

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA  
RECURSOS AMAZÔNICOS

RAFAELA ROLIM DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ANTIMALÁRICOS A PARTIR DE  
COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM LIGANTES DE PRODUTOS  
NATURAIS**

ITACOATIARA-AM

2024

RAFAELA ROLIM DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ANTIMALÁRICOS A PARTIR DE  
COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM LIGANTES DE PRODUTOS  
NATURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos.

**Orientador:** Dominique Fernandes de Moura do Carmo

**Coorientador:** Paulo José de Sousa Maia

ITACOATIARA-AM

2024

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

- S586i Silva, Rafaela Rolim da  
Identificação de potenciais antimaláricos a partir de compostos de coordenação com ligantes de produtos naturais / Rafaela Rolim da Silva. - 2024.  
74 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Dominique Fernandes de Moura do Carmo.  
Coorientador(a): Paulo José de Sousa Maia.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, Itacoatiara, 2024.
1. *Vismia* spp.. 2. Malária. 3. Catequina. 4. Quercetina. 5. Complexos Metálicos. I. Carmo, Dominique Fernandes de Moura do. II. Maia, Paulo José de Sousa. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos. IV. Título
-

## AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder toda fortaleza durante todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Raimunda Rolim da Silva, por ser a pessoa que mais acredita em mim durante toda minha trajetória acadêmica, por me fortalecer com suas palavras de apoio e me passar segurança, sem seu carinho jamais conseguiria.

A minha orientadora professora Dra. Dominique Fernandes de Moura Do Carmo, por ter acreditado no meu potencial para executar este trabalho e ter me passado todo conhecimento possível para desenvolver esta pesquisa.

Ao professor Dr. Paulo José de Sousa Maia, por ser meu coorientador, sua colaboração foi fundamental para execução de parte desse trabalho.

A minha amiga Ívina Thayná Miranda Trindade, por ter me acompanhado em toda essa jornada, pelos ensinamentos na pesquisa, sua disciplina e entrega como pesquisadora foi um exemplo para mim e aprendi bastante com você.

A minha amiga e dupla nos trabalhos das disciplinas do Mestrado, Josiele Viana, sua inteligência e determinação serviram de espelho para mim e demais colegas do laboratório.

Aos meus colegas de laboratório, Aniele Neves, Douglas Feitosa, Vitor Hugo, Celine Menezes por toda colaboração, nossas conversas deixaram os dias de trabalho bem mais felizes.

A professora Jaqueline Bezerra por nos receber na Central de Química do IFAM e nos ensinar novas técnicas e ensaios que posteriormente passamos a realizar no ICET.

Ao professor Dr. Felipe de Souza Araújo pela disponibilidade de nos receber na Central analítica e nos ajudar nas análises espectrométricas.

A laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – UFAM por possibilitar e facilitar as análises de RMN das amostras isoladas.

A Universidade Federal do Amazonas por ser meu segundo lar desde a graduação, esse ambiente me proporcionou a realização de muitos sonhos.

A FAPEAM e CAPES por todo financiamento empregado na ciência e possibilitar o desenvolvimento de pesquisa.

## RESUMO

As espécies de *Vismia* spp. são frequentes na região Amazônica e utilizadas popularmente pelos povos tradicionais no tratamento da malária. Considerando a ocorrência dessa doença na região, este estudo buscou realizar identificação e caracterização de compostos químicos, presentes em extratos orgânicos dos frutos de *Vismia cayennensis* e *Vismia guianensis* e avaliar o potencial antioxidante frente aos radicais ABTS<sup>+</sup> e DPPH<sup>•</sup>, bem como quantificar o teor fenólico dos extratos dos frutos dessas espécies e analisar o potencial antimalárico frente a cepas D10 e W2 do *Plasmodium falciparum*. No perfil químico das espécies, foi possível identificar a presença dos flavonoides quercetina e catequina, obteve-se então as substâncias padrões destes que foram utilizadas como ligantes na complexação com cobre foram posteriormente avaliados biologicamente. As substâncias isoladas dos extratos brutos, foram identificadas através de técnicas de espectrometria de massas (APCI-MS, modo positivo e negativo) e Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H. As atividades biológicas foram determinadas a partir da avaliação do potencial antioxidante utilizando o Trolox como padrão, e através da avaliação do potencial antimalárico foram utilizadas as cepas D10 (resistente a cloroquina) e W2 (sensível a cloroquina). Dos resultados da avaliação química, foi possível isolar a antraquinona Ferruginina A e o flavonoide glicosilado Vitexina. Dos ensaios biológicos, observou-se um expressivo potencial antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup> dos extratos hidroalcóolicos de ambas espécies e diclorometano de *V. guianensis*. Frente ao radical ABTS<sup>+</sup> os extratos hidroalcóolicos de *V. cayennensis* e *V. guianensis* espécies apresentaram-se muito maior a concentração inibitória para este radical em específico quando comparada com os demais extratos orgânicos. Todos extratos, na concentração de 20µg/ml, foram ativos contra as cepas de *P. falciparum*, sendo o extrato hexânico de *V. guianensis* mais expressivo para cepa D10 (106,62 %) e o hidroetanólico de *V. cayennensis* maior percentual para cepa W2 (98,55%). Os complexos metálicos também demonstraram alta atividade antimalárica, sendo a amostra cobre-quercetina (100,29%) bem mais efetiva que a quercetina em sua forma livre (60,91%). Os resultados sugerem que a utilização de compostos de origem natural na coordenação a metais, como o cobre, podem ser uma boa alternativa para tratamento da doença.

Palavras-chaves: *Vismia* spp.; Malária; Catequina; Quercetina; Complexos Metálicos.

## ABSTRACT

The species of *Vismia* spp. They are common in the Amazon region and popularly used by traditional people to treat malaria, as well as many diseases that affect the skin. Considering the occurrence of pathology in pathology, this study sought to identify and characterize chemical compounds from hydroethanolic extracts and of different polarities, from the fruits of species from the region of *Vismia cayennensis* and *Vismia guianensis*, in addition to evaluating the antioxidant potential against ABTS<sup>+</sup> and DPPH<sup>•</sup>, quantify the phenolic content of extracts from the fruits of these species and analyze against plasmodial strains. From identified flavonoids, standards were acquired that were used as ligands in copper coordination compounds, which were also evaluated for antioxidant and antimalarial activity. Chemical identification was carried out using mass spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance techniques, and the determination of antioxidant activity was carried out using Trolox as a standard. In the antimalarial analysis, strains D10 (resistant to chloroquine) and W2 (sensitive to chloroquine) were used. The study made it possible to identify anthraquinones such as Ferruginin C and flavonoids such as Catechin and Quercetin, these compounds with phenolic characteristics were used as ligands to coordinate copper. The extracts showed good effectiveness against the tested free radicals DPPH and ABTS. The hydroalcoholic extracts of both species showed significant scavenging capacity against the two free radicals. The extract from *V. guianensis* ( $1412.1 \pm 7.7 \mu\text{M ET}$ ) was more effective against DPPH than the extract from the species of *V. cayennensis* ( $916.6 \pm 29.5 \mu\text{M ET}$ ). The same observation in determining the restriction of the ABTS radical (EVC:  $3001.5 \pm 74.24 \mu\text{M ET}$ ; EVG:  $3129 \pm 7.075 \mu\text{M ET}$ ), with the inhibitory concentration for this specific radical being much more expressive when compared to the other extracts organic. All extracts, at a concentration of  $20 \mu\text{g/ml}$ , were active against strains of *P. falciparum*, with the hexane extract of *V. guianensis* being more expressive for strain D10 (106.62%) and the hydroethanolic extract of *Vismia cayenensis* being the highest percentage for strain W2 (98.55). The metal complexes also demonstrated high antimalarial effectiveness, with the copper-quercetin sample (100.29%) being much more effective than quercetin in its free form (60.91%). Metals, such as copper, can be a good alternative for treating the disease.

Keywords: *Vismia* spp.; Malaria; Catechin; Quercetin; Metallic Complexes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura das laurenquinonas. A) Laurentiquinona A. B) Laurentiquinona B. Laurentiquinona C.. .....	11
<b>Figura 2:</b> <i>Vismia guianensis</i> .....	12
<b>Figura 3:</b> Estrutura das benzofenonas e benzocumarinas isoladas por Seo e colaboradores (2000) do extrato clorofórmico de <i>V. guianensis</i> . A)-E) vismiaguianonas. F) – G) vismiaguininas.. .....	13
<b>Figura 4:</b> <i>Vismia cayennensis</i> . .....	14
<b>Figura 5:</b> Panorama do número de casos autóctones de Malária entre os anos de 2003 e 2022. ....	16
<b>Figura 6:</b> Exsiccatas A) <i>V. cayennensis</i> . B) <i>V. guianensis</i> .....	23
<b>Figura 7:</b> Frutos de A) <i>Vismia cayennensis</i> . B) <i>Vismia guianensis</i> .....	23
<b>Figura 8:</b> Ferruginina A. ....	29
<b>Figura 9:</b> Vitexina. ....	31
<b>Figura 10:</b> Estrutura dos constituintes químicos identificados por ESI-MS. (A) Catequina. (B) Isovismiafenona B. (C) Harunganol B. (D) Derivado de Clusiafenona. (E) Quercetina. (F) Ácido quínico. (G) Vismiafenona D. ....	29
<b>Figura 11:</b> núcleo básico das subclasses das quinonas. A) Antraquinona; B) Benzoquinona; C) Naftoquinona.....	29
<b>Figura 12:</b> Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cobre-Q.....	53
<b>Figura 13:</b> Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cobre-C....	54
<b>ANEXOS:</b> .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Rendimento dos extratos brutos .....	28
<b>Tabela 2:</b> Dados de RMN de H <sup>1</sup> (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> ) para fração FR2-EVC 73-77, comparados com valores descritos na literatura para Ferruginina A.....	30
<b>Tabela 3:</b> Dados de RMN de H <sup>1</sup> (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> ) para fração FR2-EVG 1, comparados com valores descritos na literatura para Vitexina.. ..	32
<b>Tabela 4:</b> Quantificação da atividade antioxidante métodos de DPPH• e ABTS+ e fenóis totais. ....	34
<b>Tabela 5:</b> valores determinados da concentração citotóxica dos extratos de <i>Vismia</i> spp. ....	37
<b>Tabela 6:</b> valores determinados da concentração citotóxica dos extratos de <i>Vismia</i> spp.....	39
<b>Tabela 7:</b> Atividade antiparasitária dos extratos de <i>Vismia</i> spp. frente as cepas D10 (sensível a cloroquina) e W2 (sensível a cloroquina) dos ensaios de triagem inicial (20µg/ml) e determinação do IC <sub>50</sub> (ng/ml). ....	40
<b>Tabela 8:</b> Valor TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao TROLOX) pelo método DPPH• e ABTS <sup>+</sup> para os flavonoides Quercetina e Catequina nas formas livres e complexadas com Cobre (II) .....	54
<b>Tabela 9:</b> Citotoxicidade frente a J774 cell line. ....	56
<b>Tabela 10:</b> Atividade inibitória frente cepas de <i>P. falciparum</i> , D10 (sensível a CQ) e W2 (resistente a CQ) .....	56

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	8
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	10
Família Hypericaceae .....	10
Gênero <i>Vismia</i> .....	10
<i>Vismia guianensis</i> .....	11
<i>Vismia cayennensis</i> .....	12
Malária .....	14
<b>Compostos De Coordenação Com Ligantes De Produtos Naturais .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>Objetivo Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS EXTRATOS .....</b>	<b>20</b>
Caracterização química de extratos de <i>Vismia</i> spp. e avaliação do potencial antioxidante e antimalárico .....	20
RESUMO .....	20
INTRODUÇÃO .....	21
METODOLOGIA .....	22
<b>Coleta Do Material Botânico e Frutos para preparação dos Extratos .....</b>	<b>23</b>
Preparação Do Extrato Hidroetanólico a 70% .....	23
Preparação dos Extratos Orgânicos de diferentes polaridades .....	24
Condições para Análises Químicas .....	24
Separações cromatográficas .....	24
Espectrometria de massas (ESI/MS) .....	25
Avaliação da atividade antioxidante frente aos radicais de DPPH e ABTS .....	25
Determinação do teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) .....	26
Ensaio de citotóxicidade em células de mamífero .....	26

Ensaio da Atividade antimalárica frente a cepas de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	27
RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	28
Rendimento dos extratos dos frutos das espécies .....	28
Análise Química .....	29
Caracterização estrutural FR2-EVC 73-77 .....	29
Caracterização estrutural FR2-EVC 73-77 .....	29
Identificação química por APCI-MS .....	31
Atividade Antioxidante .....	34
Ensaio de Citotoxicidade .....	37
Atividade Antimalárica .....	37
CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS .....	40
<b>CAPÍTULO 2: COMPLEXOS METÁLICOS</b> .....	<b>41</b>
Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos metálicos com ligantes fenólicos.....	41
RESUMO .....	41
INTRODUÇÃO .....	42
METODOLOGIA.....	44
Obtenção Dos Compostos De Coordenação .....	44
Ultravioleta-visível .....	44
Avaliação da atividade antioxidante frente aos radicais de DPPH• e ABTS <sup>+</sup> .....	44
Ensaio da Atividade antimalárica frente a cepas de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	45
Ensaio de citotóxicidade em células de mamífero .....	46
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
Caracterização dos compostos de Coordenação .....	47
Atividade Antioxidante .....	49

Ensaio de Citotoxicidade .....	50
Atividade Antimalária .....	51
CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS .....	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS .....	64
ANEXOS.....	69

## INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o homem depende da natureza para sobreviver e suprir suas necessidades básicas como alimentação, vestimenta e tratamento de enfermidades. No tratamento de doenças, a origem do conhecimento está no uso de plantas medicinais, estes conhecimentos populares são repassados através das gerações e auxiliam no direcionamento para estudos medicinais, que podem inclusive contribuir na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (Almeida, 2011).

Grande parte da população brasileira utiliza as plantas como única ou principal fonte terapêutica. Dentre os fatores que influenciam essa prática estão o elevado custo de medicamentos, bem como a carência econômica de diversas famílias brasileiras, isso contribui para a utilização das informações sobre a terapêutica dessas plantas que são acumuladas por séculos (Argenta, *et al* 2011).

Nesse contexto, as espécies dessas plantas utilizadas como fonte de tratamento para diversas enfermidades, tem se tornado objetos de estudo em vários países e vem se destacando na capacidade de se tornarem fontes para desenvolvimento de novos medicamentos. A ação farmacológica das plantas é compreendida pela existência de metabólitos que são capazes de desempenhar inúmeras atividades biológicas e exercem função fundamental frente ao processo de saúde-doença (Filho & Yunes, 1998; Phillipson, 2001).

Sabe-se que as plantas produzem metabólitos primários e secundários, sendo estes secundários classificados como especializados e diferente dos primários são altamente específicos e desenvolvem função importante na evolução dos vegetais e na interação com os seres vivos. Frequentemente são pertencentes a uma das principais classes que podem ser, nitrogenados, compostos fenólicos ou fenóis e terpenos. Esses compostos em geral estão atribuídos a proteção dos vegetais a estresses bióticos e também abióticos além de serem utilizados a nível comercial por indústrias de áreas farmacêuticas, bem como no emprego de corantes e aromas (Delbone & Lando, 2010; Raskin *et al.*, 2002).

Dentre as doenças tratadas popularmente com uso de plantas medicinais, encontram-se as parasitárias. Uma das patologias ocasionadas por parasita, comum no Brasil, é a malária onde aproximadamente 99% dos casos ocorrem na Amazônia, as condições socioeconômicas e ambientais são consideradas fatores cruciais para

contaminação. Uma vez que esses locais podem ser favoráveis a proliferação do mosquito transmissor do gênero *Anopheles*, vetor da doença (Reiners, *et al* 2010) causada, principalmente, pelo *Plasmodium vivax*, em cerca de 90% dos casos, (Silva, *et al* 2022) e pelo *Plasmodium falciparum*, que é considerado a espécie com maior índice de letalidade (Pujo, *et al.* 2021).

Além dos problemas já enfrentados para combater a doença, outra situação vem se destacando, que é a resistência aos fármacos disponíveis, tornando urgente a busca e descoberta de novas moléculas antimaláricas. Uma saída para esse problema, embora seja um grande desafio para os pesquisadores, é o estudo de plantas medicinais que mostra-se como uma estratégia promissora, pois fornece moléculas com potencial farmacológico (De Rycker *et al.*, 2018).

Dentre as inúmeras plantas estudadas, espécies do gênero *Vismia* comprovaram em alguns estudos uma expressiva atividade antimalárica de seus constituintes químicos, visto que a característica da estrutura dos antimaláricos já existentes se assemelham aos metabólitos predominantes encontrados nas plantas desse gênero (Ménan, 2006).

Diante do exposto, se faz necessário aprofundar nas pesquisas para avaliar o perfil químico dos exsudatos de espécies de *Vismia* com o intuito de isolar e identificar os constituintes majoritários, sendo esse um dos objetivos desse trabalho, além de avaliar o potencial antimalárico frente a cepas do *Plasmodium falciparum*. Em vista da necessidade de novas alternativas para combate de cepas resistentes, nessa pesquisa, foram sintetizados compostos de coordenação a partir das substâncias identificadas em *Vismia* spp. e com isso, foi possível avaliar o efeito sinérgico do centro metálico e das substâncias utilizadas como ligantes frente a atividade antimalárica.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### Família Hypericaceae

As plantas da família Hypericaceae foram por muito tempo incluídas na família Clusiaceae, no entanto através de estudos filogenéticos foi comprovado que estas faziam parte de uma família independente e de um grupo monofilético (Gustafsson *et al.* 2002; Ruhfel *et al.* 2011, 2016; APG IV 2016).

Essa família possui vasta distribuição, e inicialmente nove gêneros foram atribuídos sendo eles, *Cratoxylum* Blume, *Eliea* Cambess, *Harungana* Lamarck, *Hypericum* L., *Lianthus* N. Robson, *Santomasia* N. Robson, *Thornea* Breedlove & McClintock, *Triadenum* Rafinesque e *Vismia* Vand.. No entanto, posteriormente os gêneros *Lianthus*, *Santomasia*, *Thornea* e *Triadenum* passaram a ser enquadrados no gênero *Hypericum* (Robson, 2016; Robson 1977, 1981).

Em território brasileiro dois gêneros são frequentes, *Hypericum* L, com 24 espécies e tendo maior distribuição na região Sul do país, e *Vismia* Vand. com 30 espécies que ocorrem em maior frequência na Região Amazônica (Vogel Ely *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2018).

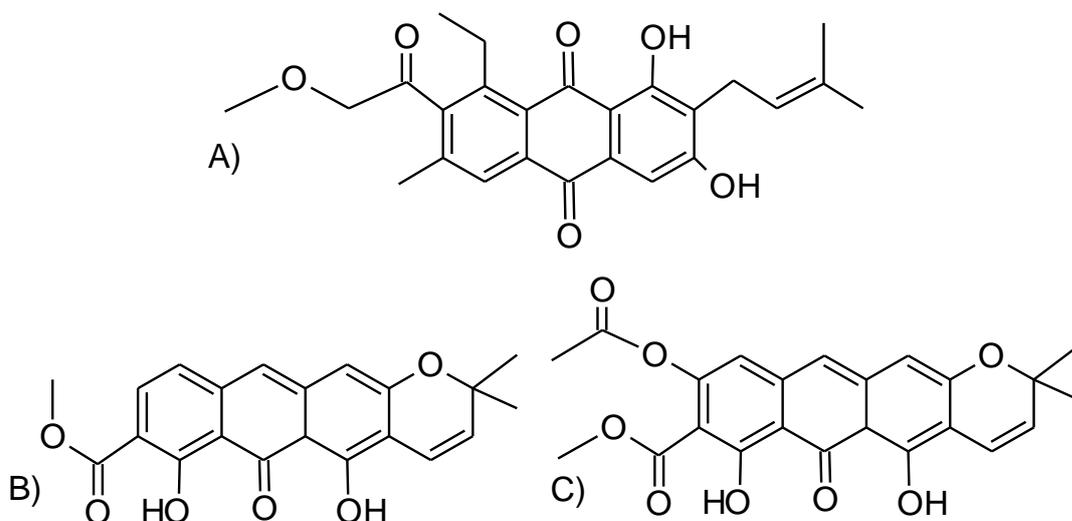
### Gênero *Vismia*

As plantas da família Hypericaceae, da qual o gênero *Vismia* é pertencente, são muito conhecidas na medicina popular com ampla variedade de uso. As espécies desse gênero têm sido utilizadas no tratamento de inúmeras condições patológicas, como em feridas, ulcerações, afecções de pele, herpes, purgante, dentre outras. As partes utilizadas pelos populares geralmente são as folhas e o caule (Alvarez, *et al* 2008).

As árvores ou arvoretas das espécies desse gênero apresentam-se com base do tronco reta, folhas com pilosidade ferrugínea que apresentam coloração verde na região superior diferentemente da região inferior, que é caracterizada pela coloração marrom, possuem também látex alaranjado, e normalmente ocorrem em vegetações típicas de capoeira e também nas bordas de matas (Ribeiro *et al.*, 1999).

Dos metabólitos presentes em espécies do gênero *Vismia*, são enfatizados as quinonas e terpenos sendo apontados como marcadores químicos para esse gênero (Tala *et al.*, 2013; Vizcaya *et al.*, 2012), outras classes também podem ainda ser destacadas, como os antranoides prenilados, biantraquinonas, benzofenonas, xantonas, flavonoides, flavonóis, lignanas e substâncias voláteis (Pedroza, 2019).

Para estes metabólitos diversas atividades biológicas já foram comprovadas, dentre estes vale ressaltar o estudo realizado por François, *et al* (1999) em que foi observado o potencial antimalárico de uma antraquinona isolada do extrato éter de petróleo das folhas da espécie *V. guineenses*, o metabólito foi identificado como sendo a vismiona H e apresentou ser potente antimalárico frente ao *Plasmodium falciparum*. Em um outro estudo, realizado por Nougoué, *et al* (2008) foi observada a atividade antimalárica das laurentiquinonas isoladas da espécie *V. laurentii*, as quais foram denominadas Laurentiquinona A, B e C (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura das laurenquinonas. A) Laurentiquinona A. B) Laurentiquinona B. Laurentiquinona C.

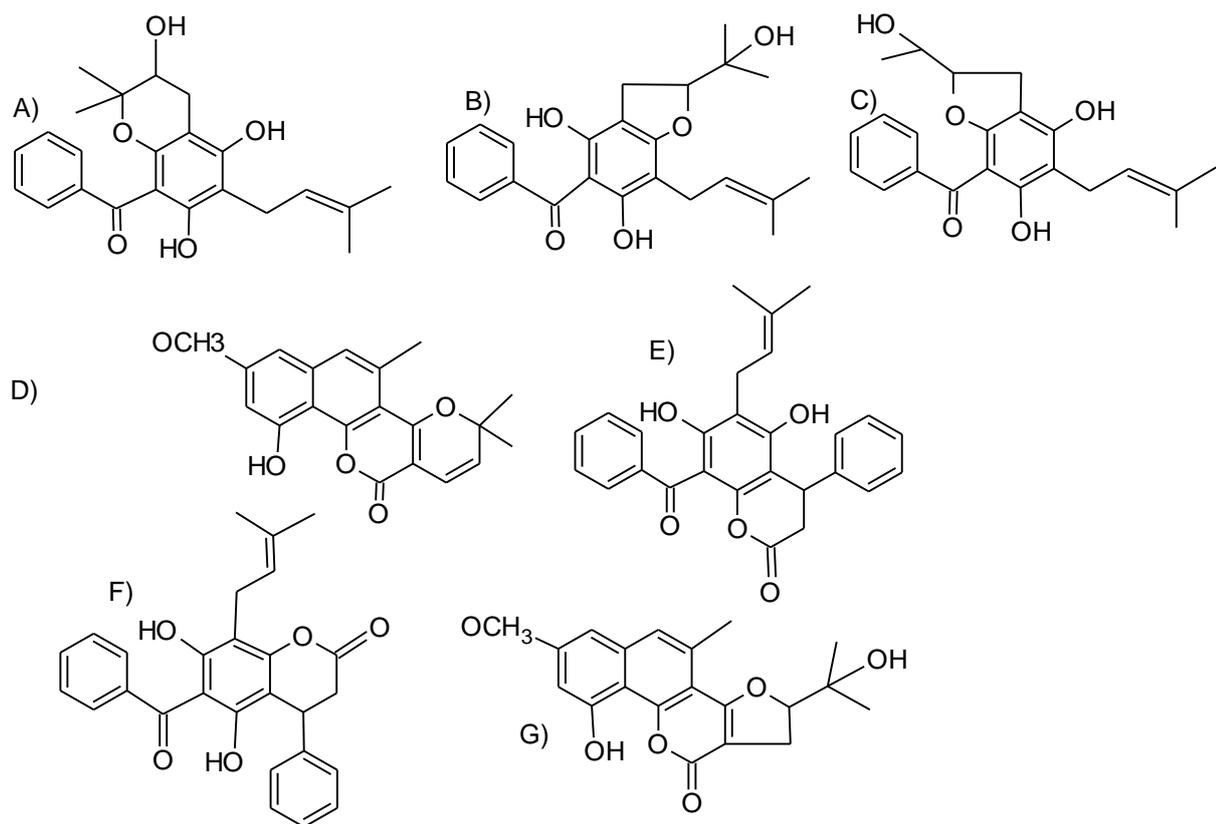
### *Vismia guianensis*

Conhecida popularmente como “lacre” ou “pau-de-lacre”, *Vismia guianensis* (Figura 2) é uma espécie de característica lenhosa, que pode atingir de 2 a 5 metros, nativa da América do Sul e muito comum na região Amazônica (Reichard, 1878; Ewan, 1962). Essa planta apresenta na casca do caule uma resina de cor laranja, que é utilizado popularmente no tratamento de doenças de pele. Das folhas e caule são preparadas infusões para o tratamento de reumatismos, podendo também ser utilizados como febrífugo (Albuquerque, 1980; Almeida, 1993).



**Figura 2:** *Vismia guianensis*

Nesta espécie também foram encontrados metabólitos característicos do gênero, sendo alguns dos identificados catequina e procianidinas, também foram isoladas quinonas, xantonas, benzofenonas, antronas, diantronas, e flavonoides gerais (Lins *et al*, 2016). Seo e colaboradores (2000) isolaram cinco benzofenonas do extrato clorofórmico das raízes da espécie, estas benzofenonas foram sendo identificadas como: vismiaguianonas A – E, além destas substâncias também foram identificadas duas benzocumarinas, as vismiaguianinas A e B, as vismiaguianonas exibiram atividade de cisão de fita do DNA e as vismiaguininas foram significativamente citotóxicas.



**Figura 3:** Estrutura das benzofenonas e benzocumarinas isoladas por Seo e colaboradores (2000) do extrato clorofórmico de *V. guianensis*. A)-E) vismiaguianonas. F) – G) vismiaguininas.

Em outros trabalhos foi possível identificar o isolamento de metabólitos da espécie com expressivas atividades biológicas, Pasqua e colaboradores (1995), por exemplo, isolaram a vismiona e neste mesmo trabalho os autores comprovaram o potencial citotóxico da substância contra as linhagens celulares de carcinoma de ovário e melanocarcinoma.

Dentre as atividades expressivas e de grande interesse para área médica, cabe ressaltar a atividade do extrato aquoso da *V. guianensis* contra a linhagem celular de câncer de cólon, que apresentou 100% de letalidade na concentração de 100 µg/mL (Suffredini *et al*, 2007).

Em estudo de Oliveira, *et al* (2017) que objetivou investigar a atividade antifúngica do extrato etanólico de folhas e casca de *V. guianensis* contra *Sporothrix schenckii* ATCC 16345 e suas atividades antiinflamatórias, foram detectados dois O-glucosil-flavonóides e 16 derivados prenilados de benzofenona, nesse estudo foi

apresentado significativa atividade contra *S. schenckii* ressaltando o benefício do uso desses extratos para o tratamento alternativo da esporotricose.

### ***Vismia cayennensis***

*Vismia cayennensis* (Figura 4) é uma espécie de característica arbustivo-arbóreo, com cerca de 2 m de altura já frutificando, podendo atingir até cerca de 6 metros de altura. Sua ocorrência se dá em áreas abertas, chamadas capoeiras, como clareiras e beira de mata, ao longo de trilhas e estradas (Marinho & Vasconcellos, 1994).



**Figura 4:** *Vismia cayennensis*

Esta planta apresenta uma grande variedade de substâncias bioativas, muitas com comprovada ação farmacológica (Marin, *et al* 2017). Dentre os estudos já realizados sobre a espécie nesse sentido, pode ser citado por exemplo, o trabalho realizado por Fuller, *et al* (1999), que foi realizado o isolamento de quatro novas benzofenonas preniladas dos extratos das folhas de *V. cayennensis*, estas substâncias identificadas como vismiafenonas D – G, foram avaliadas quanto a seu potencial anti-HIV, sendo possível comprovar a atividade inibidora do HIV da vismiafenona D.

A espécie também apresentou potente atividade antibacteriana, nos estudos realizados por Bauer e colaboradores (1966) com o extrato da casca, em que foi observada significativa inibição dos microorganismos *Escherichia coli*, *Shigella sp* e *Staphylococcus aureus*, no mesmo estudo as frações clorofórmio, acetona e aquosa apresentaram moderadamente atividade contra a cepa de *Shigella sp*. Em outro trabalho realizado por Choi e colaboradores (2004) foi observada a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico e da fração clorofórmica.

Diel, *et al* (2024) isolaram a fisiona do extrato hexânico dos frutos de *V. cayennensis* e avaliaram frente a cepas do *L. amazonensis*, apresentando boa atividade inibitória. Sendo atribuída essa a atividade aos metabólitos identificados na espécie.

Como descrito, esta é uma espécie com comprovadas ações biológicas. Dos estudos realizados com espécies do gênero *Vismia*, já foram observadas a atividade antiplasmódica de substâncias isoladas de espécies do gênero, porém nenhum estudo sobre a atividade antimalárica de compostos isolados de *V. cayennensis* e *V. guianensis* foi realizado até o momento.

### **Malária**

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa podendo apresentar evolução crônica, com manifestações de caráter agudo, que acomete milhões de pessoas no mundo, sendo considerada uma doença grave e muito complexa (Silva, 2014; Silva, 2019). É causada por protozoários, que são transmitidos pela fêmea infectada do mosquito *Anopholes*. Dentre as espécies associadas a malária humana ressalta-se *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (Santos, 2019).

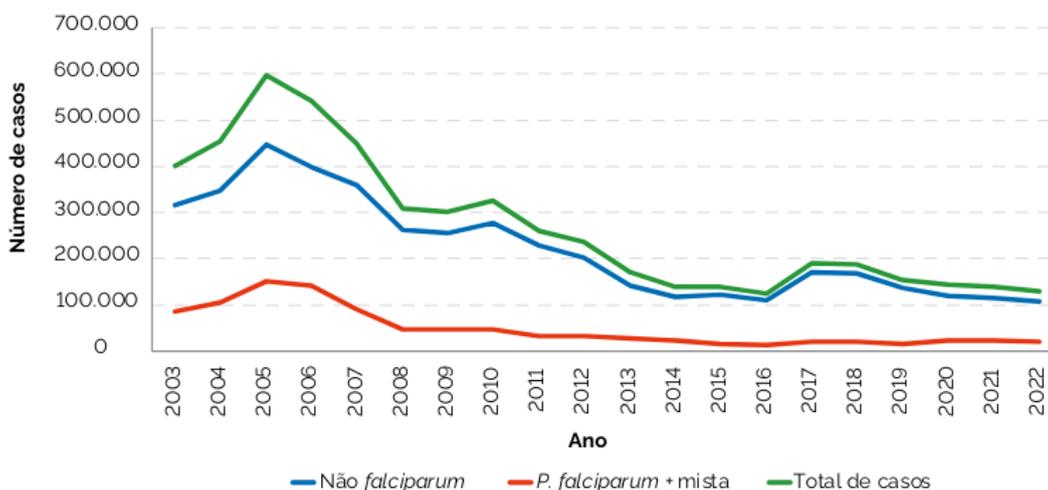
A infecção se inicia com a inoculação dos esporozoítos, que em seguida podem entrar em células hospedeiras e não se desenvolverem a princípio, até que estes infectem um hepatócito. Após essa infecção do hepatócito, ocorre a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos pré-eritrocíticos. Seguidamente acontece a multiplicação assexuada que origina os esquizontes teciduais e posteriormente merozoítos. Estes podem ocupar os eritrócitos se iniciando o ciclo eritrocítico. A multiplicação do merozoíto se dá por esquizogonia promovendo novos merozoítos infectantes. Estes podem ainda se diferenciar em gametócitos (David, 2009; Brasil, 2009).

Em um estudo epidemiológico realizado por Santa Rosa e colaboradores (2020), entre os anos de 2010 e 2019, foi verificado o registro de 7136 casos nesse período,

relatando o predomínio da infecção por *Plasmodium vivax*, seguida pelo *P. falciparum*, nesse mesmo estudo foi descrito a tendência decrescente de casos entre 2010 e 2017, com pico em 2018 e decréscimo em 2019. Ressaltando que embora durante esse período tenha ocorrido progressos quanto ao controle, observa-se ainda o grande número de casos, que demonstram a necessidade de melhoria no controle da doença no Brasil (Santa Rosa, 2020).

De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (2024), em 2022 foram notificados no Brasil 131.224 casos da doença no Brasil, sendo que desse número, 1,7% foram importados de outros países vizinhos como Peru, Venezuela, Bolívia e Guiana. Neste boletim, ressalta-se ainda que a espécie *Plasmodium vivax* foi mais requente, sendo responsável por 84,2% (108.594) dos casos autóctones (locais prováveis de contaminação). Em dados E-SUS-VS atualizados Agosto em 2023, é possível observar o histórico de casos distribuídos no país entre 2003 e 2022 (Figura 5).

**Figura 5:** Panorama do número de casos autóctones de Malária entre os anos de 2003 e 2022.



**Fonte:** Sivep-Malária/SVSA/MS, Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS.

O controle tem se tornado cada vez mais complexo dada a dispersão de cepas multi-resistentes de *Plasmodium* spp., visto que nos últimos anos a resistência do *P. falciparum* aos derivados da artemisinina já tem sido detectada com frequência em países da Ásia (França, 2008). Quanto ao *Plasmodium vivax*, espécie mais frequente no Brasil, já tem sido registrado falhas terapêuticas após tratamentos com Cloroquina e Primaquina, que são as drogas usadas como esquema terapêutico recomendado, fator preocupante

visto que a Primaquina é a única droga comercialmente disponível para atuar contra hipnozoítos prevenindo recaídas (Rodrigues, 2020).

O efeito hipnozoiticida e a eficácia da Primaquina dependem da ativação metabólica pela enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6). Estudos recentes sugerem que a função reduzida de CYP2D6, causada por polimorfismos na enzima, leva à falha terapêutica da Primaquina (Silvino, 2019).

Diante desse cenário de registros de resistência a drogas do *Plasmodium*, impacta a necessidade da busca de novas alternativas para o tratamento, principalmente no desenvolvimento de novas substâncias que sejam eficazes na cura dessa patologia que é muito recorrente, principalmente na região amazônica.

### **Compostos De Coordenação Com Ligantes De Produtos Naturais**

Certos compostos orgânicos originados da natureza são de grande interesse para aplicação na área médica, devido suas inúmeras atividades biológicas, como antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antitumoral, entre outras. Devido a suas atividades podem se destacar possibilitando a ação como ligantes em compostos de coordenação (MORALLES, 2017).

Os compostos de coordenação ou complexos metálicos referem-se a um átomo ou íon metálico rodeado por um conjunto de ligantes. Após descoberta das aplicações como agente antitumoral da cisplatina, tem se reconhecido que esses compostos possuem propriedades químicas singulares e que a reatividade dos centros metálicos frente a biomoléculas alvo pode ser direcionada através da escolha adequada dos ligantes, como também que os efeitos tóxicos que muitos metais exibem podem ser contornados com o uso de estratégias específicas (Beraldo & Gambino, 2004).

Várias estratégias têm sido utilizadas para se aplicar compostos metálicos no tratamento de doenças parasitárias. Dentre estas, a complexação de moléculas (ligantes) com atividade antiparasitária conhecida a um metal para modular a atividade, considerando que uma considerável mudança nas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas é observada entre o ligante e o seu complexo metálico, outra alternativa é o desenvolvimento de novos ligantes contendo grupos farmacofóricos antiparasitários conhecidos e posterior complexação a centros metálicos farmacologicamente ativos. A ferroquina, um antimalárico, foi sintetizada utilizando a estratégia de modificar

estruturalmente a molécula de cloroquina mas de uma forma que que não alterasse a estrutura básica da molécula, utilizando como fragmento o ferroceno (Gonçalves, 2016).

Li e colaboradores (2007) mostraram que complexos metálicos de Cu(II), Ni(II) e Zn(II) contendo os ligantes Hesperetina e Naringenina exibiram melhores atividades antioxidantes e anticâncer melhores que os flavonoides livres. Ainda nesse trabalho, o complexo de Cu(II)-Naringenina possuiu atividade antioxidante melhor do que os antioxidantes padrão como vitamina C e manitol. O complexo de La(III) e Naringenina apresentou atividade cancerígena contra a linha celular A-549 melhor quando comparado com o fármaco (WANG *et al*, 2006; Li *et al*, 2008).

## **OBJETIVO GERAL**

Síntese e caracterização de compostos coordenação de Cu (II) contendo compostos isolados dos frutos de *Vismia guianensis* e *Vismia cayennensis* e a avaliação destes quanto à capacidade antioxidante pelos métodos do radical livre DPPH• e ABTS<sup>+</sup> bem como quantificar o teor de compostos fenólicos totais, além de avaliar a atividade antimalárica *in vitro*.

## **Objetivos Específicos**

### **Capítulo 1**

- Isolar os constituintes majoritários nos extratos de *Vismia guianensis* e *Vismia cayennensis* através das técnicas de cromatografia.
- Elucidar as substâncias isoladas através das técnicas de MS/MS e RMN de <sup>1</sup>H,
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos orgânicos pelos métodos do radical livre DPPH• e ABTS<sup>+</sup>.
- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais nos extratos brutos;
- Avaliar o potencial Antimalárico frente a cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes a cloroquina.

### **Capítulo 2**

- Utilizar os padrões dos flavonoides catequina e quercetina para sintetizar e caracterizar os complexos metálicos de cobre (II);
- Avaliar a atividade antioxidante dos complexos pelos métodos do radical livre DPPH• e ABTS<sup>+</sup>.
- Avaliar o potencial Antimalárico frente a cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes a cloroquina.

## CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS EXTRATOS

### Caracterização química de extratos de *Vismia* spp. e avaliação do potencial antioxidante e antimalárico.

Rafaela Rolim da Silva<sup>1</sup>, Ivina Thayná Miranda Trindade<sup>1</sup>, Josiele Viana Gomes<sup>1</sup>,  
Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira<sup>2</sup>, Paulo José de Sousa Maia<sup>3</sup>, Dominique  
Fernandes de Moura Do Carmo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas, <sup>2</sup>Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz/Bahia),<sup>3</sup>  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Macaé, RJ, Brasil.

#### Resumo

As plantas do gênero *Vismia*, são muito conhecidas na medicina popular pela ampla aplicação farmacológica entre as comunidades ribeiras e indígenas da região amazônica. Nesta região, são frequentemente encontradas as espécies *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. e *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Dessa forma o presente estudo realizou análises químicas para o isolamento e identificação química dos constituintes presentes nos frutos das espécies supracitadas, bem como avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos e o teor de fenóis totais, além de testar a capacidade de inibir cepas plasmodiais sensíveis a cloroquina (D10) e resistente (W2). Nas análises químicas foram utilizadas técnicas de cromatografia em coluna e os constituintes isolados foram identificados através da espectrometria de massas por ionização de APCI (APCI-MS), no modo positivo e negativo, e RMN <sup>1</sup>H. A atividade antioxidante foi testada frente aos radicais DPPH• e ABTS+ utilizando o Trolox como padrão. O teor de fenóis totais foi determinado por meio de técnica espectrométrica utilizando reagente de Folin-Ciocalteu e a curva padrão foi descrita, utilizando ácido gálico como padrão e a quantificação de fenóis foi dada em Equivalentes de ácido gálico (EAG). Para a avaliação da atividade antimalárica, foi realizado o ensaio de citotoxicidade, utilizando células de murinos e a atividade antiplasmodial foi determinada utilizando a cloroquina como padrão. Dos resultados obtidos, foram isolados e identificados a Antraquinona Ferruginina A e o flavonoide glicosilado Vitexina, encontrado pela primeira vez nas espécies estudadas. Além dos flavonoides Catequina e Quercetina. Em relação as atividades antioxidantes, todos os extratos apresentaram atividade sequestrante frente aos radicais testados, sendo que os hidroetanólicos foram os mais eficientes, resultado que foi corroborado pela alta presença de fenóis totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu. Na avaliação antiparasitária, todos extratos foram ativos, sendo o hexânico de *Vismia guianensis* o mais expressivo para ambas cepas, frente a D10 obteve-se 106,62% de inibição (IC<sub>50</sub> 7,02 ± 1,259 ng/ml) e para a W2 observou-se 99,56% de inibição (IC<sub>50</sub> 4,90 ± 0,247 ng/ml), excelente resultado uma vez que este extrato apresentou Concentração Citotóxica (CC<sub>50</sub>) 22.2 ± 0.63 ng/ml, ou seja, o IC<sub>50</sub> foi muito abaixo da concentração tóxica. Esses resultados reforçam que as espécies possuem constituintes capazes de inibir o crescimento plasmodial, por meio das reações oxidativas contra o parasita, o que classifica estas espécies como sendo possíveis fontes de novas substâncias antimaláricas, sendo necessário aprofundar estudos.

Palavras chaves: Malária; *Vismia cayennensis*; *Vismia guianensis*.

## Abstract

Plants of the genus *Vismia* are well known in popular medicine with a wide variety of uses. In the Amazon region, the species *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. and *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Therefore, the present study sought the isolation and chemical identification of compounds from these species, as well as evaluating the antioxidant potential of the crude extracts and the total phenol content, in addition to testing the ability to inhibit plasmodial strains sensitive to chloroquine (D10) and resistant (W2). The isolation of the constituents occurred using chromatography techniques and identification through mass spectrometry and <sup>1</sup>H NMR. The antioxidant activity was tested against DPPH and ABTS radicals using Trolox as a standard, the total phenol content was determined using a spectrometric technique using Folin-Ciocalteu reagent and The standard curve was described, using gallic acid as a standard, and the Quantification of phenols was given in Gallic acid equivalents (GAE). The cytotoxicity assay was performed using murine cells and antiplasmodial activity was determined using chloroquine as a standard. Anthraquinones such as Isovismiofenone D, Hanrunganol B, Vismiafenone D and Ferruginin A were identified, in addition to the flavonoids Catechin and Quercetin and quinic acid. All extracts showed scavenging activity against the radicals tested, with the hydroethanol extracts being the most efficient, a result that was corroborated by the high presence of total phenols determined by the Folin-Ciocalteu method. In the antiparasitic evaluation, all extracts were active, with hexane from *Vismia guianensis* being the most significant for both strains D10: 106.62% (IC<sub>50</sub> 7.02 ± 1.259 ng/ml) and W2: 99.56% (IC<sub>50</sub> 4.90 ± 0.247 ng/ml), an excellent result since this extract presented a CC<sub>50</sub> of 22.2 ± 0.63 ng/ml, that is, the IC<sub>50</sub> was well below the toxic concentration. These results reinforce that the species have constituents capable of inhibiting plasmodial growth, through oxidative reactions against the parasite, which classifies these species as possible sources of new antimalarial substances, requiring further studies.

Keywords: Malaria; *Vismia cayennensis*; *Vismia guianensis*.

## INTRODUÇÃO

Doenças que atingem em grande proporção populações em situação de vulnerabilidade são chamadas de doenças negligenciadas. Essas patologias são caracterizadas por apresentarem muitas falhas no diagnóstico e em seus tratamentos terapêuticos, e um dos motivos é pela falta de investimento em estudos que busquem a melhoria dessas deficiências existentes (Neto, 2022). A malária, embora não seja classificada nesse grupo pela Organização Mundial da Saúde, é uma doença que causa bastante problemas de saúde pública por apresentar essas lacunas no tratamento (Ashley, *et al* 2018).

No Brasil, a Região Amazônica é a que apresenta maior incidência de casos. Sendo causada, principalmente, pelo *Plasmodium vivax*, em cerca de 90% dos casos,

(Silva, *et al* 2022) e pelo *Plasmodium falciparum*, que é considerado a espécie com maior índice de letalidade (Pujo, *et al.* 2021).

Além dos problemas já enfrentados para combater a doença, outra situação vem se destacando, que é a resistência aos fármacos disponíveis, tornando urgente a busca e descoberta de novas moléculas antimaláricas. Uma saída para esse problema, embora seja um grande desafio para os pesquisadores, é o estudo de plantas medicinais, que se mostram como uma estratégia promissora, pois fornece moléculas com potencial farmacológico (De Rycker *et al.*, 2018).

Newmann & Cragg (2020) descrevem que cerca de um pouco mais de 20% de medicamentos são originados indiretamente de produtos naturais, e ainda nos últimos anos mais de 33% são originados diretamente de produtos naturais, ou seja, a ideia de investir em pesquisas dessa natureza podem ser uma saída para desenvolvimento de novos compostos com finalidade de combater a resistência desses parasitas responsáveis pelos agravos da doença.

Dentre as inúmeras plantas estudadas, as espécies do gênero *Vismia* comprovaram uma expressiva atividade antimalárica de seus constituintes químicos, visto que a característica da estrutura dos antimaláricos já existentes se assemelham aos metabólitos predominantes encontrados nas plantas desse gênero (Ménan, 2006).

Dessa forma o presente estudo buscou o isolamento e identificação química de compostos de espécies de *V. cayennensis* e *V. guianensis*, bem como avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos e o teor de fenóis totais, além de testar a capacidade de inibir as cepas de *P. falciparum* sensíveis a cloroquina (D10) e resistente (W2). Sendo possível a identificação química de antraquinonas e flavonoides, e na avaliação biológica foi observado excelente atividade antioxidante de todos os extratos de ambas as espécies e na avaliação antiplasmodial os extratos de ambas espécies foram ativos.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta Do Material Botânico e Frutos para preparação dos Extratos**

As espécies *V. cayennensis* e *V. guianensis* foram coletadas em área de capoeira em terra-firme no campus II da UFAM-ICET em Itacoatiara-AM, sob as coordenadas 03°05'39.8"S 058°27'44.7"W e 03°05'39.8"S 058°27'43.8"W, respectivamente. Os ramos

férteis foram herborizados e as exsicatas depositadas no Herbário da UEA-CESIT com as numerações 4384 para *V. cayennensis* e 4385 da *V. guianensis* (**Figura 6**).



**Figura 6:** exsicatas A) *V. cayennensis*. B) *V. guianensis*

Os frutos (**Figura 7**) para preparação dos extratos orgânicos e hidroetanólicos foram coletados também no município de Itacoatiara-AM, em regiões de capoeira do Bairro Novo Horizonte (-3.1251305 “S, -58.4396931” W)



**Figura 7:** Frutos de A) *Vismia cayennensis*. B) *Vismia guianensis*.

### **Preparação Do Extrato Hidroetanólico a 70%**

Os extratos brutos hidroetanólicos foram obtidos a partir dos frutos por maceração em etanol a 70% por sete dias, segundo a metodologia proposta por Oliveira, (2015), com adaptações. A preparação incluiu 64,228 g de frutos de *V. cayennensis* e 282,408 g de *V.*

*guianensis* em 500 mL de etanol a 70%, depositados em Erlenmeyer tampado com filme PVC. Após 48 horas, o material foi filtrado em coador de papel e posteriormente concentrado em evaporador rotatório (801 FISATOM) regulado para 40 RPM em 60°C, para extração do solvente. As soluções foram submetidas a liofilização.

Os extratos hidroalcoólicos de *V. cayennensis* (EVC: 4,0568 g) e *V. guianensis* (EVG: 11,2600 g) obtidos, foram acondicionados em frascos âmbar estéreis e congelados até o momento do uso.

Esta metodologia foi realizada com o objetivo de extrair compostos com caráter mais polar, considerando que as espécies apresentam alta concentração de compostos fenólicos e muitos destes são polares.

### **Preparação dos Extratos Orgânicos de diferentes polaridades**

Para obtenção dos extratos de diferentes polaridades, os frutos de *V. cayennensis* (78,78 g) e *V. guianensis* (196,78 g) foram submetidos ao processo de extração por maceração em Hexano (2x) e remaceração em Diclorometano (2x), Acetato de Etila (2x) e Metanol (2x) fornecendo soluções de cada solvente. A filtração foi realizada com algodão e as soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador, sendo obtidos os extratos brutos, que foram codificados considerando o nome da espécie e do solvente de extração: hexânico ( Vg-Hex; Vc-Hex), Diclorometano (Vg-Dic; Vc-Dic), Acetato de etila (Vg-Act; Vc-Act), Metanol ( Vg-Met; Vc-Met).

### **Condições para Análises Químicas**

#### *Separações cromatográficas*

As separações cromatográficas foram realizadas em Sílica-gel 60 (Merck) para cromatografia em coluna (CC). Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel Merck com espessura de 0,2 mm. No processo de revelação das placas cromatográficas foi utilizada câmara UV (ACS GOLD AG - DC - 02) em comprimento de onda variando de 250 a 366 nm. Recorreu-se também a revelação com NP-PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol).

Os extratos hidroetanólicos de *V. cayennensis* (2,1301 g) e *V. guianensis* (2,0021 g) foram fracionados por cromatografia em coluna (40x40 MM Vidrolabor) utilizando 135,62 g e 154,9009 g de sílica gel 60, respectivamente. Foram adicionados eluentes em

ordem crescente de polaridade, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, sendo obtidos 180 frações para amostra hidroalcoólica de *V. cayennensis* e 160 frações para o extrato da espécie *V. guianensis*.

#### *Refracionamento e Isolamento*

Das frações do extrato hidroetanólico de *V. cayennensis*, a fração codificada como FR1-EVC 73-77 quando avaliada por CCD e após revelação com NP-PEG, apresentou *spots* com absorções intensas no UV (comprimento de onda longo – 365 nm) de colorações amareladas e esverdeadas, por apresentar este perfil e bom rendimento (15,9 mg) foi submetida para purificação. O refracionamento desta fração, utilizando pipeta Pasteur (250 mm x 230 mm), 500 mg de sílica gel 60 como fase estacionária e os eluentes Hexano/Acetato de Etila/Metanol/Água nas proporções 2:3:2:3, originou três frações, sendo possível isolar a fração codificada como FR2-EVC 73-76 (6,6 mg).

Do fracionamento inicial do extrato hidroalcoólico de *V. guianensis* a fração FR1-EVG 49-52 com massa de 6,78 mg, quando submetida a análise por CCD no UV (365 nm) demonstrou coloração amarelo-esverdeada que ficou mais evidente quando reveladas com NP-PEG. A amostra foi então refracionada utilizando pipeta Pasteur (250 mm x 230 mm), 400 mg de sílica gel 60 como fase estacionária e os eluentes Hexano/Acetato de Etila/Metanol/Água nas proporções 2:3:2:3. Esse processamento originou duas frações e possibilitou o isolamento da FR2-EVG 1 (3,0mg).

Ambas amostras foram analisadas por espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear para elucidação estrutural.

#### **Espectrometria de massas (APCI/MS – ESI/MS) nos modos positivo e negativo**

A análise foi realizada na Central Analítica da UFAM-Manaus, e os espectros de massa foram obtidos a partir da injeção direta em espectrômetro de massa com ionização APCI ou ESI e analisador *ion trap* (modelo LCQ Fleet, Thermo Scientific), operando nos modos positivo e negativo usando coluna Luna 5 µm C18 (100 Å, 150 x 4,6 µm) com pré-coluna da mesma fase. A aquisição de dados foi realizada pelo software XCalibur® 2.0.7.

#### **Avaliação da atividade antioxidante frente aos radicais de DPPH• e ABTS+**

A determinação do potencial antioxidante foi dada a partir do contato dos extratos brutos com os radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS+). O ensaio com o radical livre DPPH• iniciou com a solubilização de 3,9 mg do radical em 100 mL de metanol, e as soluções dos extratos foram preparadas na concentração 0,1 mg /1 mL de metanol. Das amostras foram retirados 100µL (1mg/mL) e adicionados a 3,9 mL de solução de DPPH•, essa mistura foi deixada 30 minutos no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Medtherm) em 515 nm. A curva padrão foi obtida utilizando Trolox® como amostra padrão, em concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 µM.

A avaliação frente ao radical ABTS+ se deu com a obtenção inicial de uma mistura com 19,2 mg do radical em 5 ml de água e 9,46 mg de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) em 250µL de água. Para preparação da solução estoque, foi realizada uma mistura de 2,5 mL da solução de ABTS+ e 44 µL da solução de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, que permaneceu em repouso 16 horas no escuro. Para leitura das absorbâncias foi utilizado 30 µL de amostra ( 1mg/ml) em 3000 µL de solução de ABTS+, deixando 6 minutos no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Medtherm) em 734 nm. O padrão utilizado também foi utilizado Trolox® nas mesmas concentrações do ensaio de DPPH•.

### **Determinação do teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu)**

A quantificação de fenólicos totais foi realizada por meio de técnica espectrométrica utilizando reagente de Folin-Ciocalteu. Para esse ensaio foi adicionado 5 mL deste reagente em 45 mL de água. Dessa solução foi retirado 1,5 mL e acrescentados 200 µL de amostra (1mg/mL), solubilizadas anteriormente em metanol. Após 5 minutos, 1,5 mL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) foi adicionado e então foram aguardados 90 minutos no escuro para a obtenção das absorbâncias, em leitora de Microplaca (KASUAKI) a 725 nm. A curva padrão foi descrita utilizando ácido gálico, como padrão, e a quantificação de fenóis foi dada em Equivalentes de ácido gálico (EAG).

### **Ensaio de citotoxicidade em células de mamífero**

Os compostos foram testados quanto à citotoxicidade *in vitro* contra os macrófagos murinos das linhagens J774, e a viabilidade celular foi determinada por bioluminescência usando o CellTiter-Glokit (Promega, Madison, EUA).

A cultura foi mantida em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e suplementado com L-glutamina, vitaminas e aminoácidos em frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C, com o meio trocado duas vezes por semana. Células de 60 a 80% de culturas confluentes foram tripsinizadas, lavadas em meio completo e plaqueadas em 4×10<sup>4</sup> células por poço em 100 µL de meio completo em placas brancas de fundo plano de 96 poços por 24 horas a 37° C antes da adição dos compostos. Alíquotas triplicadas de compostos e medicamentos de referência (solução estoque em DMSO) cobrindo sete concentrações diferentes (100-1,56 µM) em diluições duplas foram adicionadas aos poços, e as placas foram incubadas por mais 72 horas. DMSO (veículo) como controles positivos e células. Após a incubação por 72 horas a 37°C, as placas foram mantidas em temperatura ambiente, o meio de cultura foi removido e 100 µL do CellTiter-Glokit foram adicionados a cada poço. 50 dados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes e analisados usando o GraphPad Prism (versão 5.01. SI) foi calculado usando o CC50 de células de mamíferos dividido pelo IC50 obtido em relação ao estágio sanguíneo assexuado do *P. falciparum* 3D7.

#### **Ensaio da Atividade antimalárica frente a cepas de *Plasmodium falciparum***

As amostras dos extratos foram dissolvidas em DMSO e depois diluídos com meio RPMI-1640 para atingir as concentrações necessárias (concentração final de DMSO <1%, que não é tóxica para o parasita). As amostras foram colocadas em microplacas de fundo plano de 96 poços em duplicata e sete diluições seriadas 1:2 foram realizadas diretamente na placa em um volume de 100 µL. Além disso, 100 µL de culturas assíncronas D10 (cepa sensível à cloroquina) ou W2 (cepa resistente à cloroquina) com parasitemia de 1–1,5% e 2% de hematócrito (1% final) foram adicionadas nas placas e incubadas por 72 h. A Cloroquina foi usada como referência. O crescimento do parasita foi determinado medindo a atividade da lactato desidrogenase do parasita (pLDH), de acordo com uma versão modificada do método de Makler *et al.*, (1993).

Ao final da incubação, as culturas foram cuidadosamente ressuspensas e alíquotas de 20 µL foram retiradas e adicionadas a 100 µL do reagente Malstat em uma microplaca de 96 poços. O reagente Malstat é composto de TritonX-100 a 0,125%, L-lactato 130 mM, tampão Tris 30 mM e APAD 0,62 µM. Após isso, 20 µL a 1,9 µM NBT (Nitro BlueTetrazolium) e 0,24 µM PES (fenazina etil sulfato) foram adicionados ao reagente Malstat. O NBT é reduzido a formazan azul e foi lido espectrofotometricamente (OD650),

como uma medida da atividade do pLDH, ou seja, da viabilidade do parasita. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade em comparação com os controles não tratados, calculado com a seguinte fórmula:  $100 \times ([\text{Leitura da amostra tratada} - \text{branco}] / [\text{Leitura da amostra não tratada} - \text{branco}])$ ; A leitura foi dado por densidade óptica. Como branco, foram utilizados eritrócitos não infectados. A porcentagem de viabilidade foi plotada em função das concentrações do fármaco e o ajuste da curva foi obtido por análise de regressão não linear utilizando um método logístico de quatro parâmetros (software Gen5 1.10 fornecido com o leitor Synergy4plate [Biotek]). A IC<sub>50</sub>, que é a dose capaz de induzir 50% de inibição da viabilidade do parasita, foi obtida por extrapolação.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Rendimento dos extratos dos frutos das espécies

O percentual de rendimento dos extratos da espécie *Vismia guianensis* teve variação de 1,15% a 1,58%, sendo a extração por diclorometano a que apresentou maior rendimento e metanol o menor (**tabela 1**).

Os extratos obtidos da espécie *V. cayennensis* apresentaram menor rendimento nas extrações por hexano (0,74%) e Acetato de etila (0,78%), em contrapartida, com metanol, solvente de maior polaridade utilizado, obteve maior percentual de extrativo (1,89%).

**Tabela 1:** Rendimento dos extratos brutos

Espécie	Solvente	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>V. guianensis</i>	Hexano	Vg-Hex	21,4124	1,23
	Diclorometano	Vg-Dic	9,1792	1,58
	Acetato de Etila	Vg-Act	2,6202	1,33
	Metanol	Vg- Met	2,2807	1,15
	Hexano	Vc-Hex	0,5847	0,74

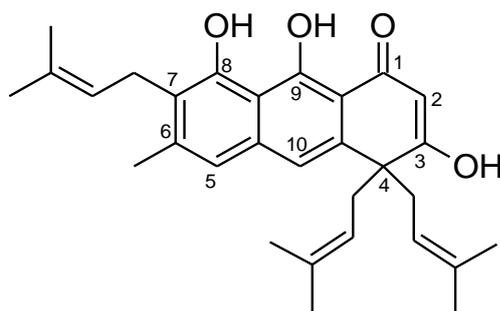
V.	Diclorometano	Vc-Dic	1,2486	1,58
<i>cayennensis</i>	Acetato de Etila	Vc-Act	0,6122	0,78
	Metanol	Vc- Met	1,4878	1,89

## Análise Química

### Caracterização estrutural FR2-EVC 73-77

O composto isolado, codificado como FR2-EVC 73-77, se apresentou em forma de um sólido de coloração alaranjada, o seu perfil químico por CCD revelou a presença de um único spot de coloração verde intensa, quando observado no maior comprimento de onda (365 nm) e utilizando NP-PEG como revelador. No espectro de massas, modo negativo, ESI [M-H]<sup>-</sup>, foi observado um pico em *m/z* 459 (m.e 460,06), compatível com a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>, e as fragmentações *m/z* 441, 413, 402, 390.

Na avaliação do espectro de RMN-H<sup>1</sup> (**Tabela 2**), foi observada a presença de simpletos nas regiões δ 9,92 e 9,64, indicando a presença de grupos hidroxila quelado a carbonila, o sinal em δ 16,03 (s, 1H) sugere a presença de uma terceira hidroxila na estrutura. Na região de aromáticos, foi identificado cinco simpletos, sendo o sinal em δ 6.99 (d, J = 1.1 Hz) indicativo de substituintes na posição orto, sendo corroborado com o valor da constante de acoplamento. A presença do duplo dubleto em δ 4,74 indica que uma metila está ligada ao anel aromático. O simpleto em δ 3,50 refere-se a CH<sub>2</sub> na forma dicetona. Foi identificado a presença de grupos prenil em C4 e C7 na molécula através do multipletto em δ 2.48 – 2.41. Estes sinais, em comparação com dados da literatura, permitiram identificar o composto 3,8,9-trihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(hidroximetil)but-2-en-1-il)-6-metil-4,7-bis(3-metilbut-2-en-1 il)antracen-1(4H)-one) ou Ferruginina A (**Figura 8**), já isolado em espécie *Vismia cayennensis* e outras espécies do gênero (Delle, *et al*, 1979; Delle, *et al* 1980; Alvaréz *et al*, 2008; Neves, *et al* 2023).



**Figura 8:** Ferruginina A

**Tabela 2:** Dados de RMN de  $H^1$  (500 MHz, Clorofórmio-*d*) para fração FR2-EVC 73-77, comparados com valores descritos na literatura para Ferruginina A.

H	FR2-EVC 73-77		Ferruginina A	
	$\delta H$		$\delta H^*$	$\delta H^{**}$
1	–		–	–
2	5.82		5,77	–
3	3,50		3,60	–
4	–		–	–
5	6.99(d, J = 1.1 Hz)		7,02	7,01
6	4.74 (dd, J = 7.9, 6.6 Hz)		4,65	4,73
7	–		–	–
8	9.92		10,35	9,90; 9,63
9	16,03		17,75	16,65; 16,02
10	7,10		7,75	7,19
11	3.01 – 2.90 M			3.14 e 2.50 (4H, m, H-11 e H-11')
12	4.64		–	4,63

-C <sub>6</sub> - CH <sub>3</sub>	2.48 – 2.41 M	2,4	2.45 (3H, s, C6-CH <sub>3</sub> , H- 5)
-CH <sub>3</sub>	2.06 – 1.99 M	–	2.04 (3H, s)
-CH <sub>3</sub>	1.69 – 1.58 M	1,8	
-CH <sub>3</sub>	1.53	1,67	1,49
-CH <sub>3</sub>	1.48	1,43	1,47
-CH <sub>3</sub>	1.26		

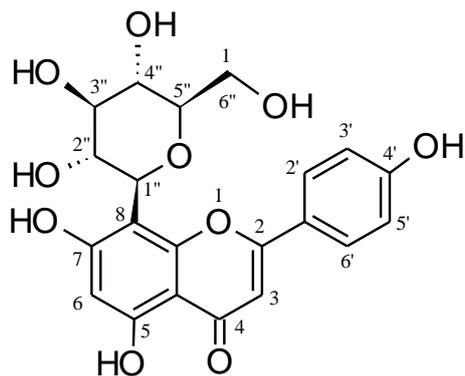
\* Delle, *et al*, 1979; \*\* Lopes, *et al* 2023.

#### Caracterização Estrutural FRI-EVG 1

A fração codificada como *FRI-EVG 1* apresentou-se na forma de cristais amarelados. O espectro de massas, obtido no modo positivo, detectou o íon molecular  $m/z$  433 (m.e 432) que sugere ser correspondente com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>. No padrão de fragmentação se teve os picos  $m/z$  401, 391, 389, 331, 264 e 143.

Analisando o espectro de Hidrogênio foram observados sinais entre  $\delta$  3 e 4, deslocamentos característicos de unidades osídicas. Os simpletos nas regiões  $\delta$  7,16 e  $\delta$  6,53 são característicos de hidrogênios aromáticos, sendo que este último é sugestivo de hidrogênio localizado em anel A de flavonoides. Os dubletos  $\delta$  7.56 (d,  $J = 8.5$  Hz) e 7.14 (d,  $J = 8.2$  Hz) indicam a presença de simetria na molécula, podendo ser atribuído ao anel C do núcleo flavonoídico, além disso as constantes de acoplamento apontam posição orto para esses sinais (Costa, 2018; Paula, 2008; Tanaka, *et al* 2005).

Os dados de RMN H<sup>1</sup> (**tabela 3**) comparados com a literatura são característicos de um flavonoide C- glicosilado, denominado 4H-1-Benzopiran-4-ona, 8-beta-D-glucopiranosil-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) ou Vitexina (**Figura 9**), sendo a primeira vez relatado no gênero *Vismia*. Esse composto foi isolado pela primeira vez por Zhou, *et al.* (2005) na espécie *Trollius ledebouri* pertencente a família Asparagaceae. Na literatura há relatos da identificação desse flavonoide glicosídico na família Clusiaceae (antes atribuído o gênero *Vismia*), por Ferreira *et al* (2016) na espécie *Clusia lanceolata* e por Lins, *et al* (2016) em *Clusia paralicola*.



**Figura 9:** Vitexina

**Tabela 3:** Dados de RMN de  $H^1$  (500 MHz, Clorofórmio-d) para fração FR2-EVG 1, comparados com valores descritos na literatura para Vitexina.

H	FR2-EVG 1		Vitexina	
	$\delta H$		$\delta H^*$	$\delta H^{**}$
1	–		–	–
2	–		–	–
3	7.16 (s)		6,66	6,94 (1H, s)
4	–		–	–
5	–		–	–
6	6.53 (s)		6,18	6,44 (1H, s)
7	–		–	–
8	–		–	–
9	–		–	–
10	–		–	–
1'	4.31 (d, $J = 7.6$ Hz)		–	4,94 (1H, d, $J = 9,8$ Hz)
2'	7.56 (d, $J = 8.5$ Hz)		7,94 (2H; d ; $J = 8,5$ )	8,26 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)
3'	7.14 (d, $J = 8.2$ Hz)		6,88 (2H; d; $J = 8,5$ )	7,05 (2H, d, $J = 8,7$ Hz,

4'			10,35 (1H, s)
5'	7.14 (d, $J = 8.2$ Hz)	6,88 (2H; d; $J = 8,5$ )	7,05 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)
6'	7.56 (d, $J = 8.5$ Hz)	7,94 (2H; d; $J = 8,5$ )	8,26 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)
1''	4.35 (d, $J = 6.7$ Hz)	4,69 (1H; d; $J = 10,0$ )	-
2''	3.67 (d, $J = 5.3$ Hz)	3,86 (1H; dd; $J = 9; 9$ )	-
3''	2.81 – 2.77 (m)	3,28 (2H; m)	-
4''	2.37 (d, $J = 7.6$ Hz)	3,37 (1H; dd; $J = 8,7; 8,7$ )	-
5''	2.81 – 2.77 (m)	3,28 (2H; m)	-
6''	3.67 (d, $J = 5.3$ Hz)	3,76 (1H; d; $J = 11$ ) e 3,53 (1H; dd; $J = 5,7; 11,7$ )	-

\*PAULA, 2008. \*\* ZHOU, Xin *et al.* 2005.

#### Identificação química por APCI-MS/MS e ESI-MS/MS

As análises por espectrometria de massas com ionização por APCI (MS-MS) foram realizadas em *full scan* no modo positivo e negativo. Na tabela 4 encontram-se dispostos os resultados obtidos por APCI (+)-MS. O composto representado como 1 apresentou pico do íon molecular com  $m/z$  291 e através dos experimentos de MS/MS foram obtidos os fragmentos em  $m/z$  139, 237, 207, 165, 123, 165. Este perfil de fragmentação corresponde a catequina, em que o fragmento  $m/z$  139 refere-se a uma clivagem retro Diels-Alder do anel C. A perda de 18 u, resulta no fragmento  $m/z$  273, que indica perda de uma molécula de água ( $H_2O$ ) e a partir desta saída ocorre uma reação de fissão heterocíclica do anel C. A clivagem do anel A, resulta na saída da molécula  $C_4H_4O_2$  que possui massa 184, por isso identifica-se no espectro o pico  $m/z$  207. O íon  $m/z$  165 se forma a partir de uma reação de fissão heterocíclica no anel C, e deste íon se forma uma quinona pela perda da molécula  $C_2H_2$  (Cren-Olivé *et al.* 2000; Santana, 2017).

O composto 2 apresentou um pico em  $[M+H]^+$  365, destaca-se que os íons observados por ESI (+)-MS são compatíveis com a estrutura Isovismiafenona B, esta benzofenona já foi identificada em estudos anteriores nas espécies *V. dicipiens* e *V. gracilis*. Através dos íons positivos em  $m/z$  309 e 231 foram identificadas as perdas neutras de 56 u e 134 u, referente aos fragmentos  $C_4H_8$  e  $C_{10}H_{13}$ , respectivamente (Delle, *et al* 1980; Magalhães, *et al* 2022).

O íon em  $m/z$  459, referente ao composto 3, quando submetido ao ESI-MS/MS originou fragmentos em  $m/z$  415, 403, 347 e 317, sendo consistentes com a estrutura harunganol B, substância já isolada dos frutos de *Vismia cayennensis* por Lopes (2023) e Do Carmo (2014). O fragmento em  $m/z$  415 é referente a perda de 44 u, correspondente a saída de  $C_3H_8$ . A partir deste fragmento a molécula sofreu perdas de 56 u, por três vezes consecutivas originando os íons  $m/z$  403, 347 e 317.

Também foi observado o íon positivo em  $m/z$  381 (composto 4), após análise por ESI-MS/MS foi possível identificar o íon positivo em  $m/z$  363 referentes a perda de uma molécula de água e um íon em  $m/z$  309 referente a saída do fragmento  $C_4H_8O$ . Através destas informações foi possível identificar a benzofenona denominada Derivado de Clusiafenona, já relatada em espécies da família Clusiaceae (Magalhães, 2021).

Outra antraquinona identificada na espécie de *V. cayennensis* foi Vismiafenona D (composto 6) por meio do íon  $m/z$  397 no modo positivo, que apresentou o pico 121 quando fragmentado, compatível com a fragmentação descrita por Fuller, *et al* (1997), primeiro autor a identificar esse composto.

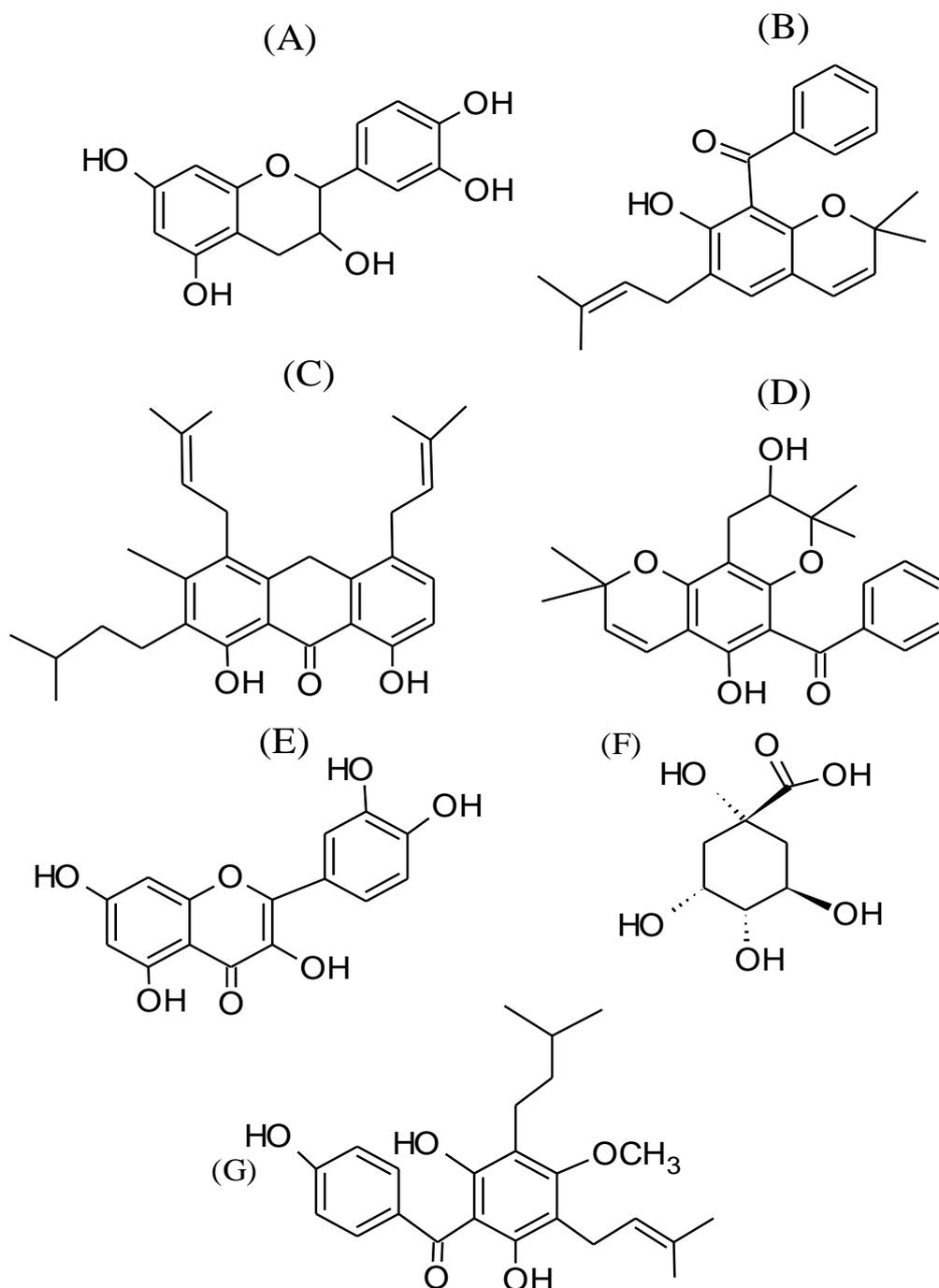
Ainda na espécie de *V. cayennensis* foi identificado a presença do ácido quínico devido a obtenção do pico  $m/z$  191 no modo negativo, o que corresponde a fórmula molecular  $C_7H_{12}O_6$  (192,17 g/mol), na fragmentação o íon  $m/z$  173 foi demonstrado, assim como nos dados espectrais observados por Motta, (2020) quando estudou o extrato hidroalcolólico das folhas de *Vismia guianensis*.

Foi possível ainda identificação do composto 6 através da presença dos íons moleculares  $m/z$  301 no modo negativo e  $m/z$  303 no modo positivo. Quando fragmentado observou-se o pico  $m/z$  151 referente a perda de 150 unidades, compatível com o flavonoide quercetina, já identificado por Rainha *et al.*, (2012) e Kelebek, *et al*, (2019) com esse mesmo padrão de fragmentação, em *Hypericum undulatum* e *Hypericum perforatum* L, respectivamente, que são espécies da família Clusiaceae.

**Tabela 4:** Dados das substâncias identificadas no espectro de massas.

<b>Amostra</b>	<b>M-H (m/z)</b>	<b>MS fragmentos</b>	<b>Número</b>	<b>Composto</b>	<b>Referência</b>
EVC	291 (+)	139;273;207; 165; 123.	1	Catequina	Santana, 2017
	365 (+)	309; 231	2	Isovismiofenona B	Magalhães, 2020.
Vc-Met	459 (-)	415;403 347;317	3	Harunganol B	Neves, 2023
	381 (+)	363; 309	4	Derivado de Clusiafenona	Magalhães, 2020
	191 (-)	173	5	Ácido Quínico	Motta, 2020
	397(+)	121	6	Vismiafenona D	Fuller <i>et al</i> , 1999
Vg-Hex	303 (+) 301 (-)	151	7	Quercetina	Rainha <i>et al</i> , 2012

Fonte: autora



**Figura 10:** Estrutura dos constituintes químicos identificados por ESI-MS. (A) Catequina. (B) Isovismiafenona B. (C) Harunganol B. (D) Derivado de Clusiafenona. (E) Quercetina. (F) Ácido quínico. (G) Vismiafenona D.

### Atividade Antioxidante

Os extratos hidroetanólicos de ambas as espécies apresentaram expressiva capacidade sequestrante frente aos dois radicais livres. Sendo que o extrato de EVG ( $1412,1 \pm 7,7 \mu\text{M ET}$ ) foi mais efetivo frente ao DPPH<sup>•</sup> do que o extrato EVC

(916,6±29,5µM ET). O mesmo ocorreu na determinação da inibição do radical ABTS+ (EVC: 3001,5 ± 74,24 5µM ET; EVG: 3129 ± 7,075µM ET), sendo muito mais expressiva a concentração inibitória para este radical em específico quando comparada com os demais extratos orgânicos (**Tabela 5**). Os extratos hidroalcóolicos também apresentaram maior teor de fenólicos (EVC: 533,96 ± 3,61 mg EAG/g e EVG: 308,85 ± 14,14 mg EAG/g), fator que corrobora para o alto potencial antioxidante, uma vez que esses compostos são apontados como os maiores responsáveis por tal atividade. É evidente que a solução etanólica 70% teve maior capacidade de extração de substâncias fenólicas, provavelmente pela afinidade de polaridade, demonstrando que a composição dos frutos é em grande parte hidrossolúvel.

**Tabela 5:** Quantificação da atividade antioxidante métodos de DPPH• e ABTS+ e fenóis totais

<b>Amostras</b>	<b>Teor de FT (mg EAG/g)</b>	<b>DPPH (µM ET)</b>	<b>ABTS (µM ET)</b>
EVC	533,96 ± 3,61	916,6±29,5	3001,5 ± 74,24
EVG	308,85 ± 14,14	1412,1±7,7	1897,5 ± 7,07
Vc-Hex	43,23 ± 0	916,0±35,6	1624 ± 56,56
Vc-Dic	226,51 ± 4,36	1322,7±3,3	680,9± 44,39
Vc-Act	86,29 ± 0,15	374,9±36,5	944 ± 42,42
Vc-Met	37,36 ± 0,60	314,9±11,8	426,5 ± 3,53
Vg-Hex	168,21 ± 12,94	1366,6±1,2	1674,2±25,93
Vg-Dic	229,80 ± 6,32	1381,0±1,7	1938,667±11,79
Vg-Act	342,14 ± 3,16	1223,8±17,8	1138,667±61,29
Vg-Met	86,72 ± 4,81	906,6±13,0	844 ± 28,28

**mg EAG/g:** miligramas de equivalente de ácido gálico por grama.

**µM ET:** micromolar de equivalentes trolox.

Apesar de todos extratos com diferentes polaridades apresentarem atividade sequestrante frente aos dois radicais, a fração de Vg-Dic foi a mais expressiva (DPPH•: 1381,0±1,7 µM ET e ABTS+: 1938,667±11,79 µM ET), e a menos efetiva frente ao DPPH• foi a fração Vc-Met (314,9±11,8 µM ET). O extrato Vg-Act foi o que demonstrou maior composição fenólica (342,14 ± 3,16 mg EAG/g) e também boa inibição dos radicais testados (DPPH•: 1223,8±17,8 e ABTS+: 1138,667±61,29).

Em estudo de Neves, *et al* (2023) com extrato dos frutos de *V. cayennensis*, foi demonstrado que o extrato hexânico apresentou maior conteúdo fenólico ( $202,9 \pm 0,5$  mg EAG/g) e atividade frente ao radical DPPH• ( $1540,9 \pm 5,2$   $\mu$ M ET) do que o extrato de acetato de etila ( $81,7 \pm 0,7$  mg EAG/g e  $870,1 \pm 5,2$   $\mu$ M ET) e metanólico ( $85,4 \pm 0,3$  mg EAG/g e  $790,9 \pm 5,2$   $\mu$ M ET).

A atividade antioxidante de extratos orgânico dos frutos de *V. cayennensis* e *V. guianensis* também foi relatada por Trindade *et al.*, (2023), pelo método de DPPH•. Neste estudo todos os extratos orgânicos foram ativos, com ênfase para as frações de hexano e diclorometano de *V. cayennensis*, que apresentou índice inibitório de  $1540,9 \pm 5,2$   $\mu$ M ET e  $1167,5 \pm 3,9$   $\mu$ M ET, respectivamente. Da espécie *V. guianensis*, a solução hexânica ( $1491,7 \pm 4,3$   $\mu$ M ET) também foi mais ativa que as demais. No entanto a fração metanólica ( $1066,7 \pm 4,3$   $\mu$ M ET) foi mais efetiva que a de acetato de etila ( $974,2 \pm 2,5$   $\mu$ M ET).

A atividade antioxidante nos métodos utilizando os radicais DPPH• e ABTS•+ é dada pela capacidade que os compostos possuem em neutralizar o radical através da doação de um próton (Azevedo *et al.*, 2018). Geralmente os metabólitos com essa propriedade possuem em sua estrutura compostos de origem fenólica, que caracterizam-se pela estrutura benzênica e possuem grupamentos com hidroxilas (-OH), o que possibilita reações químicas de oxidação e redução com os radicais livres (silva, *et al.*, 2010; Hernández & Prieto Gonzáles, 1999). Dentro das classes com essa característica encontram-se os flavonoides e seus derivados, metabólitos que são encontrados em grande quantidade nas espécies de *Vismia*.

Nesse contexto, teor fenólico geralmente está ligado diretamente a capacidade sequestrante dos radicais, e as substâncias fenólicas possuem maior afinidade por solventes polares. No entanto na avaliação química dos extratos foram identificadas uma série de substâncias com sítios possíveis de reações de oxidação e redução, mas que em contrapartida possuem uma cadeia de hidrocarbonetos, o que pode favorecer a afinidade por solventes de caráter apolar como hexano e diclorometano. Pelo fato das extrações ocorrerem em ordem crescente de polaridade e o último solvente de extração a ser utilizado ser o metanol estas frações apresentaram menor teor fenólico e consequentemente menores índice de inibição frente aos radicais testados (Gómez-Ruiz, Leake Ames, 2007; Monteiro, 2005).

## Ensaio de Citotoxicidade

Na avaliação citotóxica o padrão utilizado Violeta Genciana apresentou  $CC_{50}$ :  $4.4 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ . Os extratos apresentaram variação na concentração citotóxica entre  $13,0 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$  e  $>200 \mu\text{g/mL}$  (**tabela 6**). A amostra de Vg-Dic ( $CC_{50}$   $13.0 \pm 0.79 \mu\text{g/mL}$ ) apresentou o menor valor de concentração citotóxica, já o que apresentou maior valor foi o extrato hidroalcolico de *Vismia guianensis* ( $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ), que não foi detectado toxicidade nas concentrações testadas. É importante ressaltar que os extratos oriundos dos solventes Hexano, Acetato de Etila e Metanol da espécie de *Vismia cayennensis*, apresentaram excelente janela de citotoxicidade, com valores de  $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 6:** valores determinados da concentração citotóxica dos extratos de *Vismia* spp.

Amostras	Citotoxicidade ( $CC_{50} \pm \text{S.E.M.}, \mu\text{g/mL}$ )
GV*	$4.4 \pm 0.01$
EVG	$>200$
EVC	$47.5 \pm 2.73$
Vg-Dic	$87.0 \pm 1.18$
Vc-Dic	$13.0 \pm 0.79$
Vg-Act	$42.8 \pm 2.50$
Vc-Act	$133.1 \pm 1.10$
Vg-Met	$109.3 \pm 0.63$
Vc-Met	$25.9 \pm 2.29$
Vg-Hex	$22.2 \pm 0.63$
Vc-Hex	$110.9 \pm 2.19$

$CC_{50}$ : Concentração citotóxica para 50%;  $\mu\text{g/mL}$ : microgramas por mililitros. \*Violeta genciana (padrão).

## Atividade Antimalárica

Na análise dos resultados frente as cepas plasmodiais, todos extratos apresentaram potencial inibitório (**Tabela 7**). Na triagem inicial na concentração de  $20 \mu\text{g/ml}$ , todos extratos apresentaram percentual inibitório acima de 90% frente ambas as cepas. A amostra que demonstrou maior percentual inibitório frente a cepa D10, sensível a

cloroquina, foi Vg-Hex (106,62 %). Em contrapartida, o extrato que inibiu em maior percentual a cepa W2, resistente a cloroquina, foi o extrato EVC (98,55 %). O extrato hidroalcoólico da espécie *Vismia guianensis* também obteve bom índice de inibição 101,93% e 97,38% frente as cepas D10 e W2, respectivamente. Outras amostras que tiveram bom desempenho na eliminação dos parasitas foram Vc-Met (D10: 100,91%; W2: 96,6%) e Vg-Act ( D10: 100,7% e W2: 97,59%).

Na determinação do Índice de concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) em ng/mL houve uma variação de 0,62± 0,048 ng/mL a 7,56 ± 0,33 ng/mL para a cepa D10 e 0,47 ± 0,064 ng/mL a 6,31 ± 0,11 ng/mL para W2. Nessa avaliação o extrato Vc-Hex (D10: 0,62 ± 0,048 ng/mL e W2:0,47 ± 0,064 ng/mL) teve menor concentração inibitória para as duas cepas testadas quando comparado aos demais. A amostra que obteve maior concentração inibitória de 50% foi EVG (D10: 7,56 ± 0,33 ng/mL e W2:6,31 ± 0,11 ng/mL). Amostras que apresentam menor IC<sub>50</sub> são mais potentes, uma vez que em baixas concentrações provocam eliminação do parasita. No entanto, vale ressaltar que o extrato hidroetanólico de *Vismia guianensis* não foi tóxico nas concentrações testadas (>200 µg/mL), o que leva a considerar essa ser uma amostra promissora por demonstrar uma larga janela de toxicidade.

**Tabela 7:** Atividade antiparasitária dos extratos de *Vismia* spp. frente as cepas D10 (sensível a cloroquina) e W2 (sensível a cloroquina) dos ensaios de triagem inicial (20µg/ml) e determinação do IC<sub>50</sub> (ng/ml).

Compostos	Triagem inicial para concentração 20µg/ml		IC <sub>50</sub> ng/ml (média e S.D.)	
	D10 (% inibição)	W2 (% inibição)	D10	W2
EVG	101,93	97,38	7,56 ± 0,33	6,31 ± 0,11
EVC	99,59	98,55	3,51 ± 1,31	2,28 ± 0,30
Vg-Dic	93,89	94,71	0,91 ± 0,19	0,68 ± 0,04
Vc-Dic	90,07	90,98	1,71 ± 0,05	1,83 ± 0,11
Vg-Act	100,7	97,59	5,48 ± 0,55	4,14 ± 0,35
Vc-Act	97,19	95,37	6,80 ± 0,23	4,90 ± 0,57
Vg-Met	90,32	95,73	2,39 ± 1,188	1,58 ± 0,202
Vc-Met	100,91	96,6	4,50 ± 0,926	4,13 ± 1,054

Vg-Hex	106,62	99,56	7,02 ± 1,259	4,90 ± 0,247
Vc-Hex	95,49	91,02	0,62 ± 0,048	0,47 ± 0,064

**IC<sub>50</sub>**: Concentração inibitória de 50%; **µg/ml**: Microgramas por mililitro; **ng/ml**: Nanogramas por mililitro;  
**S.D.**: Desvio Padrão

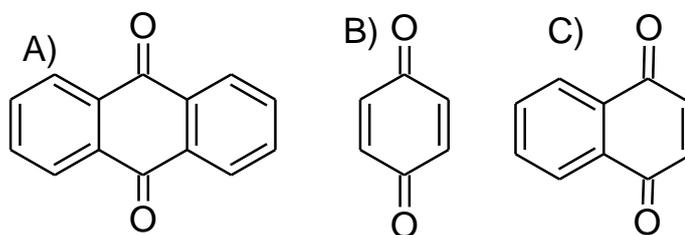
O mecanismo da patogenicidade da malária, no ser humano, se dá após a inoculação dos esporozoítos pelo mosquito após a picada, estas formas migram pela corrente sanguínea e infectam os hepatócitos que com isso liberam os merozoítos que infeccionam as hemácias, iniciando o ciclo eritrocitário. Nessa etapa o protozoário se multiplica liberando merozoítos que invadem novas células. Nesse processo infeccioso a produção de radicais hidroxila (OH) é apontada como principal fator que leva ao *stress* oxidativo e que induz as complicações ocasionadas pela malária (Riganti, *et al* 1990).

O *P. falciparum* sobrevive no interior das hemácias polimerizando a hemoglobina em heme, substância que em concentrações elevadas pode ser tóxica as células e ao próprio parasita, como mecanismo de defesa o parasita as degrada unidades de heme em hemozoína. Dessa forma a inibição da formação de hemozoína, leva ao aumento de toxicidade pela alta concentração de heme livre (Dhangadamajhi *et al.*, 2010, Choi, & Mukherjee, 2008).

A atividade observada dos extratos orgânicos de *Vismia* spp. está relacionada a presença dos constituintes químicos presentes nas espécies, como diversos estudos já relataram. Francois, *et al* (1999) descreveu a atividade antimalárica da Vismiona H (IC<sub>50</sub> 0,088 µg/ml), uma benzofenona isolada da *Vismia guianensis*. Marston, *et al* (1986) também relatam o potencial antiplasmodial de outras substâncias antracênicas, já identificadas no gênero *Vismia*, vismione D (IC<sub>50</sub> = 0.095µg/ml), acetilvismiona D (IC<sub>50</sub>:0.383 µg/ml) e Vismiona F (IC<sub>50</sub> = 0.996 µg/ml).

As quinonas que são considerados marcadores químicos do gênero *Vismia*, são apontados em diversos estudos farmacológicos como inibidores e reparadores de processos em sistemas celulares, atuando de diferentes formas. Podendo ser destacado as reações que provocam o estresse oxidativo devido a indução endógena de espécies reativas oriundas do oxigênio, OH, O<sup>2-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa classe apresenta um núcleo quinonoídínico, podendo ser benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas (**Figura 11**), e em muitos estudos revelam que esse núcleo se trata do grupamento farmacofórico para

agir sobre enzimas e na formação das espécies reativas que levam a apoptose (Silva, *et al* 2002).



**Figura 11:** núcleo básico das subclasses das quinonas. **A)** Antraquinona; **B)** Benzoquinona; **C)** Naftoquinona

Silva, *et al*, (2002), descreve o ciclo redox induzido pelas quinonas, que se inicia com a formação do ânion semioquinona que se dá a partir da ação de enzimas flavinas NADPH citocromo P-450 redutase sobre o substrato quinonoídico ocasionando sua redução. O ânion uma vez formado tem a capacidade de reduzir o oxigênio molecular ao radical superóxido que sofre ação enzimática da superóxido dismutase formando peróxido de hidrogênio o que leva a lesão de componentes celulares que protegem o parasita. Levando em consideração o mecanismo descrito do *Plasmodium*, pode-se afirmar que esses componentes químicos, que estão em grande quantidade nas espécies de *Vismia* inibem o parasita por provocar o estresse oxidativo.

Esses resultados corroboram na afirmação que estas espécies possuem constituintes que podem ser de interesse para o desenvolvimento de novas substâncias que possam combater a infecção causada pela malária. Dessa forma, se faz importante a continuação de estudos nessa vertente, para avaliar o potencial desses extratos *in vivo*.

## CONCLUSÃO

As espécies de *Vismia* spp. estudadas no presente trabalho apresentaram constituintes químicos, condizentes com dados já descritos na literatura, com a identificação de metabólitos que são considerados marcadores químicos do gênero, como: catequina e quercetina que são flavonoides e as antraquinonas Isovismiofenona B, Derivado de Clusiafenona, Vismiafenona D e Ferruginina A e do flavonoide glicosilado Vitexina pela primeira vez identificado na espécie. A presença dessas substâncias explica a capacidade antioxidante dos constituintes dos frutos das duas espécies estudadas frente aos radicais de DPPH• e ABTS+, seus constituintes químicos são compostos fenólicos que possuem a capacidade de sequestrar radicais livres. A atividade antimalárica

observada pelos extratos na triagem inicial, na concentração de 20µg/ml, todos apresentaram percentual inibitório acima de 90%, frente as cepas testadas, e com valores de IC<sub>50</sub> de 0,62± 0,048 ng/mL a 7,56 ± 0,33 ng/mL para a cepa D10 e 0,47 ± 0,064 ng/mL a 6,31 ± 0,11 ng/mL para W2. Provavelmente esta atividade está relacionada ao teor fenólico, uma vez que substâncias com essa característica podem desenvolver o estresse oxidativo e danificar a membrana que recobre o parasita, levando a sua morte. Diante dos resultados, pode-se sugerir que as espécies estudadas demonstram potencial na descoberta de novos ativos para a malária.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, MZ. Plantas Medicinais [online]. 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011, 221 p. ISBN 978- 85-232-1216-2. Available from SciELO Books .
- APG IV - Angiosperm Phylogeny Group (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.
- ALBUQUERQUE, J. M. Identificação de plantas invasoras de cultura da região de Manaus. *Acta Amazonica*, v. 10, p. 47-95. Manaus: INPA, 1980.
- ALVARÉZ, E., Orfa J. J. G., CRISTIAN M. P. A., BENJAMÍN A. R., JESÚS H. G., CARLOS M. G. P., DIEGO L. D.. Atividade antioxidante e teor fenólico de extratos de bagas de duas espécies do gênero *Vismia* (Guttiferae), 15.1: 165-172. *Vitae*, Medellín, 2008.
- BOTTA, B.; D. M., F.; DELLE , G. M.; MARINIBETTOLO, G. B.; OGUAKWA, J. U. 3-Geraniloxi-6-metil-1, 8-diidroxiantraquinona e vismionas C, D e E de *Psorospermum febrifugum*. p. 539-542. *Fitoquímica*, Oxford, 1983.
- DE RYCKER, M., BARAGAÑA, B., DUCE, SL, & GILBERT, IH (2018). Desafios e progresso recente na descoberta de medicamentos para doenças tropicais. *Nature* , 559 (7715), 498-506.
- DELLE MONACHE, G.; GONZALEZ, J. G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G.M. Prenylated benzophenones from *Vismia decipiens*. *Phytochemistry*, v. 19, n. 9, p. 2025-2028. Oxford: Elsevier Science Ltd., 1980.
- FULLER, R. W.; WESTERGAARD, C. K.; COLLINS, J. W.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. Vismiaphenones D– G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *Journal of natural products*, v. 62, n. 1, p. 67-69, 1999.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.55, n.17, p. 6962-6969, 2007.

Gustafsson MHG, Bittrich V & Stevens PF (2002) Phylogeny of Clusiaceae based on *rbcL* sequences. *International Journal of Plant Sciences* 163: 1045-1054

Lopes, A. D. S. N., Paes, W. M., de Araújo Bezerra, J., Mar, J. M., Sanches, E. A., de Sousa Maia, P. J., ... & do Carmo, D. F. D. M. (2023). Chemical constituents and antioxidant capacity of fruit extracts from *Vismia cayennensis*. *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA*, 21(3), 1482-1500.

MAGALHAES, N. M. G. et al. Combining chemometric and phytochemical tools to isolate and characterize activity of *Vismia gracilis* compounds against *Aedes aegypti*. *Natural Product Research*, v. 36, n. 10, p. 2620-2624. Abingdon: Taylor & Francis, 2022.

MARSTON A, CHAPUIS JC, SORDAT B, MSONTHI JD, HOSTETTMANN K (1986) Anthracenic derivatives from *Psorospermum febrifugum* and their in vitro cytotoxicities to a human colon carcinoma cell line. *Planta Med* 52: 207±210

MARTINS, M.V.; SHIMIZU, G.H.; BITTRICH, V. Flora da Reserva Ducke, Estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. *Hoehnea*, v. 45, p. 361–371, 2018.

MARIN, K.; REGNAULT, H. D. A.; MALLO, M.; VILLAMIZAR, J.; GARCÍA, M. Estudio fitoquímico y biológico preliminar de la corteza (tallo) de *Vismia cayennensis* proveniente del estado Amazonas, Venezuela. *Revista Ciencia UNEMI*, v. 10, n. 24, p. 39. Milagro: Universidad Estatal de Milagro, 2017.

Matés, J. M.; Sánchez-Jiménez, F. M.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000, 32, 157 e referências citadas

MONTEIRO JM, ALBUQUERQUE UP, ARAÚJO EL, AMORIM ELC. Taninos: uma abordagem química à ecologia. *Quím. Nova*, 2005;28(5): 892-896.

MOTTA, Elizangela Araújo Pestana et al. ATIVIDADE ANTI-Candida de *Vismia guianensis* (Aubl.) Chosy: AVALIAÇÃO in vitro, in vivo e in silico. 2020.

**OLIVEIRA, AH Avaliação das atividades anti-inflamatórias e antifúngicas dos extratos de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy na infecção induzida por *Sporothrix schenckii* . 2015. Tese de Doutorado. Tese de doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.**

Robson NKB. Estudos no gênero *Hypericum* L. (Guttiferae). 1. Classificação infragenérica. *Boletim do Museu Britânico de História Natural (Botânica)* 1977; 5 :291–355.

Ruhfel BR, Bittrich V, Bove CP, Gustafsson MHG, Philbrick CT, Rutishauser R, Xi Z & Davis CC (2011) Phylogeny of the Clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany* 98: 306-325

TRINDADE, Í. T. M.; DA SILVA, R. R.; BEZERRA, J. de A.; CORRÊA, G. M.; CARMO, D. Chemometric analysis and evaluation of antioxidant potential from organic extracts of *Vismia* spp.: Análise quimiométrica e avaliação do potencial antioxidante dos extratos orgânicos de *Vismia* spp. *Concilium*, p. 294-306. São Paulo, 2023.

VOGEL ELY, C.; BORDIGNON, S.A.L.; BOLDRINI, I.I. Clarifying the nomenclature of non-Andean South American *Hypericum* (Hypericaceae). *Taxon*, v. 69, p. 593–604. 2020a.

Riganti M, Pongponratn E, Tegoshi T, Looareesuwan S, Punpoowong B, Aikawa M. Human cerebral malaria in Thailand: A clinico-pathological correlation. *Immunol Lett.* 1990;25:199-205.

## Capítulo 2: COMPLEXOS METÁLICOS

### Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos metálicos com ligantes fenólicos

Rafaela Rolim da Silva<sup>1</sup>, Ivina Thayná Miranda Trindade<sup>1</sup>, Josiele Viana Gomes<sup>1</sup>, Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira<sup>2</sup>, Paulo José de Sousa Maia<sup>3</sup>, Dominique Fernandes de Moura Do Carmo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas, <sup>2</sup>Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz/Bahia), <sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Macaé, RJ, Brasil.

#### RESUMO

A malária é uma doença endêmica na região amazônica causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. sendo a espécie *P. falciparum* a causadora da forma mais agressiva da doença. Diante disto, este trabalho buscou sintetizar e caracterizar compostos coordenação de Cu (II), utilizando como ligantes os flavonoides catequina (Cobre-Q) e quercetina (Cobre-Q) e avaliar o potencial antimalárico dos metabólitos em sua forma livre e coordenados, frente as cepas D10 (sensível a cloroquina) e W2 (resistente a cloroquina) de *P. falciparum*, além de verificar o potencial antioxidante das amostras frente aos radicais de DPPH• e ABTS<sup>+</sup>. Os complexos metálicos foram tão efetivos frente aos radicais quanto suas formas livres, sendo que o cobre-Q (3911,03±0,0 µM ET) foi mais expressivo que sua forma livre (3161,73±6,9 µM ET) sobre o radical ABTS<sup>+</sup>. Na avaliação antimalárica, a Catequina apresentou 6,72% de inibição frente a cepa D10 e 39,71% para a W2, a forma complexada Cobre-C apresentou maior índice de inibição, sendo 88,5% para D10 e 62,48% em W2. A Quercetina na forma livre eliminou 60,91% de D10 e 71,72% de W2, a forma coordenada Cobre-Q foi bem mais promissora nesta avaliação, apresentando inibição de 100,29% frente a D10 e 91,11% frente W2. Portanto, os complexos apresentaram maiores porcentagens de inibição frente as cepas testadas. Os dados obtidos demonstram que os complexos sintetizados apresentaram potencial antioxidante e são bons candidatos a novos compostos antimaláricos, uma vez que esses

compostos coordenados podem favorecer mecanismos oxidativos, gerando danos ao DNA do parasita, ocasionando a morte.

Palavras-chaves: Catequina; Quercetina; Malária; cobre; estresse oxidativo.

### **Synthesis, characterization and study of the biological activity of metal complexes with phenolic ligands**

#### **ABSTRACT**

Malaria is an endemic disease in the Amazon region caused by protozoa of the genus *Plasmodium* spp. with the species *P. falciparum* being the cause of the most aggressive form of the disease. In view of this, this work sought to synthesize and characterize Cu (II) coordination compounds, using the flavonoids catechin (Copper-Q) and quercetin (Copper-Q) as ligands and evaluate the antimalarial potential of the metabolites in their free and coordinated, against strains D10 (sensitive to chloroquine) and W2 (resistant to chloroquine) of *P. falciparum*, in addition to verifying the antioxidant potential of the samples against DPPH• and ABTS+ radicals. The metal complexes were as effective against radicals as their free forms, with copper-Q ( $3911.03 \pm 0.0 \mu\text{M ET}$ ) being more significant than its free form ( $3161.73 \pm 6.9 \mu\text{M ET}$ ) on the radical ABTS+ . In the antimalarial evaluation, Catechin showed 6.72% inhibition against the D10 strain and 39.71% for W2, the Copper-C complexed form showed a higher inhibition rate, 88.5% for D10 and 62.48% in W2. Quercetin in free form eliminated 60.91% of D10 and 71.72% of W2, the coordinated form Copper-Q was much more promising in this evaluation, showing inhibition of 100.29% against D10 and 91.11% against W2 . Therefore, the complexes showed higher percentages of inhibition compared to the strains tested. The data obtained demonstrate that the synthesized complexes have antioxidant potential and are good candidates for new antimalarial compounds, since these coordinated compounds can favor oxidative mechanisms, generating damage to the parasite's DNA, causing death.

KeyWords: Catechin; Quercetin; Malaria; Copper; oxidative stress.

#### **INTRODUÇÃO**

A malária é uma patologia infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp., seus principais sintomas são febre alta, dores de cabeça, tremores, enjoos, entre outras manifestações clínicas. Dentre os fatores determinantes para o desenvolvimento de casos dessa doença, encontram-se a vulnerabilidade social, além da sazonalidade que determina o desenvolvimento das populações de mosquito transmissor. O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM/MS classificou os garimpos, assentamentos, áreas indígenas, áreas urbanas e áreas rurais como em

localidades especiais, que necessitam de maior controle, sendo fundamental para o maior esclarecimento dos pontos críticos e para o desenvolvimento de ações para o controle e eliminação da doença (Wolfarth-Couto, 2020; Brasil, 2020).

De acordo com o Ministério da Saúde no ano de 2017 foi registrado uma elevação de 52,7% nos casos autóctones de Malária, quando comparado ao ano anterior. No ano seguinte, houve redução de quase 1% e a partir de 2019 houve uma redução mais expressiva de 18,4%, sendo notificados 153.269 casos autóctones. Em 2020, foram registrados 143.403 casos autóctones de malária no país, uma redução de 6,4% em comparação ao ano anterior e em 2021 foram 139.112 casos autóctones, representando uma redução de quase 3% em relação a 2020. Em contrapartida, em áreas de garimpo é observado um aumento expressivo por estado brasileiro da infecção no ano de 2022 em relação a 2021, sendo de 91,5% em Roraima, de 28,0% no Amapá e de 6,4% em Rondônia (Brasil, 2021; Brasil, 2024). Cerca de 99% dos casos estão concentrados na região Amazônica, sendo considerada área endêmica da doença. Sendo o Amazonas o estado mais afetado principalmente nas áreas indígenas, com registro de quase 22 mil casos em 2021 (Laporta, *et al.*, 2015; Wolfarth-Couto, *et al.*, 2019; Brasil, 2019). Dentre as espécies de maior frequência no Brasil encontram-se *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo esta, a causadora da forma mais agressiva da doença, que pode levar a óbito se não houver diagnóstico e tratamento rapidamente (Brasil, 2019; Alves, 2007). Embora a Organização Mundial de Saúde tenha aprovado uma nova vacina para combate dos casos, o imunizante é eficaz apenas contra os parasitas mais comuns do continente africano. No Brasil é adotado o esquema terapêutico em que pode se utilizar, Artemeter + Lumefantrina ou Artesunato + Mefloquina e a Pimaquina para eliminação de gametócitos (Brasil, 2022).

A farmacoterapia para o tratamento de pacientes com malária nem sempre é eficaz e possui certa complexidade, além de apresentar muitos efeitos colaterais como, alterações no aparelho intestinal, tontura e efeitos psicológicos, além disso os casos de resistência de cepas plasmodiais à fármacos utilizados no tratamento, torna emergente a busca por novos fármacos (Leite *et al.*, 2014; França *et al.* 2008)

Dentre a busca de novas alternativas para o tratamento, tem se observado a implementação de complexos metálicos no tratamento de doenças parasitárias. Silva (2019), testou três complexos de rutênio e um complexo de ouro conjugados à

amodiaquina, esses complexos apresentaram atividade potente contra as formas sexuadas, os gametócitos, do *P. falciparum*, quando comparados com a amodiaquina. Também já foi observado que complexos metálicos de Cobre (Cu - II), Níquel (Ni - II) e Zinco (Zn - II), com ligantes da classe dos flavonoides, Hesperetina e Naringenina, apresentaram melhores atividades antioxidantes e anticâncer, em comparação com esses flavonoides na forma livre. Nesse mesmo trabalho, o complexo de cobre-Naringenina apresentou atividade antioxidante maior do que os antioxidantes utilizados como padrão no ensaio *in vitro*, a vitamina C e manitol, reforçando que compostos de coordenação com ligantes naturais podem ser uma boa estratégia para novas fontes de tratamento (Li, *et al*, 2007).

Dessa forma o presente estudo buscou sintetizar e caracterizar compostos coordenação de Cu (II) utilizando como ligantes os flavonoides catequina e quercetina, além de avaliar a atividade antioxidante frente aos radicais de DPPH• e ABTS<sup>+</sup> e atividade antiplasmodial em cultura de *P. falciparum*, D10 e W2. Os compostos complexados com cobre apresentaram atividade biológica frente as cepas sensíveis e resistentes ao *P. falciparum* e os resultados demonstraram que os mesmos tem atividade promissora contra o parasita causador da malária, com destaque ao complexo cobre-quercetina que demonstrou 91,11% com IC<sub>50</sub> 9,21 ± 1,12, o que levará a continuação dos estudos *in vivo* da atividade antimalárica.

## **METODOLOGIA**

### **Obtenção Dos Compostos De Coordenação**

Os padrões de flavonoides [3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona (quercetina - C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) e 2-(3,4-dihidroxifenil)-4H-cromona-3,5,7-triol (catequina - C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)], foram adquiridos da Sigma Aldrich para a síntese dos complexos metálicos de cobre (II). Para obtenção do complexo de cobre (II) e quercetina (Cobre-Q), utilizou-se um balão de fundo redondo de 50 mL, onde adicionou-se quercetina (0,17 g, 0,01 mol) em 20 mL de Metanol, a solução foi mantida sob agitação e aquecimento até a total dissolução do composto. Após 15 minutos, a cor da solução tornou-se amarelo claro e então foi adicionado, lentamente, a solução metanólica de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), após este processo observou-se uma mudança na coloração para verde. A solução permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por um período de 01h30 minutos. Após agitação, a mistura de reação foi filtrada e este foi evaporado lentamente à temperatura ambiente. O

produto verde claro resultante, complexo Cobre-Q, foi lavado com t-butanol e seco em um dessecador a vácuo, obtendo rendimento de 77%.

O complexo de cobre (II) e catequina (Cobre-C) foi obtido a partir da mesma metodologia descrita acima. Porém, foi adicionado catequina (0,0029 g, 0,01 mol) em 20mL de Metanol, permanecendo em contato até total dissolução do flavonoide. A solução apresentou uma coloração amarelo claro e posteriormente adquiriu uma coloração vermelho acastanhado. O produto resultante foi lavado com t-butanol e seco em dessecador a vácuo, e o material seco obtido teve rendimento de 60%.

### **Ultravioleta-visível**

A faixa de varredura do comprimento de onda foi de 200 a 800 nm e as amostras foram preparadas em uma concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em DMSO na temperatura de 25 °C.

### **Avaliação da atividade antioxidante frente aos radicais de DPPH• e ABTS<sup>+</sup>**

A atividade antioxidante foi avaliada por ensaios com os radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>+</sup>). O ensaio com o radical livre DPPH• se deu com a solubilização de 3,9 mg do radical em 100 mL de metanol, e as soluções das amostras foram preparadas adicionando 0,1 mg do padrão e dos complexos em 1 mL de metanol. Para o teste retirou-se 100µL de amostra (1mg/mL) e 3,9 mL de solução de DPPH•, deixando a mistura 30 minutos no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Medtherm) em 515 nm. A curva padrão foi obtida utilizando Trolox® como amostra padrão, em concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 µM.

O ensaio com o radical ABTS<sup>+</sup> iniciou com a preparação paralela da mistura contendo 19,2 mg do radical em 5 ml de água e 9,46 mg de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) em 250µL de água. Para obtenção da solução estoque, foi realizada uma mistura de 2,5 mL da solução de ABTS<sup>+</sup> e 44 µL da solução de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, que permaneceu em repouso 16 horas no escuro. Para leitura das absorbâncias foi utilizado 30 µL de amostra (1mg/ml) em 3000 µL de solução de ABTS<sup>+</sup>, deixando 6 minutos no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Medtherm) em 734 nm. O padrão utilizado também foi utilizado Trolox® nas mesmas concentrações do ensaio de DPPH•.

### **Ensaio da Atividade antimalárica frente a cepas de *Plasmodium falciparum***

As amostras dos flavonoides e dos complexos foram dissolvidas em DMSO e depois diluídos com meio RPMI-1640 para atingir as concentrações necessárias (concentração final de DMSO <1%, que não é tóxica para o parasita). As amostras foram colocadas em microplacas de fundo plano de 96 poços em duplicata e sete diluições seriadas 1:2 foram realizadas diretamente na placa em um volume de 100 µL. Além disso, 100 µL de culturas assíncronas D10 (cepa sensível à cloroquina) ou W2 (cepa resistente à cloroquina) com parasitemia de 1–1,5% e 2% de hematócrito (1% final) foram adicionadas nas placas e incubadas por 72 h. A Cloroquina foi usada como referência. O crescimento do parasita foi determinado medindo a atividade da lactato desidrogenase do parasita (pLDH), de acordo com uma versão modificada do método de Makler *et al.*, (1993). Ao final da incubação, as culturas foram cuidadosamente ressuspensas e alíquotas de 20 µL foram retiradas e adicionadas a 100 µL do reagente Malstat em uma microplaca de 96 poços. O reagente Malstat é composto de TritonX-100 a 0,125%, L-lactato 130 mM, tampão Tris 30 mM e APAD 0,62 µM. Após isso, 20 µL a 1,9 µM NBT (Nitro BlueTetrazolium) e 0,24 µM PES (fenazina etil sulfato) foram adicionados ao reagente Malstat. O NBT é reduzido a formazan azul e foi lido espectrofotometricamente (OD650), como uma medida da atividade do pLDH, ou seja, da viabilidade do parasita. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade em comparação com os controles não tratados, calculado com a seguinte fórmula:  $100 \times ([\text{Leitura da amostra tratada} - \text{branco}] / [\text{Leitura da amostra não tratada} - \text{branco}])$ ; A leitura foi dado por densidade óptica. Como branco, foram utilizados eritrócitos não infectados. A porcentagem de viabilidade foi plotada em função das concentrações do fármaco e o ajuste da curva foi obtido por análise de regressão não linear utilizando um método logístico de quatro parâmetros (software Gen5 1.10 fornecido com o leitor Synergy4plate [Biotek]). A IC<sub>50</sub>, que é a dose capaz de induzir 50% de inibição da viabilidade do parasita, foi obtida por extrapolação.

### **Ensaio de citotoxicidade em células de mamífero**

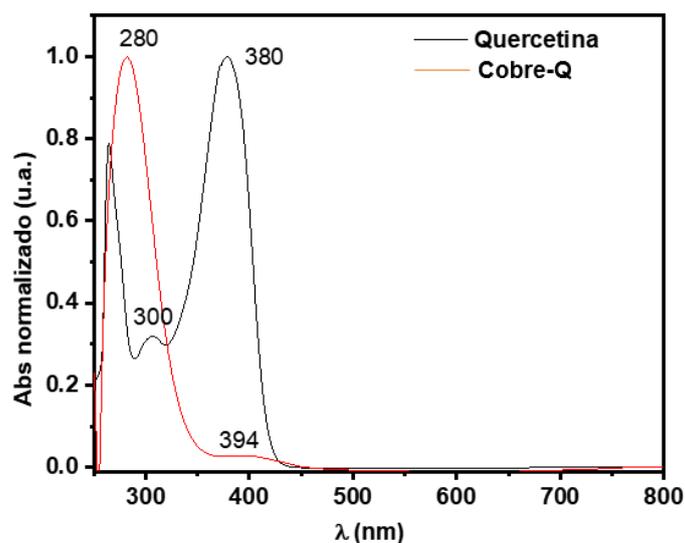
Os compostos foram testados quanto à citotoxicidade *in vitro* contra os macrófagos murinos das linhagens J774, e a viabilidade celular foi determinada por bioluminescência usando o CellTiter-Glokit (Promega, Madison, EUA). A cultura foi

mantida em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e suplementado com L-glutamina, vitaminas e aminoácidos em frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C, com o meio trocado duas vezes por semana. Células de 60 a 80% de culturas confluentes foram tripsinizadas, lavadas em meio completo e plaqueadas em  $4 \times 10^4$  células por poço em 100 µL de meio completo em placas brancas de fundo plano de 96 poços por 24 horas a 37° C antes da adição dos compostos. Alíquotas triplicadas de compostos e medicamentos de referência (solução estoque em DMSO) cobrindo sete concentrações diferentes (100-1,56 µM) em diluições duplas foram adicionadas aos poços, e as placas foram incubadas por mais 72 horas. DMSO (veículo) como controles positivos e células. Após a incubação por 72 horas a 37°C, as placas foram mantidas em temperatura ambiente, o meio de cultura foi removido e 100 µL do CellTiter-Glokit foram adicionados a cada poço. 50 dados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes e analisados usando o GraphPad Prism (versão 5.01. SI) foi calculado usando o CC50 de células de mamíferos dividido pelo IC50 obtido em relação ao estágio sanguíneo assexuado do *P. falciparum* 3D7.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Caracterização dos compostos de Coordenação**

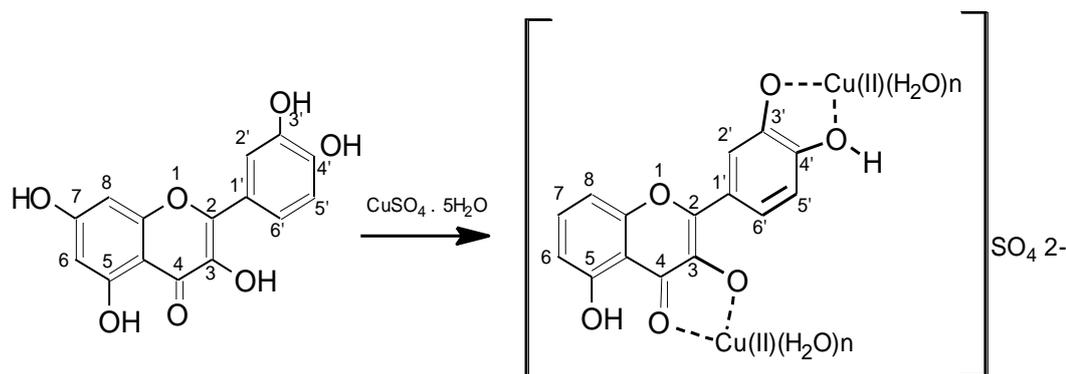
O espectro UV-vis da quercetina livre e complexo Cobre-Q em DMSO é descrito no gráfico 1. A quercetina, como a maioria das flavonas e flavonóis, exibe duas grandes bandas de absorção na região UV-vis, a 380 nm (banda I) representando a absorção do anel B (sistema cinamoil), e 300 nm (banda II) relativo ao sistema benzoíla do anel A.



**Gráfico 1:** Espectro eletrônico da quercetina livre e complexada em DMSO

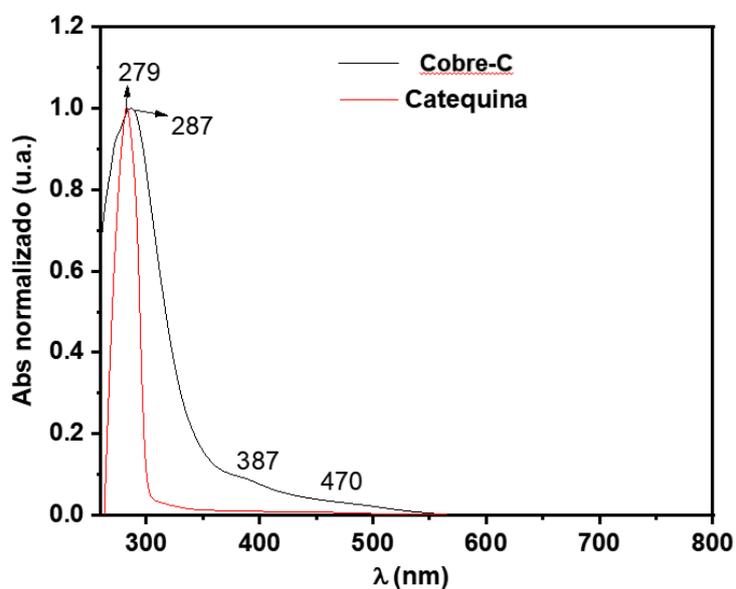
Os espectros estão relacionados com as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dentro do anel aromático das moléculas do flavonoide. Em comparação com os espectros de absorção dos flavonoides, a banda do complexo é deslocada para a região de menor comprimento de onda, característica da formação de um complexo. Tal mudança hipsocrômica pode ser explicada pela extensão do sistema conjugado com a complexação e a interação com o solvente DMSO.

Os espectros UV-vis fornecem informações significativas sobre os locais de coordenação de flavonoide, por exemplo, como o grupo 3-hidroxi apresenta um próton com caráter mais ácido, os grupos 3-OH e 4-oxo são os primeiros sítios estarem envolvido no processo de complexação. O 3,4-di-hidroxi grupos se ligam a um segundo íon metálico. O grupo 5-OH não está envolvido devido à menor acidez de prótons e ao impedimento estérico causado pela primeira complexação (Figura 12) (Souza e Giovani, 2004).

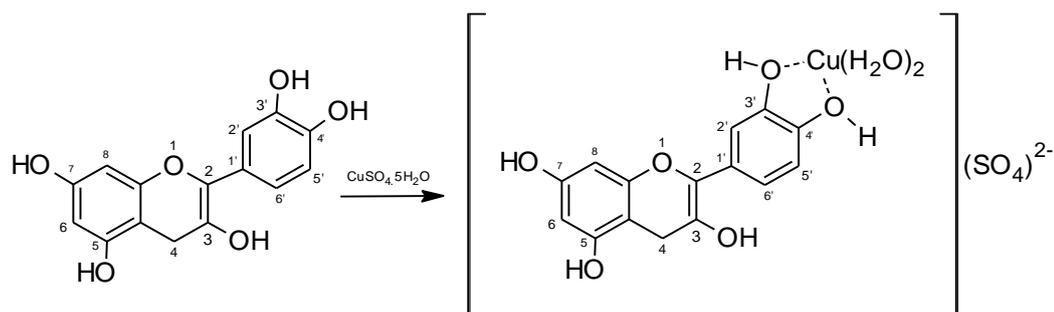


**Figura 12:** Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cobre-Q.

O espectro UV-vis da catequina livre e complexo Cobre-C em DMSO é descrito no gráfico 2. A análise do espectro eletrônico da catequina indicou um pico maior em 279 nm, que pode ser atribuído às transições  $\pi$ - $\pi^*$  dos grupos hidroxila fenólicos. Após a complexação, essa banda deslocou para maiores comprimentos de onda, possivelmente, devido ao aumento da conjugação do sistema. Além disso, no complexo, há o aparecimento de uma banda larga por volta de 400 nm atribuída a transição de carga. O esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cobre-C é descrito na figura 13.



**Gráfico 2:** Espectro eletrônico da catequina livre e após a complexação com íons  $\text{Cu}^{2+}$  no solvente DMSO



**Figura 13:** Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cobre-C.

### Atividade Antioxidante

Na avaliação da atividade inibitória frente aos radicais testados, DPPH• e ABTS<sup>+</sup>, não foram observadas diferenças tão significativas entre os resultados obtidos para os flavonoides na forma livre e para os complexos (**tabela 8**).

**Tabela 8:** Valor TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao TROLOX) pelo método DPPH• e ABTS<sup>+</sup> para os flavonoides Quercetina e Catequina nas formas livres e complexadas com Cobre (II)

Amostras	DPPH (μM ET)	ABTS (μM ET)
Quercetina	1501,70 ± 0,0	3161,73±6,9
Catequina	1409,44 ±1,18	3123,19±0,0
Cobre-Q	1308,89± 5,85	3911,03±0,0
Cobre-C	1426,67± 4,41	3171,79±0,0

μM ET: Micromolar de Equivalentes Trolox.

Os flavonoides na forma complexada foram tão efetivos frente ao DPPH• quanto na forma livre, com destaque para a quercetina na sua forma livre que apresentou efetividade superior as demais amostras (1501,70 ± 0,0 μM ET). Com relação a atividade frente ao radical ABTS<sup>+</sup> o complexo cobre-Q (3911,03±0,0 μM ET) foi bem mais efetivo que as demais amostras, inclusive a sua forma livre (3161,73±6,9 μM ET).

O potencial da atividade antioxidante dos flavonoides testados neste trabalho, já é relatado por outros autores. Em um estudo conduzido por Souza e Giovani (2004), foi observado que a catequina e quercetina apresentaram maior atividade antioxidante frente ao radical DPPH• na forma complexada com cobre quando comparado com os flavonoides na forma livre de cobre. Na mesma pesquisa foi comprovado que os flavonoides rutina e galangina, em coordenação com cobre, também foram mais ativos

frente ao radical de DPPH•. Em outro estudo, realizado por Afanas'eva, *et al.*, (2001), foi comprovado que o complexo do ligante biflavonoide rutina com metal de cobre, duplicou a captura de radicais livre.

Em estudo de Alper, *et al* (2019) o complexo de quercetina e cobre foi testado frente ao radical ABTS+ e apresentou ( $0.720 \pm 0.001$  mg TE/kg) atividade muito superior que o complexo de narigenina com cobre ( $0,030 \pm 0,001$  mg TE/kg) também sintetizado no mesmo trabalho, e os autores atribuíram esse resultado ao conteúdo fenólico da quercetina ser superior ao outro flavonoide.

A atividade antioxidante no método utilizando o radical DPPH• é dada pela capacidade que os compostos possuem em neutralizar o radical através da doação de um próton. E no método ABTS+ está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion o que leva um decréscimo na absorbância (Azevedo *et.al.*, 2018; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006). Geralmente os metabólitos com essa propriedade possuem em sua estrutura compostos de origem fenólica, que se caracterizam pela estrutura benzênica e possuem grupamentos com hidroxilas (-OH), o que possibilita reações químicas de oxidação e redução com os radicais livres (Silva, *et al.*,2010; Hernández & Prieto Gonzáles, 1999). Flavonoides que possuem maior número de grupamentos dessa natureza, possuem maior capacidade antioxidante como é o caso da Quercetina e Catequina (Souza e Giovani, 2004).

### Ensaio de Citotoxicidade

Foi observado que os padrões de flavonoides foram menos tóxicos que o padrão Violeta Genciana (CC50:  $4.4 \pm 0.01$  µg/mL), utilizado como controle positivo. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a catequina reduziu a viabilidade das células na concentração de  $25.4 \pm 0.02$  µg/mL quando comparado com a quercetina ( $11.2 \pm 1.14$  µg/mL), apontando que a catequina apresenta menor toxicidade, e ambos flavonoides possuem menor toxicidade que o padrão testado (**Tabela 9**).

**Tabela 9:** citotoxicidade frente a J774 cell line.

Amostra	Violeta Genciana	Catequina	Quercetina
<b>Citotoxicidade (CC50 ± S.E.M., µg/mL)</b>	$4.4 \pm 0.01$	$25.4 \pm 0.02$	$11.2 \pm 1.14$

### Atividade Antimalárica

O efeito antiplasmodial foi mais evidente para a amostra Cobre-Q frente a cepa D10, inibindo em cerca de 100,29%, com  $IC_{50}$   $4,23 \pm 2,45$  ng/mL. Para a cepa W2, resistente a cloroquina, o mesmo complexo apresentou efeito inibitório de 91,11 %, com  $IC_{50}$  de  $9,21 \pm 1,12$  ng/mL, sendo superior para ambas as cepas quando comparada com o flavonoide em sua forma livre que apresentou índice inibitório de 60,91% e 71,72% para D10 e W2, respectivamente. A catequina por sua vez, em forma livre, apresentou maior eficiência frente a W2, com inibição de 39,71%, já na forma complexada com cobre praticamente duplicou esse valor (62,48%), todavia esses índices só foram atingidos na concentração 20 ug/mL, os valores estão expostos na **tabela 10**.

**Tabela 10:** Atividade inibitória frente cepas de *P. falciparum*, D10 (sensível a CQ) e W2 (resistente a CQ)

Compostos	Triagem inicial concentração para 20 $\mu$ /ml		IC <sub>50</sub> determinação em ng/mL (S.D.)	
	D10 (% inibição)	W2 (% inibição)	D10 variação	W2 variação
<b>Quercetina</b>	60,91	71,72	$0,59 \pm 0,025$	$0,53 \pm 0,035$
<b>Catequina</b>	6,72	39,71	>20	>20
<b>Cobre-Q</b>	100,29	91,11	$4,23 \pm 2,45$	$9,21 \pm 1,12$
<b>Cobre-C</b>	88,5	62,48	>20	>20

Estudos descrevem que as complicações clínicas da malária em grande parte estão associadas as espécies reativas de oxigênio que tem como consequência o estresse oxidativo, são considerados um dos fatores que causam alterações na membrana da hemácia. A geração de espécies reativas de oxigênio no período infeccioso da malária pode ocorrer por dois mecanismos distintos. Em um desses acontece através da degradação da hemoglobina pelo protozoário com o intuito de originar novos bioprodutos. O ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) é oxidado a ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ), o grupo heme é dissociado da globina e os elétrons que se originam nesse mecanismo reagem com o oxigênio molecular, formando  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot}$ . Para combater essas moléculas radicalares, os

parasitas ativam enzimas antioxidantes, das quais podem ser citadas: glutationala peroxidase, glutationala redutase e tioredoxina redutase. O outro mecanismo necessita de ativação da resposta imune do organismo infectado, em que linfócitos T (Th1) produzem citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e os patógenos são fagocitados por macrófagos que quando ativados liberam óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (Erel *et al.*, 1997; Pabón *et al.*, 2003; Kawazu *et al.*, 2008; Ifoue *et al.*, 2009; Kapoor & Banyal, 2009).

Levando em consideração o mecanismo patogênico da malária, os resultados positivos da inibição frente as cepas testadas, podem estar relacionados ao potencial antioxidante dos flavonoides, comprovado neste trabalho quando testados frente aos radicais DPPH $\bullet$  e ABTS $^+$ . De acordo com Griffiths *et al.*, (2001) a capacidade antioxidante dos flavonoides é um dos fatores cruciais no tratamento da malária, considerando que estes metabólitos protegem as células dos danos causados pelos mecanismos oxidativos, doando átomos de hidrogênio para radicais do tipo peroxil e formando flavanol.

É evidente que as formas complexadas se tornaram bem mais eficientes na eliminação do protozoário. Munnik *et al* (2022), descreve que complexos organometálicos dos metais Rh, Ir e Ru conjugados com derivados de 2-fenilbenzimidazol potencializaram a atividade do derivado de benzimidazol e isso é explicado pela disrupção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), elevando a quantidade espécies reativas de oxigênio e levando ao stress oxidativo ocasionando a morte do *Plasmodium*.

Além do potencial antioxidante dos flavonoides registrados neste trabalho, outros mecanismos relacionados ao metal podem colaborar para esse resultado. Dentre os fatores que relacionam ao aumento da atividade de compostos coordenados ao cobre podem ser citados, inibição da atividade do proteassoma e da enzima telomerase, degradação de DNA e intercalação e também formação de espécies reativas. Vilarreal, *et al* (2022), complexaram o cobre com a cloroquina (CQ) e avaliaram frente a cepas suscetíveis a CQ (3D7) e resistentes a CQ (W2), o composto coordenado mostrou-se mais efetivo que a cloroquina na eliminação dessas cepas, e isso foi explicado pela maior interação com o DNA atuando como intercalador e também pelo aumento do potencial quelante à ferriprotoporfirina IX.

Santos (2010), descreve que algumas substâncias com atividade farmacológica, quando associadas a cátions metálicos intensificam sua biodisponibilidade, uma vez que aumentam a lipofilicidade do composto. A elevação dessa propriedade, proporciona maior absorção, distribuição, potência e eliminação do ativo. Isso pode ser associado ao que ocorre na coordenação dos flavonoides ao cobre, além disso, é relatado que metais podem agir com atividades semelhantes a enzimas que atuam nos processos inflamatórios, aumentando a toxicidade da substância sobre o parasita (Narciso & Nunes, 2010).

## **CONCLUSÃO**

No presente trabalho foi possível observar que o desenvolvimento de complexos metálicos contendo flavonoides como ligantes pode resultar em agentes antiparasitários com amplo espectro de ação. Neste estudo, a incorporação de quercetina e catequina em compostos de cobre (II) produziu agentes antimaláricos com as propriedades antimaláricas frente as cepas D10 e W2, sugerindo que a modificação química de metabólitos fortalece o desenvolvimento de medicamentos contra a malária, portanto, os dados aqui apresentados são de extrema relevância na compreensão de compostos inorgânicos, em especial complexos metálicos, como candidatos a agentes antimaláricos. Nos resultados da avaliação da atividade antioxidante, foi observado que os compostos coordenados foram efetivos tanto quanto os flavonoides em sua forma livre, isso contribui para a explicação da eficiência desses compostos frente as cepas plasmodiais, uma vez que o mecanismo patológico da malária está associado ao estresse oxidativo. A expressiva atividade antiplasmódica observada nos testes, principalmente do complexo Cobre-Q sobre a cepa W2, que é resistente a Cloroquina, reafirma a importância de aprofundar pesquisas futuras nesta área, com objetivo de elucidar esses mecanismos e inserir demais testes a outras cepas.

## **REFERÊNCIAS**

Alper, P., Erkisa, M., Genckal, H. M., Sahin, S., Ulukaya, E., & Ari, F. (2019). Synthesis, characterization, anticancer and antioxidant activity of new nickel (II) and copper (II) flavonoid complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1196, 783-792.

AFANAS“EVA, I. B.; OSTRAKHOVITCH, E. A.; MIKHAL“CHIK, E. V.; IBRAGIMOVA, G. A.; KORKINA, L. G. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. **Biochemical Pharmacology** v. 61, p. 677-684, 200.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] 3ª. ed. –2019. 740 p.: il. [acesso: 27 ago. 2021]. Disponível em: <https://bit.ly/3jlaidR>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Malária - 2020 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020. [acesso: 27 ago. 2021]. Disponível em: <https://bit.ly/3CGOI0t>.

Erel O. A, Abdurrahim Kocyigit A, Senel Avcı A, Necmeddin Aktepe A, Vedat Bulut B. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. **Clinical biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 631-639, 1997.

FRANCA, T. C. C.; M. G. DOS SANTOS; J. D. FIGUEROA-VILLAR. 2008. Malaria: Historical aspects and chemotherapy. *Química Nova*. 31 (5): 1271-1278.

KOCHAR, Dhanpat K. et al. *Plasmodium vivax* malaria. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 132, 2005.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedica*, v.18, n. 1, p. 12-14, Ciudad de La Habana, 1999.

LAPORTA GZ, LINTON YM, WILKERSON RC, et al. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. *Parasites Vectors* 8, 426 (2015). [acesso: 27 ago. 2021]. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1038-4>.

LEITE, F. H. A.; A. L. FONSECA.; R. R. NUNES.; M. COMAR JÚNIOR.; F. P. VAROTTI.; A. G. TARANTO. 2014. Malaria: From old drugs to new molecular targets. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. 2 (4): 59-76.

LI, Tian-Rong; YANG, Zheng-Yin; WANG, Bao-Dui. Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin Schiff base and its Cu (II), Ni (II), Zn (II) complexes. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 55, n. 1, p. 26-28, 2007.

Narciso, C. U., & Nunes, D. M. (2010). A QUÍMICA INORGÂNICA NA TERAPIA DO CÂNCER. *ANAIS DO SEMEX*, (3).

PORTES, Marcelo Cecconi. **Complexos imínicos de cobre com atividade antiparasitária frente à doença de chagas**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays**. *Food Res Int* 2006;39:791-800.

SILVA, Mariana da Cruz Borges. Avaliação farmacológica de complexos metálicos com amodiaquina para o tratamento da malária experimental. 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

SILVA, M. L. C., COSTA, R. S., DOS SANTOS SANTANA, A., & KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 669-681. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2010.

SOUZA, Rubens FV; DE GIOVANI, Wagner F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Redox Report**, v. 9, n. 2, p. 97-104, 2004.

WOLFARTH-COUTO B, SILVA RA, FILIZOLA N. Variabilidade dos casos de malária e sua relação com a precipitação e nível d'água dos rios no Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, [s.l.], 2019; 35(2):1-15. [acesso: 27 ago. 2021]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00020218> .

Munnik BL, Kaschula CH, Watson DJ, Wiesner L, Loots L, Chellan P. Synthesis and study of organometallic PGM complexes containing 2-(2-pyridyl) 89 benzimidazole as antiplasmodial agents. *Inorganica Chim. Acta.* 2022;540:121039.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para o estudo químico e biológico das espécies, além de contextualizar a importância do estudo biofarmacológico das plantas medicinais que são utilizadas popularmente para tratamento de doenças. A inserção de metabólitos, identificados em espécies de plantas amazônicas, em novas técnicas utilizando princípios da química inorgânica, podem se tornar alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos.

## REFERÊNCIAS

- ARGENTA, S. C., ARGENTA, L. C., Giacomelli, S. R., & Cezarotto, V. S. (2011). Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências*, 7(12), 51-60.
- DELBONE, C. A.C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. Congresso de Educação do Norte Pioneiro. 10ª edição. UENP-CCNE-CLA-Campus Jacarezinho. 2010. ISSN-1808-3579
- DE RYCKER, M., WYLLIE, S., HORN, D., READ, K. D., & GILBERT, I. H. (2022). Anti-trypanosomatid drug discovery: progress and challenges. **Nature Reviews Microbiology**, 1-16.
- Filho, V. C., & Yunes, R. A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, 21, 99-105.
- MÉNAN, H., BANZOZI, J. T., HOCQUETTE, A., PÉLISSIER, Y., BLACHE, Y., KONÉ, M., ... & VALENTIN, A. (2006). Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. **Journal of ethnopharmacology**, 105(1-2), 131-136.
- PHILLIPSON, J. David. Fitoquímica e plantas medicinais. *Fitoquímica*, v. 56, n. 3, pág. 237-243, 2001.
- PUJO, Jean Marc et al. Acurácia do SD Malaria Ag Pf/Pan® como teste de diagnóstico rápido na Amazônia Francesa. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, pág. 1-7, 2021.
- RASKIN, I. et al. Plants and Human Health in the Twenty-First Century. *Trends Biotechnology*, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.
- Reiners, A. A. O., Ricci, H. A., & de Souza Azevedo, R. C. (2010). Uso de plantas medicinais para tratar a malária. *Cogitare Enfermagem*, 15(3), 454-459.
- SILVA, Michele de Freitas Neves et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CASOS DE MALÁRIA ATENDIDOS EM SERVIÇO DE REFERÊNCIA DE ÁREA NÃO ENDÊMICA NA REGIÃO EXTRA-AMAZÔNICA. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102603, 2022.
- ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, p. 1608-1621, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria\\_diag\\_manual\\_final.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf)

David Pereira Neves. Parasitologia humana 11ª edição. 2009.

DE RYCKER, M., WYLLIE, S., HORN, D., READ, K. D., & GILBERT, I. H. (2022). Anti-trypanosomatid drug discovery: progress and challenges. **Nature Reviews Microbiology**, 1-16.

EWAN, J., 1962, Synopsis of the south american species of *Vismia* (Guttiferae). Bull. of the Unit. **States Nat. Mus.**, 35: 293-373.

FRANÇA, Tanos CC; SANTOS, Marta G. dos; FIGUEROA-VILLAR, José D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova** , v. 31, p. 1271-1278, 2008.

FRANÇOIS, Guido *et al.* Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships. **Parasitology research**, v. 85, n. 7, p. 582-588, 1999.

GONÇALVES, Ana Cristina Resende. **Ccomplexos de PdII, PtII e AuIII com tiossemicarbonas derivadas da diacetilmonooxima: síntese, caracterização, atividade antitrypanozoma cruzi e citotoxicidade.** 2016. 165f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

HUSSAIN, H., HUSSAIN, J., Al-Harrasi, A., SALEEM, M., GREEN, I., VAN R., T., y GHULAM, A. (2012). Chemistry and biology of genus *Vismia*. **Pharmaceutical Biology**, 50 (11), 1448-1462.

KUMAR, S., SHARMA, S., Y CHAATOPADHYAY, S. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, 89, 86-125, 2013.

LINS, A. C. S.; AGRA, M. F.; CONCEIÇÃO, D. C. O.; PINTO, F. C. T.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). **Rev. Virtual Quim.**, 2016, 8 (1), 157-168.

MÉNAN, H., BANZOUZI, J. T., HOCQUETTE, A., PÉLISSIER, Y., BLACHE, Y., KONÉ, M., ... & VALENTIN, A. (2006). Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. **Journal of ethnopharmacology**, 105(1-2), 131-136.

MOLYNEUX, Philip et al. O uso do radical livre difenilpicrilhidrazil (DPPH) para estimar a atividade antioxidante. **Songklanakarín J. sci. tecnologia**, v. 26, n. 2, pág. 211-219, 2004.

MORALLES, Vagner Antonio. **Síntese e caracterização de composto de coordenação com ligante de produto natural**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Universidade Estadual Paulista-Instituto de Química de Araraquara, Araraquara.

MARINHO, J. F.; VASCONCELLOS, J. N. Dispersão de sementes de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers.(Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 8, n. 1, p. 87-96, 1994.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recente achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 1070-1078, 2010.

NETO, P. T. P. F., DOS SANTOS, T. R., VARGAS, M. A., & MALDONADO, J. M. S. DE V. (2022). Desenvolvimento de novos medicamentos para doenças negligenciadas: uma análise bibliométrica. **Revista Eletrônica De Comunicação, Informação & Inovação Em Saúde**, 16(2). <https://doi.org/10.29397/reciis.v16i2.2380>.

NEWMANN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**. 2020;83:770–803

NOUNGOUE, D. T.; ANTHEAUME, C.; CHAABI, M.; NDJAKOU, B. L.; NGOUELA, S.; LOBSTEIN, A.; TSAMO, E. Anthraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*, **Phytochemistry**, v. 69, p. 1024-1028, 2008

OLIVEIRA, AH et al. Atividade antiinflamatória de *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extratos e atividade antifúngica contra *Sporothrix schenckii*. **Journal of ethnopharmacology** , v. 195, p. 266-274, 2017.

PASQUA, G.; MONACELLI, B.; CUTERI, A.; SPUNTARELLI, F.; RASCIO, N.; BOTTA, B.; MONACHE, D. G.; SCURRIA, R. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* DC. **Protoplasma**, v. 189, 9-16, 1995..

PEDROZA, Laila da Silva. **Estrutura molecular e atividade biológica de metabólitos secundários de espécies de Vismia Vand (Hypericaceae)**. 2019. 207 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

PIO CORRÊA, M., 1926, Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, 1o vol., 500.

PUJO, Jean Marc et al. Acurácia do SD Malaria Ag Pf/Pan® como teste de diagnóstico rápido na Amazônia Francesa. **Malaria Journal** , v. 20, n. 1, pág. 1-7, 2021.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.26, p.12311237, 1999

REICHARDT, H. G., 1878, Hypericaceae, pp. 181-212, t. 33-39. In: C. F. P. Martius, von., **Flora Brasiliensis**, vol. XII, pars. I (fasc. LXXXI).

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNCAO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. **INPA-DFID**, Manaus, Brasil, 816 pp, 1999.

DE SOUZA SANTOS, Ranieri Sales *et al.* ESTUDOS TRANSVERSAIS SOBRE A MALÁRIA (*Plasmodium falciparum*): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 5, 2019.

SANTA ROSA, Isabella Mota *et al.* Epidemiologia da Malária no Brasil e resultados parasitológicos, de 2010 a 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 11484-11495, 2020.

SEO, Eun-Kyoung *et al.* Novos compostos aromáticos bioativos de *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, pág. 35-42, 2000.

SILVINO, Ana Carolina Rios. **Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade na enzima do complexo citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e sua influência na falha terapêutica por primaquina**. 2019. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 2019.

SILVA, Michele de Freitas Neves *et al.* PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CASOS DE MALÁRIA ATENDIDOS EM SERVIÇO DE REFERÊNCIA DE ÁREA NÃO ENDÊMICA NA REGIÃO EXTRA-AMAZÔNICA. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102603, 2022.

SUFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; NEPOMUCENO, D. C.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts – Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.3, 287-290, 2006.

RODRIGUES, Danielle Fonseca. **Caracterização molecular das recidivas de *Plasmodium vivax* após tratamento com ACT: Estudo de polimorfismos relacionados à resistência do parasito e metabolismo alterado de CYP2D6**. 2020. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática)-Instituto René Rachou, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.

TALA, M. F.; TALONTSI, F. M.; WABO, H. K.; LANTOVOLOLONA, J. E. R.; TANE, P.; LAATSH, H. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guineensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 310-312, 2013.

VALADEAU, C.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A; C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L. F.; ROSÁRIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C.; GENEVIÉVE, B. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the

leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 413-422, 2009.

VIZCAYA, M.; MORALES, A.; ROJAS, J.; NUÑEZ, R. Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 11, n. 1, p. 12-34, 2012.

## ANEXOS

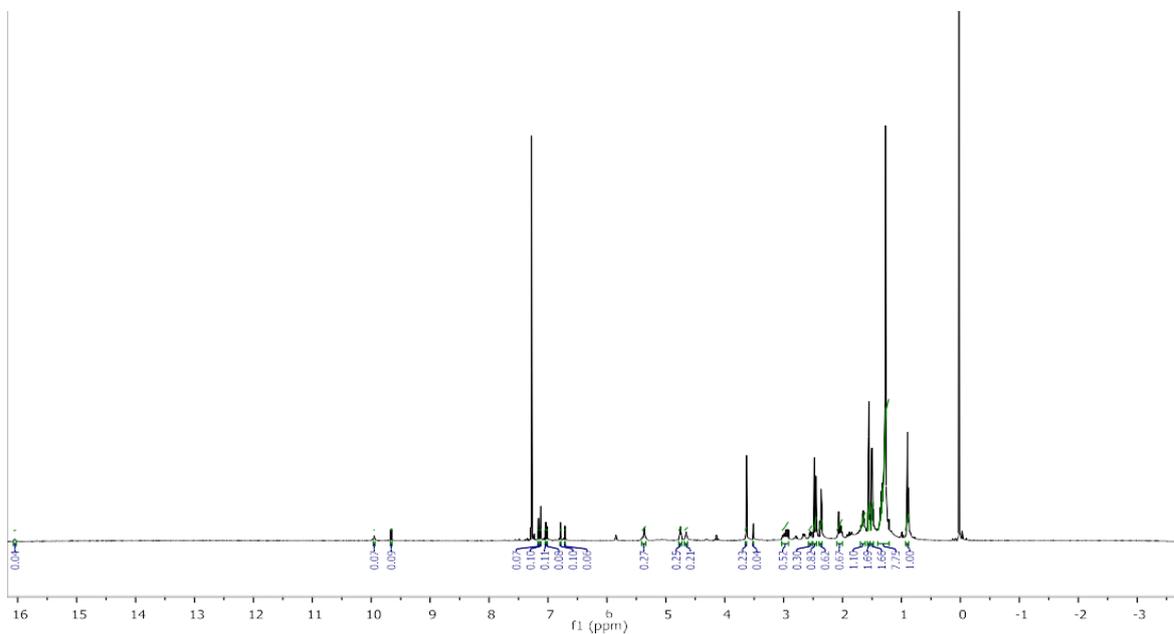


Figura 14: espectro de RMN-H<sup>1</sup> da amostra FR2-EVC 73-77

Mina\_amostra60\_Dominique\_06\_03\_22 #126 RT: 1,54 AV: 1 NL: 1,28E3  
F: ITMS - c APCI corona Full ms2 459,00@cid2C

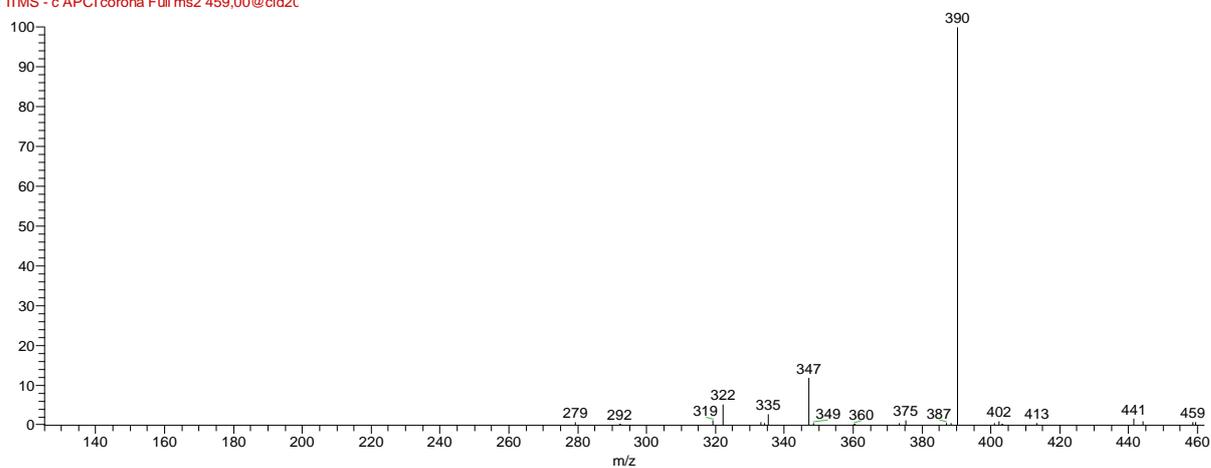
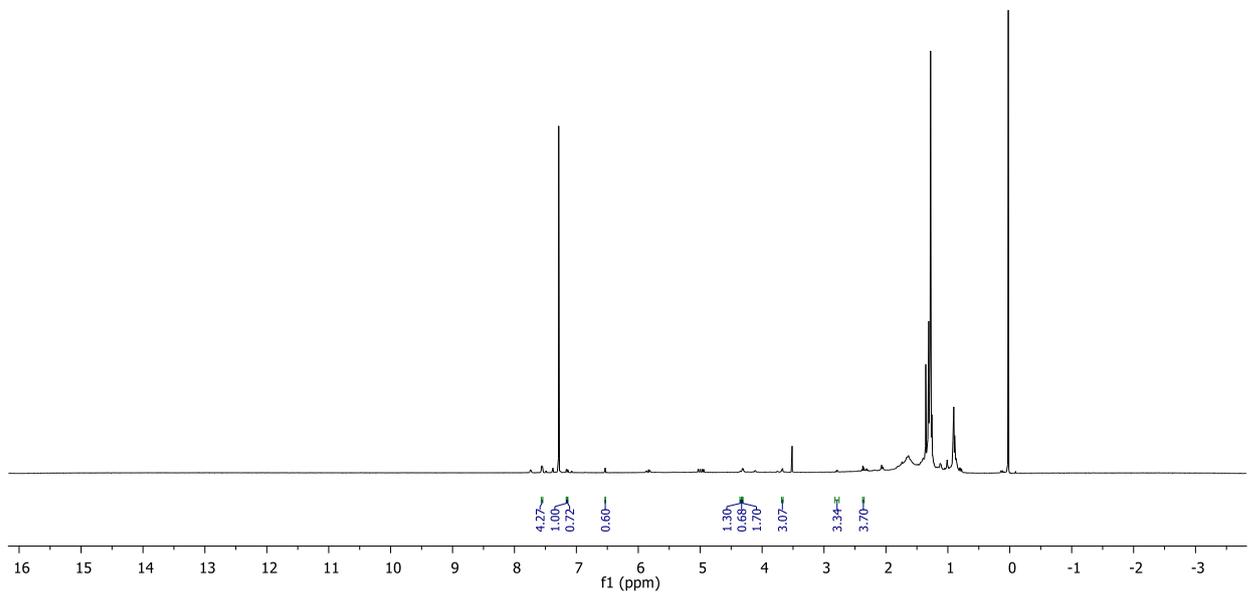
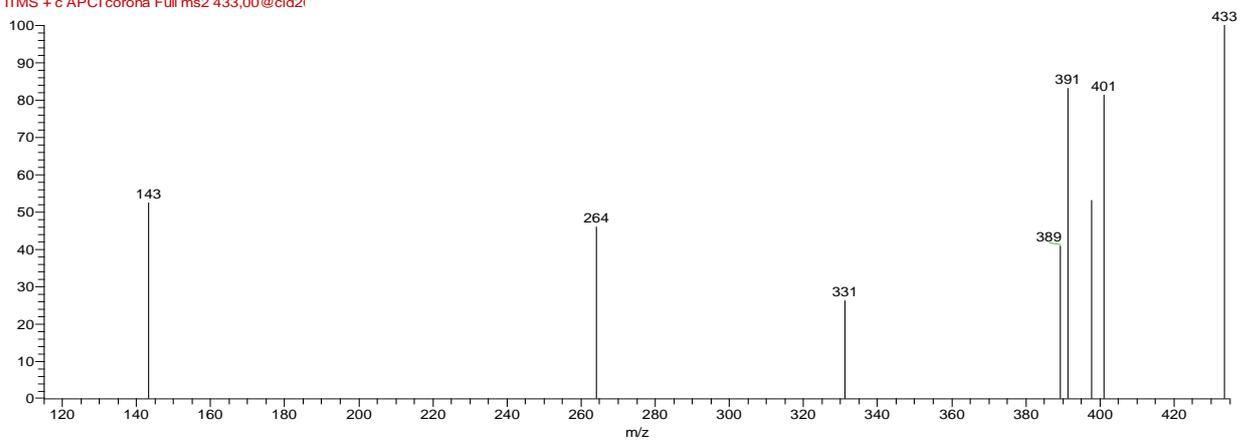


FIGURA 15: Espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 459 (-)



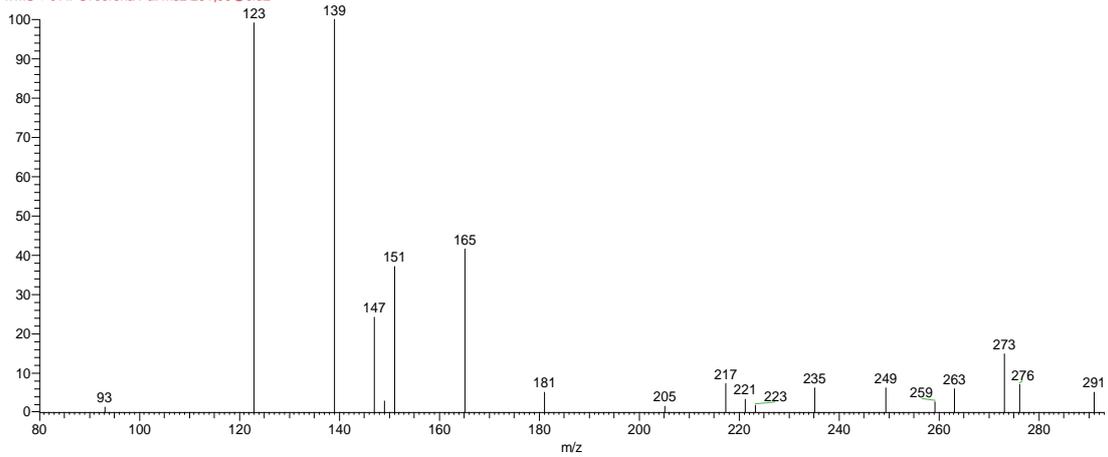
**Figura 16:** Espectro de RMN-H<sup>1</sup> da amostra FR1- EVG1

8\_msms #59 RT: 0.97 AV: 1 NL: 1.63E1  
 F: ITMS + c APCI corona Full ms2 433,00@cid2



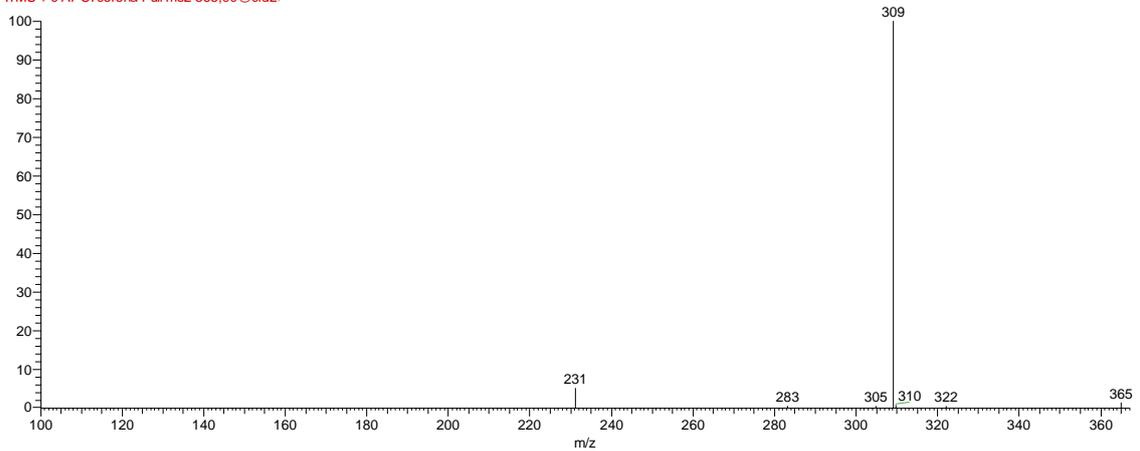
**Figura 17:** Espectro de fragmentação (+) massas da amostra FR2-EVG 1

Mna\_amostra49\_Dominique\_06\_03\_22 #57 RT: 0,82 AV: 1 NL: 1,50E2  
F: ITMS + c APCI corona Full ms2 291,00@cid2



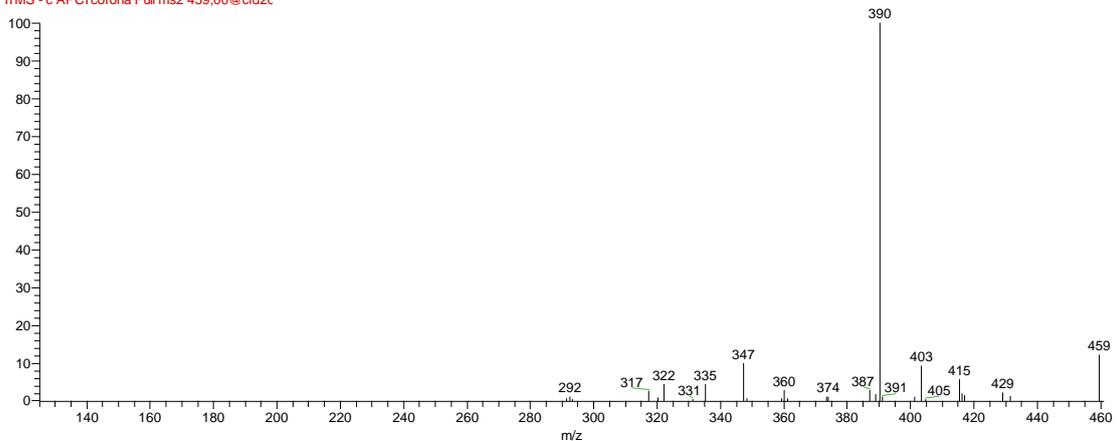
**Figura 18:** espectro de fragmentação MS-Ms do íon molecular 291(+)

Mna\_amostra53\_Dominique\_06\_03\_22 #38 RT: 0,55 AV: 1 NL: 7,02E2  
F: ITMS + c APCI corona Full ms2 365,00@cid2



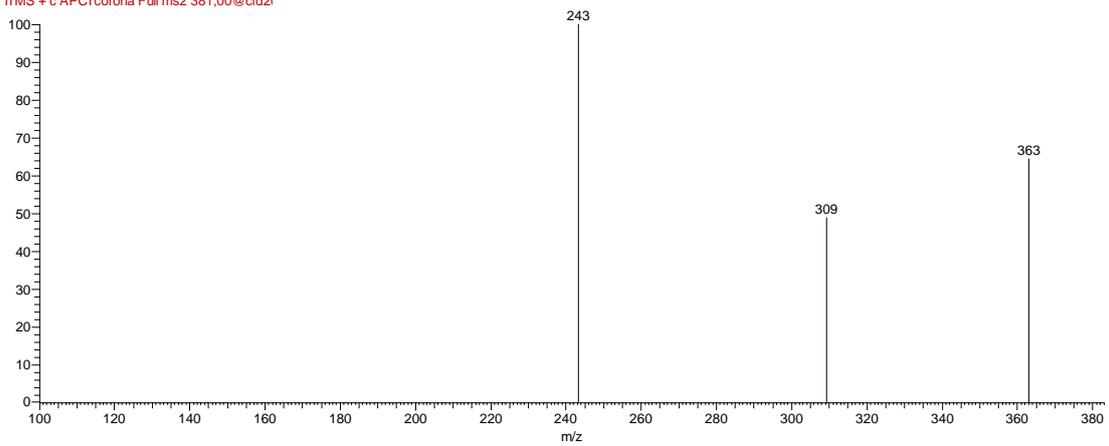
**Figura 19:** espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 365 (+)

Mna\_amostra54\_Dominique\_06\_03\_22 #229 RT: 3,36 AV: 1 NL: 5,87E2  
F: ITMS - c APCI corona Full ms2 459,00@cid2c



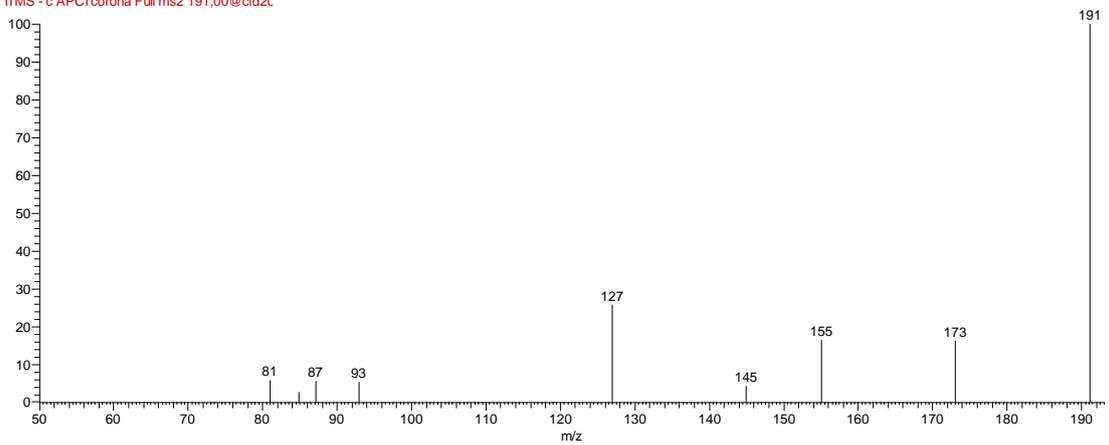
**Figura 20:** espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 459 (-)

Mina\_amostra53\_Dominique\_06\_03\_22 #51 RT: 0,76 AV: 1 NL: 6,83  
F: ITMS + c APCI corona Full ms2 381,00@cid2



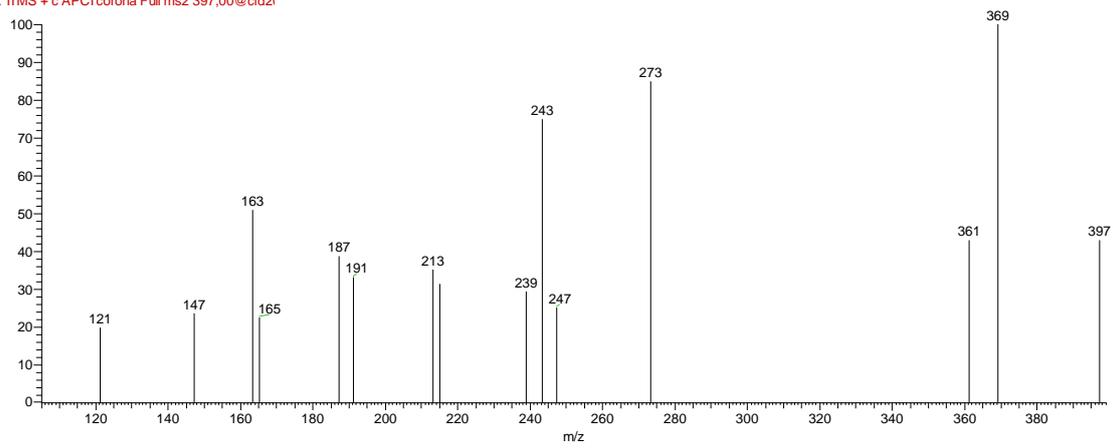
**Figura 21:** espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 381 (+)

Mina\_amostra57\_Dominique\_06\_03\_22 #125 RT: 1,57 AV: 1 NL: 5,78E1  
F: ITMS - c APCI corona Full ms2 191,00@cid2C

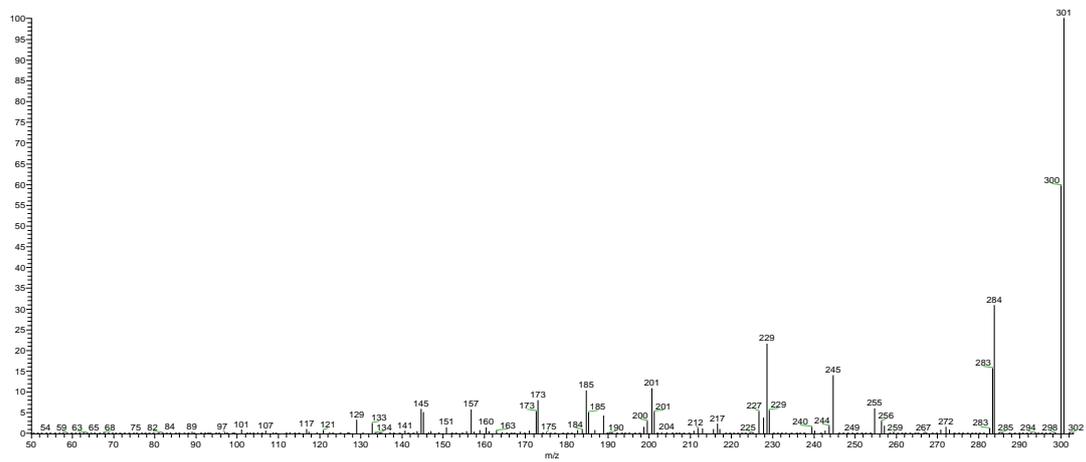


**Figura 22:** espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 191 (-)

Mina\_amostra57\_Dominique\_06\_03\_22 #71 RT: 1,03 AV: 1 NL: 8,60  
F: ITMS + c APCI coronas Full ms2 397,00@cid2



**Figura 23:** espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 397 (+)



**Figura 24:** espectro de fragmentação MS-MS do íon molecular 301 (+)