes aplicações para a extração industrial dos alcaloides e conservação de populações nativas. Outras investigações da variabilidade genética e fenotípica serão importantes para cruzar geneticamente genitores divergentes para produzir híbridos com uma heterozigosidade superior (CRUZ, 1990).

Os principais achados deste estudo são que os teores dos alcaloides PIL e EPI variam por mês nas estações seca e chuvosa e que nos três grupos de *P. microphyllus* o teor de alcaloides é correlacionado com a diversidade genética e morfológica. Os perfis de PIL e EPI foram quantificados e avaliados ao longo de um ano para avaliar os efeitos

das estações seca e chuvosa. Análises moleculares e morfométricas identificaram as diferenças genéticas e morfológicas entre as plantas cultivadas, incluindo as linhas verde e tradicional. Estudos anteriores demonstraram que as condições agronômicas e ambientais podem afetar o teor de alcaloide (ABREU et. al., 2010) e em *P. microphyllus*, situações de estresse de minerais, sais e oxigênio afetou o teor de PIL (AVANCINI et.al., 2003). No presente estudo, as plantas foram cultivadas nas mesmas condições ambientais e agronômicas onde a umidade, temperatura e precipitação foram monitoradas. Todas as amostras foram colhidas da mesma forma, utilizando o material vegetal jovem, que tem evidenciado teores mais elevados de PIL (ABREU et. al, 2010). O Nordeste do Brasil tem apenas duas estações bem definidas: a estação seca, entre agosto e dezembro, quando as chuvas são raramente registradas, e a estação chuvosa entre janeiro a julho, quando elevada precipitação é geralmente registrada (MONTEIRO et. al., 2006). Para o uso industrial de *P. microphyllus*, apenas material vegetal com teor PIL maior ou igual a 0,500 % são considerados adequadas para a extração, onde a maioria dos exemplares nativos atende a esta especificação (PINHEIRO, 1997).

PIL foi o alcaloide majoritário em *P. microphyllus*, com o maior teor nas folhas, corroborando com estudos anteriores (SANDHU et. al., 2006). Neste trabalho, o teor de PIL variou ao longo do ano em todas as amostras. Os níveis mais baixos foram registrados na estação chuvosa (FIGURA 18 e FIGURA 20), e os mais altos na estação seca, o que sugere que a precipitação tem influência negativa sobre o teor de PIL. Estudo anterior verificou que amostras aleatórias de *P. microphyllus* colhidas na estação seca apresentaram maior teor de PIL (ABREU et. al., 2007). Estes resultados confirmam que o teor de PIL responde a condições ambientais, especialmente a precipitação. Comunidades extrativistas não colhem esta espécie na estação chuvosa, supostamente devido à dificuldade de secagem ao sol das folhas e a rejeição de matérias-primas com teores fora da especificação de PIL para a extração industrial. Esta diminuição no teor de PIL observada anteriormente em populações nativas de *P. microphyllus* foi também registrada nas linhagens cultivadas utilizadas neste estudo.

Outro achado importante deste estudo é o teor elevado de PIL da linha verde (AM01). Esta linha é adequada para a extração industrial de PIL, pois o teor está próximo ou acima do limite da especificação industrial de $\geq 0,500$ % (m/m) em todos os meses do estudo de sazonalidade (TABELA 4 e FIGURA 20). A espécie está oficialmente listada como ameaçada de extinção pelo IBAMA, órgão ambiental regulamentar brasileiro (IBAMA, 2008), no entanto o presente estudo indica que as

populações silvestres remanescentes de *P. microphyllus* podiam ser protegidas pelo cultivo de variedades específicas para fins de extração dos alcaloides, diminuindo a pressão sobre plantas nativas.

EPI é outro alcaloide de *P. microphyllus* que tem recentemente atraído a atenção da comunidade científica pela atividade esquistossomicida *in vitro* (VÉRAS et. al., 2013) e *in vivo* (GUIMARÃES et. al., 2015). É uma molécula promissora para o combate de uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em países subdesenvolvidos (STEINMANN et.al., 2006). EPI tem um efeito contra os parasitas jovens e adultos de *Schistosoma mansoni* e inibe a postura de ovos. A extração, purificação e isolamento de EPI em escala industrial e a caracterização estrutural espectroscópica foram estudadas (VÉRAS et. al., 2013). Outros estudos *in vivo* têm sido pesquisados como as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da EPI (SILVA et. al., 2013) que pode contribuir para o tratamento de granulomas hepáticos formados por ovos de *S. mansoni* (GUIMARÃES et. al., 2015). No entanto, o perfil sazonal de EPI não havia sido estudado anteriormente. Este alcaloide foi encontrado em quantidades significativamente baixas em AM01 em todos os meses (TABELA 5), indicando que a linha verde não é a melhor fonte para a extração de EPI. Em contraste, a linha tradicional representada por AM02 e AM03 apresentou considerável teor de EPI e seria adequada para a extração (TABELA 5). A linha jaborandi tradicional deve ser estudada para extração, purificação e isolamento industrial de EPI. Apesar dos altos teores de EPI registrados nas AM02 e AM03, apenas nos meses de agosto (AM02) e setembro (AM03) atingiram o limiar necessário para a extração industrial (> 0,500%), sugerindo ainda melhoramento genético ou estudos de seleção para aumentar o rendimento de EPI nesta linha.

As análises de marcadores polimórficos genéticos e os aspectos morfológicos diferenciaram os indivíduos da linha verde (AM01) dos da linha tradicional (AM02, AM03) (FIGURA 21 e FIGURA S4). Além disso, a jaborandi linha verde tem folhas verdes brilhantes e um maior grau de ramificação, ao passo que a linha jaborandi tradicional tem folhas verdes mais escuras e escassa ramificação. Os dados também mostraram diferenças químicas entre as linhas, com perfis de alcaloides semelhantes em AM02 e AM03, mas diferente em AM01 (FIGURAS 19 e 20; TABELAS 4 e 5). Estes resultados indicam que duas formas distintas de *P. microphyllus* estão presentes na planta estudada, talvez deliberadamente selecionadas a partir de populações naturais

pelos primeiros coletores. Mais estudos são necessários para caracterizar plenamente estas duas formas distintas de *P. microphyllus*.

Este estudo mostra pela primeira vez a correlação entre a química e os perfis morfológicos e moleculares de *P. microphyllus* destacando os benefícios potenciais de uma abordagem multidisciplinar em que o teor sazonal de alcaloides industrialmente importantes podem ser associados à população, a diversidade genética e a variação morfológica. Além do mais, este estudo permitirá uma melhor seleção e desenvolvimento de cultivares de jaborandi com foco na maximização do teor de alcaloides. Cultivares melhorados irão reduzir a coleta e a pressão sobre as populações nativas e darão suporte para produção durante todo o ano com relação aos dois importantes alcaloides.

6.5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LAMOL) da Universidade Federal do Piauí e ao Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) pela utilização de seu laboratório de análises. Agradecemos a empresa Anidro do Brasil Extrações S.A. e a Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação LTDA (Grupo Centroflora) por disponibilizar o padrão de pilocarpina, as amostras das espécimes de *Pilocarpus microphyllus* da fazenda e as fotografias. Agradecemos também o Dr. Simon Mayo do Royal Botanic Gardens, Kew, por suas valiosas contribuições para as análises morfométricas e moleculares.

6.6 Informações de apoio (S) – Figuras e Tabelas

FIGURA S1 – Padrões ISSR nos grupos AM01, AM02, AM03 *Pilocarpus microphyllus* cultivada (analisados com software GenAEx 6.5).

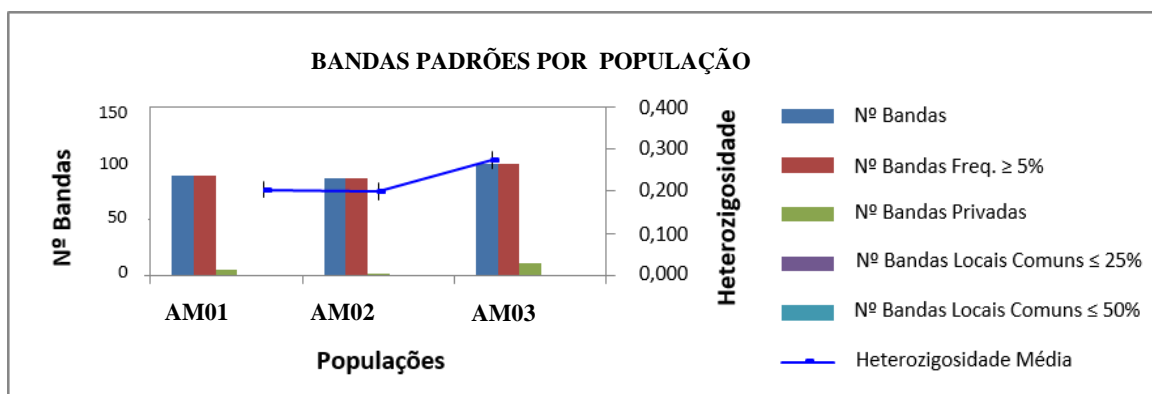


FIGURA S2 – *Pilocarpus microphyllus* folíolos terminais evidenciando o peciólulo. Fileira superior: grupo AM01 (linha verde) exemplares de 1 a 5. Fileira mediana: grupo AM02 (linha tradicional) exemplares de 6 a 10. Fileira inferior: grupo AM03 (linha tradicional) exemplares de 11 a 15.

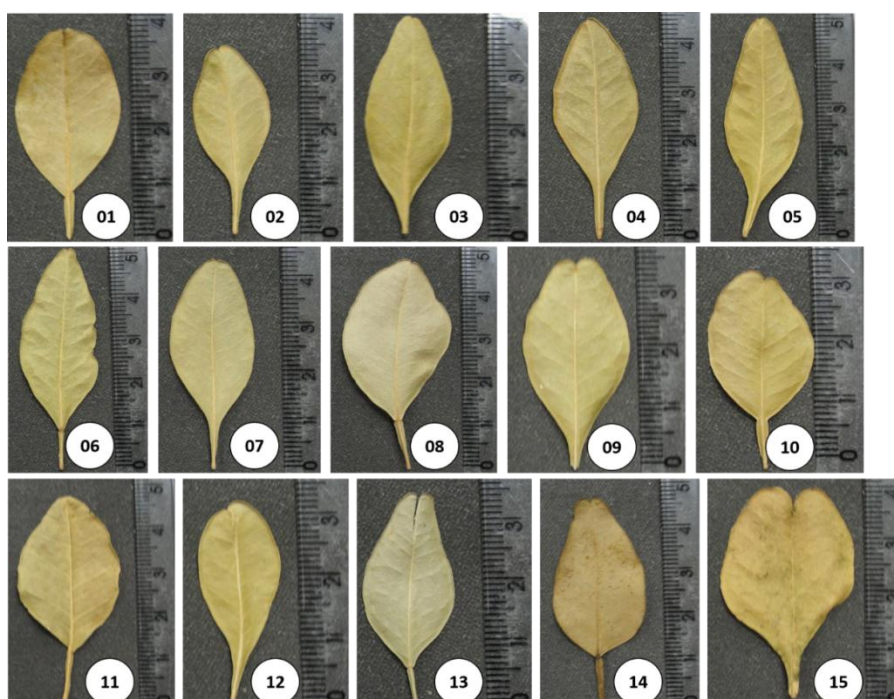


FIGURA S3 – Análise de componentes principais de 11 variáveis morfológicas quantitativas, mostrando a projeção dos dois primeiros componentes principais. Preto: Grupo AM01 (linha verde). Vermelho e azul: grupos AM02 e AM03 (linha tradicional).

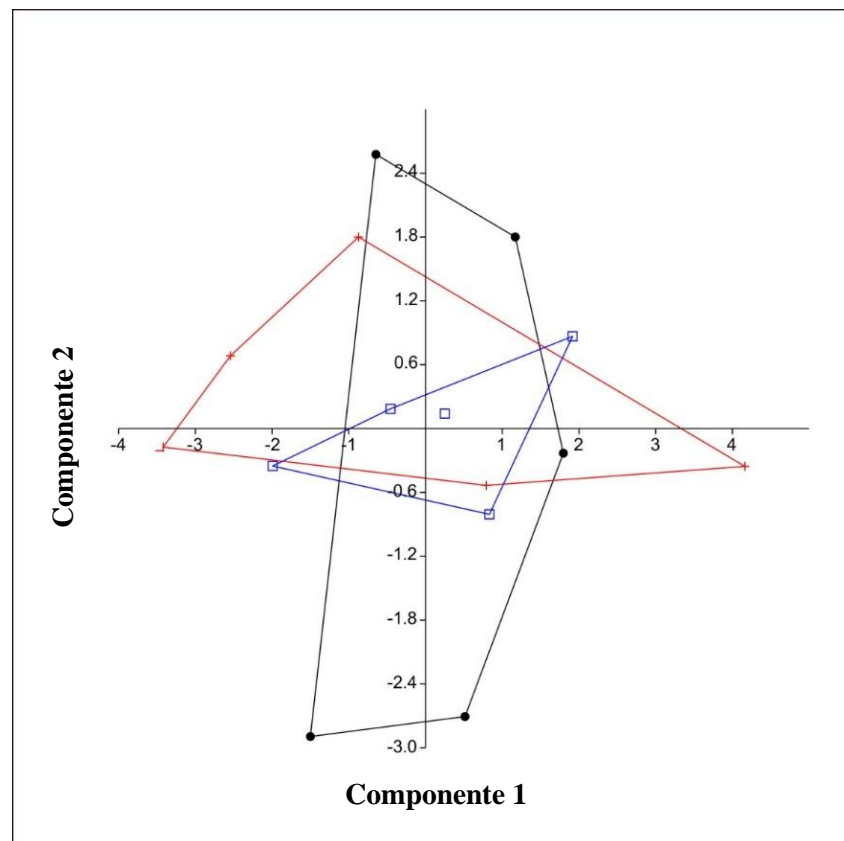


FIGURA S4 – Análise linear discriminante de duas linhas (verde, tradicional) de *Pilocarpus microphyllus* cultivado usando onze variáveis morfológicas quantitativas. Preto: grupo AM01 (linha verde). Vermelho: grupos AM02 e AM03 (linha tradicional).

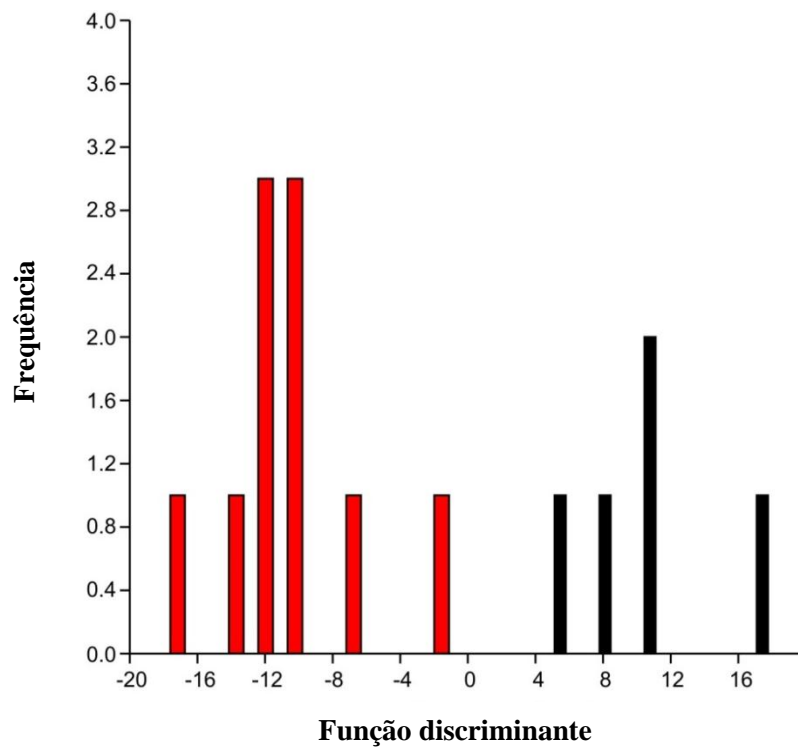


TABELA S1 – Condições ambientais registradas durante a coleta de *Pilocarpus microphyllus* nas estações chuvosa e seca.

	Estações											
	Chuvosa							Seca				
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
IP (mm)	115,8	66,5	155,7	160,5	130,0	101,0	38,3	-	-	-	-	-
T (°C)	32,0	33,1	34,2	34,2	34,9	34,2	33,8	35,2	32,4	31,0	30,2	33,8
U (%)	56	66	63	64	59	58	50	43	53	55	70	56

(IP) Índice pluviométrico; (T) Temperatura; (U) Umidade.

TABELA S2 – Padrões totais de bandas para dados binários (haplóides) pela população.

População	AM01	AM02	AM03
No. Bandas	89	86	99
No. Bandas Frequentes $\geq 5\%$	89	86	99
No. Bandas Privadas	5	1	11
No. LCom^a Bandas $\leq 25\%$	0	0	0
No. LCom^a Bandas $\leq 50\%$	0	0	0
Média h^b	0,203 \pm 0,019	0,199 \pm 0,020	0,274 \pm 0,019
Média uh^c	0,254 \pm 0,024	0,249 \pm 0,024	0,342 \pm 0,024

Dados representam as médias dos valores \pm desvio padrão.

^a No. LCom Bandas: no. de bandas locais comuns

^b h: diversidade

^c uh: diversidade imparcial

7. Considerações finais e perspectivas

A partir de todos os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A prospecção tecnológica evidenciou escassos estudos relacionados a aplicação farmacológica e biotecnológica dos alcaloides imidazólicos do gênero *Pilocarpus* e da espécie *Pilocarpus microphyllus*;
- O Brasil apesar de se destacar na publicação em periódicos com o gênero *Pilocarpus* e a espécie *Pilocarpus microphyllus*, não tem a cultura de proteger os estudos desenvolvidos;
- A patente de extração, purificação e isolamento do alcaloide epiisopiloturina (INPI nº BR 10 2012 0183013 2012) depositada em julho de 2012, aguarda o processo de publicação pelo INPI, último despacho em 01/03/2016. Isto evidencia a morosidade brasileira na análise e publicação de patentes;
- O estudo de sazonalidade evidenciou que o período chuvoso interfere de forma negativa no teor do alcaloide pilocarpina em todas as variedades avaliadas;
- A variedade jaborandi linha verde se mostrou ideal para cultivo, domesticação e replicação para extração do alcaloide pilocarpina durante todos os meses do estudo sazonal, esta variedade apresentou teores insatisfatórios do alcaloide epiisopiloturina e epiisopilosina;
- Os alcaloides isopilosina e pilosina apresentaram teores significativos na variedade jaborandi linha verde para possíveis estudos de domesticação, seleção e melhoramento genético para extração industrial destes alcaloides;
- A variedade jaborandi linha tradicional se mostrou ideal para replicação com foco na extração do alcaloide epiisopiloturina e epiisopilosina, bem como para realização de estudos de melhoramento genético com foco na produção industrial destes promissores alcaloides contra a esquistossomose.
- O alcaloide macaubina não apresentou diferenças de teor entre as variedades avaliadas;
- Os marcadores químicos, moleculares e morfológicos permitiram distinguir as variedades de *P. microphyllus* em populações cultivadas, sendo estas ferramentas em conjunto indispensáveis a serem utilizadas pelas indústrias que beneficiam a espécie,

contribuindo assim com a seleção de variedades ideais com foco no alcaloide de interesse e conservação da biodiversidade;

- A análise do perfil qualitativo e quantitativo dos alcaloides imidazólicos da espécie *P. microphyllus* em 4 municípios da região do Território dos Cocais Piauienses permitiram confirmar o alto teor do alcaloide pilocarpina em populações nativas no estado do Piauí, bem como abre perspectivas para estudos relacionados a seleção de populações para o isolamento dos alcaloides secundários;
- Este trabalho evidencia que os estudos inter e multidisciplinares abrangendo diversas áreas do conhecimento e a parceria público-privada são de fundamental importância para que a biodiversidade brasileira constitua fonte de matérias primas para extração de fitofármacos e extratos vegetais padronizados para uso pela indústria farmacêutica nacional com sustentabilidade, segurança e eficácia.

A partir dos resultados apresentados nesta Tese de Doutorado, com a espécie *Pilocarpus microphyllus* apresentamos as seguintes perspectivas:

- Utilizar as ferramentas químicas, moleculares e morfológicas desenvolvidas para separação dos grupos dos exemplares cultivados e nativos de *P. microphyllus*;
- Guiar a implantação de novas áreas de cultivo com a finalidade de aumentar/otimizar a produção dos alcaloides de interesse na massa verde obtida;
- Realizar amplo estudo de caracterização genética e morfológica das populações cultivadas e nativas a fim de ampliar perspectivas para seleção natural e melhoramento genético dos cultivares.
- Realizar estudos das rotas de síntese dos alcaloides secundários da espécie *P. microphyllus* e sua influência sobre o teor do alcaloide majoritário pilocarpina.
- Realizar estudos quanto a análise do solo e sua influência sobre o teor dos alcaloides imidazólicos na espécie *P. microphyllus* cultivada e em populações nativas.

Referências

- ABREU, I. N. et al. Characterization of the variation of the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, n. 21, p. 1205–1213, 18 jan. 2007.
- ABREU, I. N. et al. Metabolic Alterations in Different Developmental Stages of *Pilocarpus microphyllus*. **Planta Medicinal**, n. 77, p. 293-300, 15 set. 2010.
- AGBAN, Y. et al. Nanoparticle cross-linked collagen shields for sustained delivery of pilocarpine hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 501(1-2), p. 96-101. 29 jan. 2016.
- ANDRADE-NETO. M.; MENDES, P.H.; SILVEIRA, E.R. An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 885-887. 1996.
- AVANCINI, G. et al. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**, v. 63, p.171-175, maio 2003.
- BAPTISTA NETO, C.; SUGAYA, N.N. Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região da cabeça e do pescoço. **Revista Biociência**, v.10, n.3, p.147-151, jul./set. 2004.
- BENTO, R. R. F. et al. Comparative vibrational spectra of pilosine and epiisopilosine crystals. **Brazilian Journal of Physics**, v. 40, n. 2, p. 217-223, jun. 2010.
- BLACKITH, R.E.; REYMEN, R. A. **Multivariate Morphometrics**. Academic Press. London, 1971.
- BLYTON, M. D. J.; FLANAGAN, N. S. **A Comprehensive Guide to: GenAIEx Genetic Analysis in Excel**. Canberra: Australian National University, 2012.
- BRANDAO, M. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 20 nov. 2008.

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 333, n.1, p. 1–13, 1 out. 2004.

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

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2. ed. The New York Botanical Garden, New York, 1988.

CRUZ, C. D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba.1990. 188f. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba, São Paulo.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15. 1987.

EXCOFFIER. L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p. 479-491, jun. 1992.

FLORA DO BRASIL, *Rutaceae* 2020 em construção. Brasil: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB866>> acesso em 29 fev. 2016.

GIL-MONTOYA, J. A. et. al. Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: A systematic review. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**. março 2016.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, p. 632–639, 2005.

GUIMARÃES, M.A. et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n.3, p 1-18, 27 mar. 2015.

GUIMARÃES, M.A. et al. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and *In Vitro* Schistosomicidal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.14, n. 6, p. 4519-4528. 2014.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; PAUL, D.R. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HENDERSON, A. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.151, n. 1, p. 103-111, maio 2006.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente (MMA) nº06, de 26 de setembro de 2008. Estabelece a Lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção.

KAASTRA, R.C. *Pilocarpinae* (Rutaceae). *Flora Neotropica*; Monografia n.33, The New York Botanical Garden, New York, 1982.

LEITE, J. R. S. A. et al. **Processo de Extração, Purificação e Isolamento do Alcaloide Epiisopiloturina**. Universidade Federal do Piauí. Anidro do Brasil Extrações S.A. Brasil. BR 10 2012 0183013 2012.

LEITE, J. R. S. A. et al. **Processo de Obtenção de Epiisopiloturina e sua Aplicação no Combate a Infecções Parasitárias**. INPI. Universidade Federal do Piauí. Brasil. PI0904110-9 2009.

LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M.P.F. **Medical botany - plants affecting man's health**. New York: John Wiley & Sons, 1977.

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

LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p. 205-208, 22 mar. 2001.

LORENZI, H.A.; MATOS, F.J. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, São Paulo, 2002.

LUCIO, E. M. R. A. et al. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, p. 23-35, 2000.

MARCUS, L.F. **Traditional morphometrics**. In: Rohlf FJ. & Bookstein FL. editors. Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Special Publication Number 2. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor; 1990.

MELO, C. M. et al. A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, p. 689-607, 24 set. 2014.

MITTEROECKER, P.; BOOKSTEIN, F. Linear Discrimination, Ordination, and the Visualization of Selection Gradients in Modern Morphometrics. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 38, p.100-114, 25 fev. 2011.

MIURA, L. M. C. V. Isolamento do alcaloide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

MONTEIRO, J. M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. And *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 338-344 jul/ set. 2006.

MOURA, E. F. Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

MOURA, E. F. Genetic diversity in a jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) germplasm bank assessed by RAPD markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 1-8. 2005.

NORDSTROM, B.L. et al. Persistence and adherence with topical glaucoma therapy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 4, p. 598-606, out. 2005.

ORIGINPRO 8.5 software. Graphing & analysis. Northampton: OriginLab Corporation, 2010.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, jul. 2012.

PINHEIRO, C.U.B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* ex Holm., Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. São Paulo, v. 16, n.2, abril 2002.

PINHEIRO, C.U.B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): A wild species and its rapid transformation into a Crop. **Economic Botany**, v.51, n.1, p. 49-58. 1997.

R CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

REYMENT, R. A. Multidimensional paleobiology. Pergamon Press. New York; 1991.
ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: Ed. Premier, 1997. p. 163-208. Título original: Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology.

ROCHA, J. A. et al. ISSR Primer Selection for Genetic Variability Analyses with Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae). **Forest Research**, v.3, n.3, p. 01-05, 14 ago. 2014.

ROCHA, J. A. Variabilidade genética e avaliação anti-schistosoma dos alcalóides pilosina, epiisopilosina, isopilosina e macaubina de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew.). 2013. 145f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

- ROMERO, N. R. Contribuição ao Conhecimento Químico do Gênero *Pilocarpus*: *Pilocarpus microphyllus* Stapf. E *Pilocarpus carajaensis* Skorupa. Fortaleza. 2005. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.
- SAMARAKOON. T.; WANG, S.Y.; ALFORD, M. H. Enhancing PCR Amplification of DNA from Recalcitrant Plant Specimens Using a Trehalose-Based Additive. **Applications in Plant Sciences**, v.1, n. 1, p. 1-3. 2013.
- SANDHU, S.S. et al. Pilocarpine and molecular diversity in jaborandi. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 5, p. 478–482, 2006.
- SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 115 – 137, abr./ jun. 2004.
- SAS software estatístico. Versão 9.3. Cary: SAS Instituto Inc.; 2016.
- SAWAYA, A. C. H. F. et. al. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpina and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, V.58, p. 471-480, 2011.
- SILVA, V.G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturina, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1071-1077. 2013.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 4 ed. Porto Alegre: Ed. Universitária, 2002.
- SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (RUTACEAE) da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v .30, n. 1, p. 59-70, 2000a.
- SKORUPA, L. A. New Chromosome numbers in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). **Botânica Brasilica**, v.14, n.1, p. 11-14, 2000b.
- SKORUPA, L. A. New infraspecific taxa and combinations in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n.2, p. 263-270, jun. 2003.

SKORUPA, L. A. Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae). São Paulo. 1996. 426 p. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SKORUPA, L. A.; PIRANI, J. R. A New Species of *Pilocarpus* (Rutaceae) from Northern Brazil. **Brittonia**. v. 56, n. 2, p. 147-150, 2004.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n.7, p. 411-425, jul. 2006.

STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website [Internet]. Saint Louis: University of Missouri.; versão 13 [atualizado em: 09 Abr. 2016]. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> acesso em 14 abr. 2016.

TSAI, J.C. et al. Compliance barriers in glaucoma: a systematic classification. **Journal of Glaucoma**, v. 12, n. 5, p. 393-398, out. 2003.

VEGEFLORA, **Plano de manejo florestal comunitário: *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi**. Parnaíba, VEGEFLORA, 2010.

VÉRAS, L. M. C. Caracterização e aplicações biotecnológicas de alcaloides do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). 2014. 204 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Rede Nordeste de Biotecnologia- Renorbio, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

VÉRAS, L. M. C. et al. Activity of Epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2051-2058. 2012.

VÉRAS. L. M. C. et. al. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, jun. 2013

VOIGTLANDER, H-W. et al. Epiisopiloturin, einneues Pilocarpus-Alkaloid. **Archiv der Pharmazie**, v. 311, p. 927-935. 1978.

WOLFE, A. D et. al. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v.7, p. 1107-1125. 1998.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzymology**, v. 395, p. 134-144. 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Comprovante de pedido de depósito de patente

E-mail de Universidade Federal do Piauí - INPI informa: seu pedido foi depositado. Proces... <https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=20b4cc7562&view=pt&search=inbox&th=138...>



Nintec UFPI <nintec@ufpi.edu.br>

INPI informa: seu pedido foi depositado. Processo N.º: BR 10 2012 018301 3 GRU N.º: 0000221202661330
1 mensagem

webmaster@inpi.gov.br <webmaster@inpi.gov.br>
Para: nintec@ufpi.edu.br

24 de julho de 2012 11:11

Sr. Usuário,

Este é um email automático e não é necessário responder a esta mensagem.

Você acaba de apresentar um pedido de patente ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Lembramos da necessidade de a partir da data de hoje, acompanhar o seu pedido. Para isso, utilize a numeração do pedido encaminhada nesta mensagem.

Esse acompanhamento deverá ser efetuado da seguinte forma:

Consulte semanalmente, pelo número do processo, a Revista Eletrônica da Propriedade Industrial - RPI (Edição Patentes - disponível em formato .pdf no portal (www.inpi.gov.br), na qual serão publicados todos os atos relativos ao seu pedido de patente.

Em alguns casos excepcionais (remessas por Via Postal ou por Postos Avançados do INPI), poderão existir exigências formais para o seu pedido (com prazo de 30 (trinta) dias para o cumprimento) sem que a via com número de processo chegue até você. Nestes casos, utilize a numeração encaminhada nesta mensagem para acompanhar o andamento do processo. Esta mensagem de notificação é encaminhada no momento em que o pedido for protocolado em uma de nossas recepções.

Ratificamos a importância do acompanhamento semanal de seu pedido, visto que o mesmo pode ser alvo de uma exigência formal, que deverá ser cumprida em 30 (trinta) dias a partir da publicação na RPI, sob pena de anulação do número do pedido. Protocolo 032120000121 na Unidade Representação do Piauí, em 18/07/2012 10:07:00.

Anote o Número do seu Processo **BR 10 2012 018301 3**

webmaster - INPI

APÊNDICE 2 – Pedido de depósito de patente pelo Núcleo de Inovação Tecnológica UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 10:07 horas do dia 18/07/2012, sob o número de Protocolo do INPI: 000121, o depósito de pedido de Patente de Invenção intitulada “**Processo de extração, purificação e isolamento do alcaloide epiisopiloturina**”, em co-titularidade com **Anidro do Brasil Extrações S.A.**, desenvolvida pelos inventores:

José Roberto de Souza de Almeida Leite

Leiz Maria Cota Vêras

Yuri Dias Macedo Campelo

Maria Adelaide Guimarães

Marianne Moraes Vieira

David Fernandes Lima

Paulo Robério Pinho

Luciene Costa Vasconcelos

Teresina (PI), 18 de Julho de 2012.

Prof.^a Dr.^a Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

APÊNDICE 3 – Submissão manuscrito ao periódico PLOS ONE.

PLOS ONE

Seasonal Change in Main Alkaloids of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an Economically Important Species from the Brazilian Flora
–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Seasonal Change in Main Alkaloids of Jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth), an Economically Important Species from the Brazilian Flora
Short Title:	Seasonal Change in Main Alkaloids of <i>Pilocarpus microphyllus</i>
Corresponding Author:	José Roberto de Souza de Almeida Leite, Ph.D. UFPI Parnaíba, BRAZIL
Keywords:	<i>Pilocarpus microphyllus</i> ; jaborandi; pilocarpine; epiisopiloturine; seasonal change alkaloid
Abstract:	<p><i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth (jaborandi, Rutaceae) is one of the most important Brazilian medicinal species owing to its content of pilocarpine (PIL), an alkaloid used for treating glaucoma and xerostomia. This species contains another alkaloid, epiisopiloturine (EPI), which has demonstrated effectiveness against schistosomiasis. The aim of this work was to assess seasonal changes of PIL and EPI in three populations of cultivated <i>P. microphyllus</i> from northeastern Brazil over one year, including the dry and rainy seasons. Alkaloid profiles were correlated to phenotypic and genetic patterns in the morphological and molecular characterizations. PIL was the primary alkaloid and its levels differed among populations in all months except September. The S01 population (green line) showed an especially high PIL content compared to populations S02 and S03 (traditional line), which had similar alkaloid contents. PIL content gradually decreased in the three populations in the rainy season. EPI content was significantly different between the green line (S01) and the traditional line (S02 and S03). S01 had a significantly lower EPI content in all months, demonstrating that it was not the best source for EPI extraction. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers and morphological analyses clearly separated S01 from S02 and S03, in agreement with the alkaloid results. This study shows the first correlation between the chemical, morphological, and molecular markers of <i>P. microphyllus</i> and highlights the potential benefits of a multidisciplinary research approach aimed at supporting both industry and conservation of natural resources.</p>
Order of Authors:	José Roberto de Souza de Almeida Leite, Ph.D. David Fernandes Lima Luiza Ianny Lima Jefferson Almeida Rocha Ivanilza Moreira Andrade Liliana Gonçalves Grazina Caterina Villa Liliana Meira Leiz Maria Costa Vêras Iábita Fabiana Sousa Azevedo Adriele Giaretta Biase Joana Costa Maria Beatriz P.P. Oliveira Isabel Mafra

APÊNDICE 4 – Carta de aceite artigo em parceria EMBRAPA com a espécie *P. microphyllus*



COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

Departamento de Patologia Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Campus Jaboticabal), UNESP.

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n

Zona Rural 14884-900 - Jaboticabal / SP

Fone: (16) 3209-2662 – Fax: (19) 4062 -9501

Home Page: <http://www.cbpv.com.br> / E-mail: zacariascbpv@fcav.unesp.br

Jaboticabal, 26 de abril de 2016.

Ilma Sra.
Karina Neoob de Carvalho Castro
Embrapa Meio-Norte
Parnaíba, PI

Prezada Senhora,

Comunicamos a Vossa Senhoria que o trabalho nº RBPV-2015-0137, intitulado “*In vitro effects of Pilocarpus microphyllus extracts and pilocarpine hydrochloride on Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”, foi aprovado para publicação. Aproveitamos para informar também que para que o mesmo seja diagramado, é necessário o recolhimento da taxa de publicação, no valor de R\$ 250,00 (duzentos e cinquenta reais), a qual deverá ser depositada na conta da RBPV (Banco do Brasil, agência 0269-0, conta corrente 28848-9), conforme norma aprovada no último congresso e transcrevemos abaixo:

“*Sendo assim, duas propostas foram apresentadas à Assembleia: 1) Taxa de tramitação de R\$ 60,00 mais taxa de publicação de R\$ 500,00 para não associados e de R\$ 250,00 para associados; 2) Exclusão da taxa de tramitação e taxa de publicação de R\$ 500,00 para não associados e de R\$ 250,00 para associados. Com 47 votos a três, a segunda proposta foi aprovada pela Assembleia.*”

Sem mais para o momento, enviamos a Vossa Senhoria nossos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profª. Dra. Rosângela Zacárias Machado
Editora-chefe da RBPV

Nota: Após o pagamento, encaminhar o comprovante de depósito pelo e-mail zacariascbpv@fcav.unesp.br

APÊNDICE 5 – Atividade desenvolvidas durante a Pós-Graduação

1. Atividades desenvolvidas

Durante o período de realização do doutoramento junto ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO (2012-Atual), outras atividades acadêmico-científicas foram realizadas, como a publicação em co-autoria de 4 (quatro) artigos científicos em periódicos internacionais indexados relacionados a espécie *P. microphyllus* e seus alcaloides. O envolvimento em outras atividades de pesquisa e parcerias do grupo BIOTEC/ UFPI originaram mais 3 (três) artigos internacionais indexados. Durante o período da pós-graduação foram apresentados 18 (dezoito) trabalhos em eventos científicos, distribuídos entre eventos regionais, nacionais e internacionais, listados a seguir.

Em junho de 2014, fui aprovado no concurso público para professor efetivo das áreas de bioquímica e farmacologia na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Colegiado Acadêmico de Medicina, Campus Paulo Afonso, BA.

1.1 Artigos publicados em periódicos indexados relacionados a espécie *P. microphyllus* e seus alcaloides.

- 1.1.1. VÉRAS, L.M.C. ; GUIMARÃES, M.A. ; CAMPELO, Y.D.M. ; VIEIRA, M.M. ; NASCIMENTO, C. ; **LIMA, D.F.** ; VASCONCELOS, L. ; NAKANO, E. ; KUCKELHAUS, S.S. ; BATISTA, M.C.; LEITE, J.R.; MORAES, J. Activity of Epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry (Online)**, v.19, p 2051-2058, 2012.
- 1.1.2. VÉRAS, L.M.C. ; CUNHA, V.R.R.; LIMA, F.C.D.A. ; GUIMARÃES, M.A.; VIEIRA, M.M.; CAMPELO, Y.D.M. ; SAKAI, V. Y. ; **LIMA, D. F.** ; CARVALHO JR, P.S. ; ELLENA, J. A. ; SILVA, P. R. P. ; VASCONCELOS, L.C. ; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M. ; CONSTANTINO, V. R. L. ; MASCARENHAS, Y.P. ; LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE (Online)**, v 8(6), e66702, p 1-11, 2013.

- 1.1.3. GUIMARÃES, M.A.; CAMPELO, Y.D.M.; VÉRAS, L.M.C.; **LIMA, D.F.**; CIANCAGLINI, P.; KUCKELHAUS, S.S., et al. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and *In Vitro* Schistosomicidal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. American Scientific Publishers; 2014; 14; 4519-4528. doi: 10.1166/jnn.2014.8248.
- 1.1.4. GUIMARÃES, M.A.; DE OLIVEIRA, R.N.; VÉRAS, L.M.C.; **LIMA, D.F.**; CAMPELO, Y.D.M.; CAMPOS, S.A. et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Disease**; 2015; 9(3): e0003656.
- 1.1.5. Artigo aceito para publicação, Abril de 2016. CASTRO, K. N. C.; **LIMA, D. F.**; WOLSHICKK, D.; ANDRADE, I. M.; SANTOS, R. C.; SANTOS, F. J. S.; VERAS, L. M. C. V.; COSTA-JUNIOR, L. M. *In vitro effects of Pilocarpus microphyllus extracts and pilocarpine hydrochloride on Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (Aceite no APÊNDICE 4).

1.2. Artigos publicados em parcerias

- 1.2.1. BRANDÃO, M.S.; PEREIRA, S.S.; **LIMA, D.F.**; OLIVEIRA, J.P.C.; FERREIRA, E.L.F.; CHAVES, M.H.; **ALMEIDA, F.R.C.** Antinociceptive effect of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in models of acute pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.146, p.180 - 186, 2013.
- 1.2.2. CASTRO, K. N. C.; **LIMA, D. F.**; VASCONCELOS, L. C.; **LEITE, J. R. S. A.**; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; **COSTA-JÚNIOR, L. M.** Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research** (1987. Print). v.113, p.3697 - 3701, 2014.
- 1.2.3. QUELEMES, PATRICK V.; PERFEITO, MÁRCIA L.G.; GUIMARÃES, MARIA A.; DOS SANTOS, RAIMUNDA C.; **LIMA, DAVID F.**

NASCIMENTO, CARLOS; SILVA, MARCOS P.N.; SOARES, MARIA JOSÉ DOS S.; ROPKE, CRISTINA D.; EATON, PETER; DE MORAES, JOSUÉ; LEITE, JOSÉ ROBERTO S.A. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.175, p.287 - 294, 2015.

1.3. Trabalhos apresentados em eventos durante o período da Pós-Graduação.

- 1.3.1. DUARTE, C. L. B. N.; SILVA, C. J.; LOPES, L. F.; SANTANNA, M. A.; PINHEIRO, D. M. A.; LIMA, F. M. S.; DE SÁ, L. K. C. R.; FREITAS, W.R.; MAZZOTTI, M. R. R. M.; **LIMA, DAVID F.** Promoção do Uso Correto e Racional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Unidade de Saúde da Família – Rua do Sol, no município de Paulo Afonso, estado da Bahia. X MOSTRA DE EXTENSÃO/ UNIVASF. SENHOR DO BONFIM, BA. ANAIS X MOSTRA DE EXTENSÃO, 2016.
- 1.3.2. GUISANDE, M. T. C. R.; DUARTE, C. L. B. N.; SILVA, C. J.; LOPES, L. F.; SANTANNA, M. A.; PINHEIRO, D. M. A.; MAZZOTTI, M. R. R. M.; FREITAS, W.R.; **LIMA, DAVID F.** Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico na Unidade de Saúde da Família – Rua do Sol no município de Paulo Afonso, estado da Bahia. X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA V SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2015, PETROLINA, PE. **ANAIS X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA.** , 2015.
- 1.3.3. VIEIRA, M. M.; A. Guimaraes, M.; CAMPELO, Y. D. M.; VERAS, L. M. C.; MORAES, J.; NAKANO, E.; **D.F. Lima**; LEITE, J. R. S. A. Ação do Alcaloide Epiisopiloturina nas formas jovens e adultas do *Schistosoma mansoni* In: IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2013, JUAZEIRO DA BAHIA. **IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO.** , 2013.

- 1.3.4. A. Guimaraes, M.; CAMPELO, Y. D. M.; VERAS, L. M. C.; COLHONE, M. C.; **LIMA, David Fernandes**; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Alcalóide Epiisopiloturina Encapsulado em Carreador Lipossomal: Preparação e Atividade Esquistossomicida in vitro In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE, 2013, PARNAÍBA. **SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE.** , 2013.
- 1.3.5. GUIMARÃES, MARIA A.; CAMPELO, Y. D. M.; VERAS, L. M. C.; COLHONE, M. C.; **LIMA, D.F.**; CIANCAGLINI, P.; MORAES, J.; LEITE, J.R.S.A. Atividade Esquistossomicida in vitro da Epiisopiloturina Carreado Lipossomos In: IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2013, JUAZEIRO. **IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO.** , 2013.
- 1.3.6. **LIMA, David Fernandes**; CARVALHO, K. N.; SANTOS, R. C.; Vasconcelos, L.C.; MAGALHAES, J. A.; ANDRADE, I. M.; PAZ NETO, A. A. Avaliação da Ação de Extratos de Sansevieria trifasciata Prain (ESPADA DE SÃO JORGE) sobre Larvas de Rhiipicephalus (Boophillus) microplus In: IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2013, JUAZEIRO. **IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO.** , 2013.
- 1.3.7. CASTRO, K. N. C.; ARAUJO, A. R.; SANTOS, R. C.; ANDRADE, E. O.; LIMA, I.L.; **D.F.Lima**; LEITE, J.R.S.A. Avaliação da Atividade Antibacteriana do Extrato Etanólico da Casca de Coutarea Hexandra (JACQ.) K.SCHUM: Um estudo piloto In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE, 2013, PARNAÍBA. **SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE.** , 2013.
- 1.3.8. LIMA, I.L.; **D.F. Lima**; Vasconcelos, L.C.; SILVA, M. F. S.; ANDRADE, I. M.; LEITE, J.R.S.A. Determinação dos Alcaloides e Comparação Morfológica da Espécie Pilocarpus microphyllus STAPF EX WARDLEW cultivada In: IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO,

2013, JUAZEIRO. **IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO.** , 2013.

- 1.3.9. LIMA, I.L.; **D.F. Lima**; SILVA, E.O.; BITTENCOURT, C. B.; VERAS, L. M. C.; **LEITE,J.R.S.A.** Jaborandi (*P. microphyllus*): Importância e Perfil de Alcaloides Imidazois da Espécie Nativa In: **IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2013, JUAZEIRO. IV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO.** , 2013.
- 1.3.10. VERAS, L. M. C.; GUIMARÃES, M.A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; **LIMA, D.F.**; PINHO, P. R.; VASCONCELOS, LUCIENE C.; GODEJOHANN, M.; **MORAES, J.**; **LEITE, J. R. S. A.** Process of Extraction, Purification, Isolation of Epiisopiloturine Alkaloid and its Antiparasitic Activity against *Schistosoma Mansoni* In: 39th Internacional Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2013,Amsterdam. **39th Internacional Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques.** , 2013.
- 1.3.11. MAFUD, C. A.; VERAS, L. M. C.; A. Guimaraes, M.; **LIMA, David Fernandes**; NASCIMENTO, A.; **LEITE, J. R. S. A.**; MASCARENHAS, Y. Similaridade entre derivados e complexos de Episopiloturina com potencial atividade biológica contra *Schistosoma mansoni* In: **SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE, 2013, PARNAÍBA. SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE.** , 2013.
- 1.3.12. CASTRO, K. N. C.; LIMA, **David Fernandes**; Vasconcelos, L.C.; **LEITE, J. R. S. A.**; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A. AÇÃO IN VITRO DO ÓLEO DE *Pilocarpus microphyllus* SOBRE *Rhipicephalus microplus* In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luiz-MA. **Parasitologia Veterinária, Bem Estar e Produção Animal**, 2012.

- 1.3.13. **LIMA, D.F.**; Brandão, Marcela S.; MOURA, J.B.; Leitão, Joseana M. R. S.; Carvalho, Fernando A. A.; M. Veras, L.; LEITE, J. R. S. A.; Sousa, Damião P.; ALMEIDA, F.R.C. ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF THE MONOTERPENE ALFA-PHELLANDRENE IN RODENTS: POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION In: 44 th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012, FOZ DO IGUAÇU. **44 th BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, 2012.
- 1.3.14. PERFEITO, M. L.; QUELEMES, P. V.; SANTOS, R. C.; **D. F. Lima**; Vasconcelos, L.C.; LEITE, J. R. S. A. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIADERENTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE Azadirachta indica A. JUSS. SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS In: IV SIMPÓSIO NACIONAL DE PRODUTOS NATURAIS, 2012, JOÃOPESSOA. **IV SIMPÓSIO NACIONAL DE PRODUTOS NATURAIS**, 2012.
- 1.3.15. SANTOS, R. C.; QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L.; RIBEIRO, A. M. V.; LIMA, I.L.; **D.F. Lima**; Vasconcelos, L.C. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO FIXO DE Elaeis guineensis JACQ. SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS: UM ESTUDO PILOTO In: IV SIMPÓSIO NACIONAL DE PRODUTOS NATURAIS, 2012, JOÃOPESSOA. **IV SIMPÓSIO NACIONAL DE PRODUTOS NATURAIS**, 2012.
- 1.3.16. CAMPOS, S. A.; CAMPELO, Y. D. M.; A. Guimaraes, M.; LIMA, I.L.; VERAS, L. M. C.; **LIMA, David Fernandes**; LEITE, J. R. S. A. Avaliação dos Resíduos Industriais Oriundos do Processo de Extração da Pilocarpina In: XXII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2012, Bento Gonçalves. **XXII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 2012.
- 1.3.17. MOURA, J.B.; FREITAS, FFBP; **LIMA, D.F.**; Brandão, Marcela S.; JUNIOR JR, C.; Sousa, Damião P.; ALMEIDA, F. R. C. EVALUATION OF THE

ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF TERPINOLENE IN MICE AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION In: 44 th BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2012, FOZ DO IGUAÇU. **44 th BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, 2012.

1.3.18. VERAS, L. M. C.; CAMPELO, Y. D. M.; GUIMARÃES, M.A.; Vieira, M.M.; **LIMA, D.F.**; PINHO, P. R.; Vasconcelos, L.; Leite, José R. S. A. Process of extraction, purification and isolation of episopiloturine alkaloid. In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios, 2012, Guarujá. **4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios.** , 2012.