

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

ANIELE DA SILVA NEVES LOPES

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FRUTOS DE *Vismia* spp**

ITACOATIARA - AM  
2023

ANIELE DA SILVA NEVES LOPES

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FRUTOS DE *Vismia* spp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

**ORIENTADOR (A): PAULO JOSÉ DE SOUSA MAIA**

**COORIENTADORA: DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA DO CARMO**

ITACOATIARA - AM

2023

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L864p Lopes, Aniele da Silva Neves  
Perfil químico e atividades biológicas dos frutos  
de *Vismia* spp / Aniele da Silva Neves Lopes . 2023  
117 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Paulo José de Sousa Maia  
Coorientadora: Dominique Fernandes de Moura do Carmo  
Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos  
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Vismia*. 2. Leishmaniose. 3. Atividade biológica. 4.  
Antioxidante. 5. Complexos. I. Maia, Paulo José de Sousa. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título




## ANIELE DA SILVA NEVES LOPES

### Perfil químico e atividades biológicas dos frutos de *Vismia* spp


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovada em 07.06.23.

#### BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA DO CARMO  
Data: 18/07/2023 22:05:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dominique Fernande de  
Moura do Carmo  
(Presidente da banca)

Documento assinado digitalmente  
 GEONE MAIA CORREA  
Data: 18/07/2023 11:34:50 0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Geone Maia Corrêa

Documento assinado digitalmente  
 JEAN MICHEL DOS SANTOS MENEZES  
Data: 18/07/2023 20:01:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jean Michel dos Santos  
Menezes



*“A Deus por toda a sabedoria dada. A meu esposo que me apoiou nessa caminhada. E a meus pais e irmãos que nunca deixaram o amor faltar em nosso lar”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, pois sem ele eu não seria nada e me deu sabedoria e discernimento para chegar até aqui.

Ao meu esposo João Hugo, o amor para minha vida, que sempre me apoiou e acreditou que eu fosse capaz de realizar qualquer coisa que eu almejasse, mesmo sem eu mesma acreditar, foi fundamental em todo o percurso acadêmico e crescimento pessoal. Além disso, me fez perceber o mundo de maneira diferente e que não podemos nos preocupar com o dia de amanhã e sim viver um dia de cada vez.

Aos meus pais Aulénice e Zózimo, que criaram eu e meus cinco irmãos com muita luta, força e coragem, pois nossos dias nunca foram fáceis diante de tantas dificuldades e barreiras que enfrentamos.

Aos meus irmãos: Tiago, Ronielle, Tatiane, Tayane e Tais que são os melhores irmãos que eu poderia ter, sempre fazendo eu me sentir muito amada e feliz.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Mayanna, Vitor Hugo, Eberlanny, Rafaela e Ívina que incondicionalmente, me ajudaram de todas as formas possíveis e de maneiras inimagináveis, dando com certeza o apoio que todo o grupo de pesquisa deveria ter. Obrigada pelo carinho e dedicação de todos vocês.

Ao meu querido orientador Dr. Paulo José de Sousa Maia por ter depositado a confiança que eu conseguiria e ter me dado a oportunidade de estar no seu grupo de pesquisa. Mesmo estando tão distante, não deixou de dar a atenção que eu pedia. Gratidão!

À minha querida coorientadora Dr<sup>a</sup>. Dominique Fernandes, que sem sombra de dúvidas foi a pioneira em todo meu trajeto e que até hoje acredita no meu potencial. Ensinou-me a amar a química, passando todo o conhecimento e valores que devemos ter. Foi Deus que colocou essa pessoa maravilhosa no meu caminho e que costumo dizer que, talvez eu conseguiria chegar até aqui, mas nunca seria de maneira espetacular que os fatos aconteceram, por isso, minha eterna gratidão por ter me resgatado e depositado toda a confiança em mim.

Ao Dr. Felipe Moura que ajudou nas técnicas de cromatografia de alta resolução nos dando apoio necessário com os equipamentos da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas- UFAM.

À Dr<sup>a</sup>. Jaqueline de Araújo, que foi de extrema importância nos ensaios

antioxidantes, ensinando-me com mansidão as técnicas utilizadas para esse ensaio biológico na Centra Analítica do Instituto Federal do Amazonas-IFAM, além de estar colaborando sempre com artigos do grupo de pesquisa.

À Dr<sup>a</sup>. Isabel Reis, que contribuiu nas coletas, confecção de exsicatas e depósito em herbário para reconhecimento das espécies.

Ao Dr. Bruno Jensen, que na reta final abriu as portas do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, para realizar os ensaios de antileishmania.

Dr<sup>a</sup>. Ingrid Reis, por todas as contribuições com os experimentos antimicrobianos no Centro de Biotecnologia Avançada.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos por todo apoio e acessibilidade. Além disso, pela consolidação no conhecimento que esse programa possibilita aos seus mestrados. Aos professores membros da Banca Examinadora: Dr. Geone Maia e Dr. Jean Michel, por terem aceitado o convite de participar da defesa e dado contribuições muito valiosas.

À FAPEAM pelo apoio financeiro para a realização do projeto com o título “Compostos de coordenação com substâncias isoladas dos frutos de *Vismia spp*: síntese, caracterização e avaliação de atividades biológicas” do EDITAL N. 001/2021-FAPEAM Mulheres na Ciência. E por fim, a todas as pessoas que contribuíram com este estudo, direta ou indiretamente. Minha eterna gratidão!

*“Os que conhecem o teu nome confiam em ti,  
pois tu, Senhor, jamais abandonas  
os que te buscam”*

*Salmos 9:10*

## RESUMO

As espécies do gênero *Vismia* são popularmente conhecidas como pau-de-lacre ou lacre. São distribuídas em regiões tropicais como a Colômbia, Venezuela e Brasil. Entre as atividades biológicas das espécies *Vismia* destaca-se o grande valor terapêutico como antifúngicas, antitumorais, larvicidas, leishmanicida, anti-inflamatória, dentre outras atividades. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil químico dos extratos dos frutos das espécies *Vismia guianensis* e *Vismia cayennensis* e sintetizar por coordenação de Cu(II) os isolados dos frutos dessas espécies, além de avaliar atividades destes quanto à capacidade antioxidante, antimicrobiana, antileishmania *in vitro* e quantificação de fenóis totais. Os frutos foram macerados para obter a resina presente nessas espécies. Foram feitas extrações durante o período de 7 dias com solução hidroalcoólica a 70%. Os extratos obtidos foram codificados como EVC (*V. cayennensis*) e EVG (*V. guianensis*). Após procedimentos de extração sequencial com solventes orgânicos, foram obtidos os extratos: hexano (EHVC, EHVG), diclorometano (EDVC, EDVG), acetato de etila (EAVC, EAVG) e metanol (EMVC e EMVG). Os extratos foram avaliados quanto a capacidade antioxidante, frente aos radicais de DPPH e ABTS, o teor de fenólicos totais foi obtido espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. Na atividade antimicrobiana foi usando o método de difusão em Ágar frente as de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* e *Mycobacterium smegmatis*. Amostras foram avaliadas na atividade anti-leishmania, *in vitro*, contra as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) guyanensis* no período de 72 horas. Os extratos EDVC, EDVG, EHVC e EHVG passaram pela técnica de cromatografia em coluna de sílica e as frações analisadas por HPLC/UV e APCI/MS afim de identificar os constituintes. A técnica de RMN <sup>1</sup>H foi utilizada para identificar os constituintes isolados. A partir dos constituintes isolados foi possível fazer a síntese dos compostos de catequina e quercetina em mistura de metanol adicionada na solução metanólica de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. Através dos resultados foi possível isolar e identificar os fenólicos catequina, quercetina e fisicina, destes foram sintetizados dois complexos, a catequina (CAT-cp) e quercetina (QUER-cp). Através da técnica de RMN foi possível identificar a antraquinona fisicina. Dos ensaios biológicos, foi observada expressiva atividade

antioxidante dos extratos hidroalcóolicos frente aos radicais de DPPH e ABTS, assim como elevada capacidade antioxidante dos flavonoides quercetina, catequina. O complexo metálico sintetizado quercetina apresentou maior capacidade de captura do radical DPPH com IC<sub>50</sub> de 1787,6µM. Na atividade antimicrobiana foi identificada atividade baixa para a amostra EHVC frente a bactéria *E. faecalis*. Para a avaliação antileishmania, o extrato EVC exibiu o melhor IC<sub>50</sub> (74,39µg.mL) durante 48 horas para *L. amazonensis* e o complexo de quercetina apresentou melhor atividade contra *L. guyanensis* (78,66µg.mL). Diante dos resultados obtidos foi possível comprovar o potencial biológicos das duas espécies selecionadas para este estudo, além de comprovar um maior potencial biológicos dos complexos sintetizados oriundos de *V. cayennensis* e *V. guianensis*. A continuidade deste estudo se faz necessário para uma melhor elucidação do potencial antileishmania dos complexos metálicos obtidos (QUER-cp e CAT-cp).

Palavras-chave: Vismia; Leishmaniose; Atividade biológica; Antioxidante; Complexos.

## ABSTRACT

Species of the genus *Vismia* are popularly known as pau-de-seal or lacre. They are distributed in tropical regions such as Colombia, Venezuela and Brazil. Among the biological activities of *Vismia* species, the great therapeutic value stands out as antifungal, antitumor, larvicidal, leishmanicidal, anti-inflammatory, among other activities. Therefore, the objective of this research was to evaluate the chemical profile of the fruit extracts of the species *Vismia guianensis* and *Vismia cayennensis* and to synthesize by Cu(II) coordination the isolates of the fruits of these species, in addition to evaluating their activities regarding their antioxidant, antimicrobial capacity, antileishmania in vitro and quantification of total phenols. The fruits were macerated to obtain the resin present in these species. Extractions were performed during a period of 7 days with a 70% hydroalcoholic solution. The extracts obtained were coded as EVC (*V. cayennensis*) and EVG (*V. guianensis*). After sequential extraction procedures with organic solvents, the following extracts were obtained: hexane (EHVC, EHVG), dichloromethane (EDVC, EDVG), ethyl acetate (EAVC, EAVG) and methanol (EMVC and EMVG). The extracts were evaluated for their antioxidant capacity against DPPH and ABTS radicals, the total phenolic content was obtained spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu method. In the antimicrobial activity, the agar diffusion method was used against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* and *Mycobacterium smegmatis*. Samples were evaluated for anti-leishmanial activity, in vitro, against promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) guyanensis* within 72 hours. The EDVC, EDVG, EHVC and EHVG extracts underwent the silica column chromatography technique and the fractions analyzed by HPLC/UV and APCI/MS in order to identify the constituents. The <sup>1</sup>H NMR technique was used to identify isolated constituents. From the isolated constituents it was possible to synthesize the compounds of catechin and quercetin in a mixture of methanol added in the methanolic solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. Through the results it was possible to isolate and identify the phenolics catechin, quercetin and fission, from these two complexes were synthesized, catechin (CAT-cp) and quercetin (QUER-cp). Through the technique of NMR it was possible to identify the anthraquinone fissiones. From the biological assays, significant antioxidant activity of the hydroalcoholic extracts against DPPH and ABTS radicals was observed,

as well as a high antioxidant capacity of the flavonoids quercetin and catechin. The metal complex synthesized quercetin showed a greater capacity to capture the DPPH radical with an IC<sub>50</sub> of 1787.6µM. In the antimicrobial activity, low activity was identified for the EHVC sample against the bacteria *E. faecalis*. For the antileishmania evaluation, the EVC extract showed the best IC<sub>50</sub> (74.39µg.mL) during 48 hours for *L. amazonensis* and the quercetin complex showed the best activity against *L. guyanensis* (78.66µg.mL). Given the results obtained, it was possible to prove the biological potential of the two species selected for this study, in addition to proving a greater biological potential of the synthesized complexes from *V. cayennensis* and *V. guianensis*. The continuity of this study is necessary for a better elucidation of the anti-leishmanial potential of the metallic complexes obtained (QUER-cp and CAT-cp).

Keywords: *Vismia*; Leishmaniasis; Biological activity; Antioxidant; Complexes.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. <i>V. cayennensis</i> .....	30
Figura 2. <i>V. guianensis</i> .....	31
Figura 3. Coordenadas geográficas das espécies coletadas.....	32
Figura 4. Exsiccatas das espécies. (A) <i>V. cayennensis</i> ; (B) <i>V. guianensis</i> .....	32
Figura 5. Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cu-quercetina.....	38
Figura 6. Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cu-catequina.....	39
Figura 7. Espectro de massas do íon 301 m/z do extrato hidroalcoólico EVG .....	41
Figura 8. Proposta de fragmentação do íon 301 m/z em 283 e 245 m/z .....	41
Figura 9. Estrutura da molécula de quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) .....	42
Figura 10. Espectro de massas 289m/z na fonte APCI do extrato hidroalcoólico EVC .....	42
Figura 11. Proposta de fragmentação do íon 289 m/z em 245, 205 e 179 m/z .....	43
Figura 12. Estrutura dos compostos catequina .....	43
Figura 13. Espectro de massas 283m/z na fonte APCI da fração FRVC6-10. ....	44
Figura 14. Estrutura dos compostos fisciona.....	44
Figura 15. Espectro de HPLC/UV do composto de catequina encontrado na amostra EVC na faixa de 235 a 279nm .....	45
Figura 16. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da fração FRVG-4 do extrato hexânico de <i>V. guianensis</i> .....	46
Figura 17. Expansão da região do espectro de RMN <sup>1</sup> H de hidroxilas ligadas a carbonila da amostra FRVG-4 .....	47
Figura 18. Expansão da região do espectro de RMN <sup>1</sup> H dos aromáticos da amostra FRVG-4 .....	47
Figura 19. Expansão da região do espectro de RMN <sup>1</sup> H de uma metila da amostra FRVG-4. ....	48
Figura 20. Expansão da região do espectro de RMN <sup>1</sup> H de uma metoxila da amostra FRVG-4 .....	48
Figura 21. Estrutura química da substância 1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metilanttraquinona (fisciona).....	49

Figura 22. Espectro eletrônico da quercetina livre e complexada em DMSO.....	50
Figura 23. Espectro eletrônico da catequina livre e após a complexação com íons Cu <sup>2+</sup> no solvente DMSO .....	51
Figura 24. Espectros de infravermelho dos complexos sintetizados neste trabalho na faixa de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> em pastilhas de KBr. ....	51

## CAPÍTULO II

Figura 1. Parasitas da <i>Leishmania</i> na forma promastigotas (A) e amastigotas (B) ...	54
Figura 2. Distribuição geográfica e reservatório fundamental das principais <i>Leishmania</i> spp do mundo.....	55
Figura 3. Método de antibiose por difusão em ágar. ....	60
Figura 4. Mecanismo de reação de um fenol com o radical DPPH.....	62
Figura 5. Atividade antileishmania de <i>Vismia</i> contra <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584). (A) EVC; (B) EHVG; (C) EDVG; (D) EDVC; (E) CAT; (F) QUER; (G) PTM (Pentacarinat®); (H) GLUC (Glucantime®). Os parasitas (106 células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações a 25°C e avaliados de 24 às 72 horas. Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0 µg.mL <sup>-1</sup> ) e Isetionato de pentamidina (Pentacarinat® 0,7 µg.mL <sup>-1</sup> ) foram usados como controle positivo. O controle negativo foram os parasitas expostos ao DMSO à 1%. ....	64
Figura 6. Atividade antileishmania de <i>Vismia</i> contra <i>L. (Leishmania) guyanensis</i> . (A) EVC; (B) QUER; (C) GLUC (D) CAT; (E) PTM. Os parasitas (106 células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações a 25°C e avaliados de 24 às 48 horas. Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0 µg.mL <sup>-1</sup> ) e Isetionato de pentamidina (Pentacarinat® 0,7 µg.mL <sup>-1</sup> ) foram usados como controle positivo. O controle negativo foram os parasitas expostos ao DMSO à 1% .....	66
Figura 7. Amostra EHVC em ensaio antimicrobiano com <i>E. faecalis</i> ATCC 29212...	67

## LISTA DE TABELA

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Código e rendimento das amostras de extratos orgânicos dos frutos de <i>Vismia</i> .....	40
Tabela 2. Código e rendimento das amostras de extrato hidroetanólico dos frutos de <i>Vismia</i> .....	40
Tabela 3. Dados de RMN <sup>1</sup> H (400MHz) para o composto fisiona .....	49

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos. *microlitro de Equivalentes de Trolox; **miligramas de Equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. CAT-BCP: complexo de catequina, QUER-CP: complexo de quercetina...61	
Tabela 2. Atividade antileishmania para as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e valores calculados de IC <sub>50</sub> por regressão linear das amostras obtidas de <i>Vismia</i> . GLUC: Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0 µg.mL <sup>-1</sup> ) ; (PTM): Isetionato de pentamidina (Pentacarinat®) .....	63
Tabela 3. Atividade antileishmania para as formas promastigotas de <i>L. guyanensis</i> e valores calculados de IC <sub>50</sub> por regressão linear das amostras. GLUC: Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0 µg.mL <sup>-1</sup> ) ; (PTM): Isetionato de pentamidina (Pentacarinat®) .....	65
Tabela 4. Atividade antimicrobiana conforme o halo de inibição dos extratos de <i>Vismia</i> . Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm. Negativo (-): ausência de halo .....	67

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

Ilustração 1. Esquema geral da extração hidroetanólica.....	33
Ilustração 3. Esquema de fracionamento dos extratos de diclorometano de <i>Vismia</i> .35	
Ilustração 4. Esquema de fracionamento dos extratos hexânicos de <i>Vismia</i> . ....	36
Ilustração 5. Esquema de precipitação dos cristais e análise em CCD para a fração FRVG-4 de EHVG.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
- APCI/MS - Atmospheric Pressure Chemical Ionization/ Mass Spectrometry
- ATCC - American Type Culture Collection
- CAT - Catequina
- CAT-cp - Complexo de catequina
- CCD - Cromatografia em Camada Delgada
- COSAS - Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde
- COSY - Homonuclear Correlation Spectroscopy
- DN - Doenças Negligenciadas
- DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- EAG - Equivalentes de Ácido Gálico
- EAVC - Extrato Acetato de Etila de *Vismia cayenensis*
- EAVG - Extrato Acetato de Etila de *Vismia guianensis*
- EDVC - Extrato Diclorometano de *Vismia cayennensis*
- EDVG - Extrato Diclorometano de *Vismia guianensis*)
- EHVC - Extrato Hexânico de *Vismia cayennensis*
- EHVG - Extrato Hexânico de *Vismia guianensis*
- EMVC - Extrato Metanólico de *Vismia cayennensis*
- EMVG - Extrato Metanólico de *Vismia guianensis*
- ET - Equivantes de Trolox
- EVC - Extrato Hidroalcoólica de *Vismia cayennensis*
- EVG - Extrato Hidroalcoólica de *Vismia guianensis*
- FT - Fenóis Totais
- GLUC - Glucantime®
- HPLC/MS - High-Performance Liquid Chromatography/Mass spectrometry
- HPLC/UV - High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection
- IC<sub>50</sub> - Concentração Inibitória para 50%
- INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
- LC - Leishmaniose cutânea
- LCM - Leishmaniose mucocutânea
- LT - Leishmaniose Tegumentar
- LV - Leishmaniose visceral

MHz - Megahertz  
NP/PEG - Natural Products Reagent/polietilenoglicol  
PTM - Pentacarinat®  
QUER - Quercetina  
QUER-cp - Complexo de quercetina  
RMN - Ressonância Magnética Nuclear  
RPMI - Roswell Park Memorial Institute  
SFBi - Soro Fetal Bovino Inativado  
SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado  
TEAC - Rolo Equivalent Antioxidant Capacity  
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro  
UV - Ultravioleta  
UV/vis - Ultravioleta visível  
WHO - World Health Organization

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. JUSTIFICATIVA .....	23
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. OBJETIVO GERAL.....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>25</b>
AVALIAÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES DE <i>Vismia</i> .....	25
1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
1.1.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	26
1.1.2 FAMÍLIA HYPERICACEAE .....	27
1.1.3 GÊNERO VISMIA.....	28
1.1.4 <i>Vismia cayennensis</i> .....	29
1.1.5 <i>Vismia guianensis</i> .....	30
2.1 METODOLOGIA.....	32
2.1.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO .....	32
2.1.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO A 70%.....	33
2.1.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS HEXANO, DICLOROMETANO, ACETATO DE ETILA E METANOL.....	34
2.1.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETANO.....	35
2.1.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO.....	35
2.1.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	36
2.1.7 REVELADORES.....	37
2.1.8 AVALIAÇÃO QUÍMICA POR APCI/MS (IONIZAÇÃO QUÍMICA DE PRESSÃO ATMOSFÉRICA/ ESPECTROMETRIA DE MASSA).....	37
2.1.9 ANÁLISE POR HPLC/UV (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA/ULTRAVIOLETA) SEMI-PREPARATIVO.....	37
2.1.10 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	38
2.1.11 SÍNTESE DOS COMPLEXOS.....	38
2.1.11.1 SÍNTESE DO COMPLEXO Cu-quercetina (QUER-cp) .....	38
2.1.11.2 SÍNTESE DO COMPLEXO Cu-catequina (CAT-cp).....	39
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS .....	39

3.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES.....	40
3.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA FRVG-4 DO EXTRATO EHVG POR RMN 1H.....	45
3.1.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS.....	49
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>53</b>
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Vismia</i> .....	53
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	54
1.1.1 LEISHMANIOSES: DOENÇA TROPICAL.....	54
1.1.2 RADICAIS LIVRES: A BUSCA POR ANTIOXIDANTES.....	56
1.1.3 ANTIMICROBIANOS: RESISTÊNCIA A FÁRMACOS.....	58
2.1 METODOLOGIA.....	58
2.1.1 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	58
2.1.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.....	59
2.1.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO CÁTION RADICAL ABTS.....	59
2.1.4 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	59
2.1.4.1 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS E PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA.....	59
2.1.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (IC <sub>50</sub> ) DOS EXTRATOS DE <i>Vismia</i> .....	59
2.1.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
2.1.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	60
3.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
3.1.1 POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	61
3.1.2 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	63
3.1.2.1 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA FRENTE A <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	63
3.1.2.2 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA FRENTE A <i>Leishmania (Leishmania) guyanensis</i> .....	65
3.2.3 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA.....	67
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
5 REFERÊNCIAS.....	70



## 1. INTRODUÇÃO

Doenças Negligenciadas (DN) são um conjunto de enfermidades que atingem a população em situação de pobreza, sendo causada por agentes infecciosos e parasitários como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (SOUZA *et al.*, 2012). A maioria das DN, concentra-se nas regiões pobres da África, Ásia e América Latina (MARTINS-MELO *et al.*, 2016; NASSIF *et al.*, 2017; VARIKUTI *et al.*, 2018). Foram definidas entre DN, sete em prioridades de atuação que compõem o programa em doenças negligenciadas: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (DE PRIORIDADES, 2010).

No Brasil as DN são consideradas um problema de saúde pública, sendo importante causa de incapacidade e morte prematura, no entanto a maioria dessas doenças são preveníveis e/ou tratáveis com intervenções altamente eficientes (MEURER; COIMBRA, 2022). Entre os países latino-americanos, o Brasil é responsável por 39% dos casos de leishmaniose tegumentar e 93% dos casos de leishmaniose visceral (GARCIA *et al.*, 2011; GAMBINO; OTERO Á, 2019).

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, cuja transmissão em humanos se dá pela picada da fêmea do inseto flebotomíneo infectado (GONTIJO; MELO, 2004). A leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica em cinco continentes, com casos humanos relatados em cerca de 54 países localizados em regiões tropicais e subtropicais (MARCONDES; ROSSI, 2013). Atualmente vem se desenvolvendo para áreas urbanas e tornou-se um crescente problema de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano (LE MOS *et al.*, 2010). É distribuída em quatro das cinco regiões do Brasil, com exceção apenas da Região Sul, isso se deve a expansão de área geográfica e à urbanização (FURLAN, 2010).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) pode ser encontrada nas cinco regiões do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), torna-se uma das infecções dermatológicas mais importantes, pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). É uma doença cutânea que evolui para úlceras em pele e/ou mucosas que podem ser únicas, múltiplas, disseminada ou difusa, apresentando bordas elevadas e fundo granuloso, geralmente indolor (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012). No período de 2008 a 2018 no Brasil, ocorreram mais de 230 mil casos de LT, predominantemente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-

Oeste (SINAN/SVS/MS, 2019).

O tratamento para um paciente com a *Leishmania* consiste em antimoniais pentavalentes (Glucantime), medicamento utilizado por décadas (CARVALHO *et al.*, 2019) e que traz grandes efeitos colaterais para o organismo humano, dentre eles estão: náusea, vômito, fraqueza e mialgia, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade (NASSIF *et al.*, 2017). Além dos antimoniais, caso haja resistência ao tratamento, é utilizado a anfotericina B (MURBACK *et al.*, 2011), recentemente a Mitelfosina vem sendo empregado com sucesso na Ásia (SOUZA *et al.*, 2012).

Muitas plantas dos biomas brasileiros têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções microbiana (ALVES, *et al.*, 2000).

Além da leishmaniose, diversas outras doenças atingem a população em situação de vulnerabilidade socioeconômica. Inúmeros estudos são realizados para descobertas de fitoterápicos que apresentam atividades positivas contra microrganismos e até mesmo com ação antioxidante para corpo humano e que não apresentam um efeito tóxico e colaterais ao organismo. A procura por compostos fenólicos derivados de plantas, deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química que desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres (SOUSA *et al.*, 2007). Além disso, a busca por fármacos para o tratamento de doenças infecciosas é derivada ou baseada em produtos naturais (NAGLE *et al.*, 2014), devido a atual resistência dos microrganismos para os medicamentos existentes.

O estresse oxidativo causado pelos radicais livres acomete diversos efeitos no organismo humano, como o envelhecimento precoce, inflamações, câncer, aterosclerose, vaso espasmos e doença de Alzheimer (KAUR *et al.*, 2014). Estudo já realizado apresentou resultado positivo com extrato de *Vismia* para atividade antioxidante (LINS *et al.*, 2016). Hussein *et al.*, (2003) constataram atividade citotóxica contra três linhagens diferentes de células cancerígenas com extratos de folhas de três espécies de *Vismia*.

Vários estudos tem demonstrado o potencial de complexos metálicos com o cobre para o tratamento de patologias apresentando atividade promissora com ação antimalárica, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e

antileishmania. Por exemplo, Krasnovskaya *et al.* (2020) mostraram que alguns  $\alpha$ -complexos de hidroxicarboxilato de cobre (II)  $CuL_2$  (L = lactato, trifluorolactato, 2-hidroxiisobutirato, trifluoro-2-hidroxiisobutirato) apresentaram o modo de ação frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis* com o centro metálico sendo responsável pela atividade do complexo e os ligantes geralmente não são bioativos, mas estão presentes para estabilizar e proteger o centro metálico reativo.

Desse modo, esse projeto teve como objetivo avaliar o perfil químico dos exsudatos de espécies de *Vismia* com o intuito de isolar os constituintes majoritários, além de sintetizar compostos de coordenação a partir das substâncias isoladas de duas espécies desse gênero e com isso avaliar o efeito sinérgico do centro metálico e das substâncias isoladas desse produto natural frente a atividade antileishmania, antioxidante e antimicrobiano. A presente pesquisa contribui com dados de caracterização dos constituintes químicos do exsudado, além da comprovação farmacológica dos compostos sintetizados. A abordagem integrada dos dados biológicos e químicos podem impulsionar esse campo de estudo na busca por novos agentes terapêuticos.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Espécies vegetais do gênero *Vismia* apresentam grande interesse terapêutico. Conhecida popularmente como lacre, produz um exsudado resinífero, muito utilizado para fins medicinais apresentando diversas atividades biológicas (LORENZI; SOUZA, 2001). Muitas atividades já foram identificadas para diferentes espécies desse gênero, atividades anti-inflamatória, antimalárica, antimicrobiana, antigigênica e outras (OLIVEIRA *et al.*, 2016; PEDROZA, 2019). Atividades estas que são de grande interesse para a indústria farmacêutica, além disso, pode ser uma alternativa econômica e eficaz para a população, causando os mínimos impactos possíveis na saúde das pessoas.

A escassez para o tratamento da DN leishmaniose vem sendo uma grande preocupação de saúde pública, isso devido aos medicamentos à base de antimoniais pentavalentes que acabam trazendo efeitos adversos aos pacientes que variam de leves a graves, além da resistência do parasito ao tratamento, visto que, esse medicamento vem sendo utilizados por muitos anos (BRASIL, 2017).

Estudos químicos apontam sua composição como principal responsável por tais

atividades biológicas (HUSSEIN *et al.*, 2012; VIZCAYA *et al.*, 2012). Com base no potencial químico, biológico e na escassez de medicamentos que possam ser alternativa no tratamento de leishmaniose, esta pesquisa consistiu em avaliar o potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos, analisar o potencial antioxidante contra radicais livre e testar o potencial antileishmania, além de isolar constituintes químicos e sintetizar esses compostos afim de explicar tais atividades a partir de extratos orgânicos das espécies de *V. cayennensis* e *V. guianensis*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Sintetizar compostos coordenação de Cu (II) a partir de compostos isolados dos frutos de *V. guianensis* e *V. cayennensis* e a avaliar estes quanto à capacidade antioxidante, antimicrobiana e atividade antileishmania in vitro.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Isolar os constituintes majoritários através da técnica de APCI/MS e HPLC/UV SEMI-PREPARATIVO dos extratos brutos dos frutos de *V. cayennensis* e *V. guianensis*;
- ✓ Identificar e elucidar as substâncias isoladas através das técnicas de RMN de <sup>1</sup>H.
- ✓ Quantificar o teor de compostos fenólicos totais nos extratos brutos;
- ✓ Sintetizar e caracterizar os complexos metálicos de cobre (II) a partir da obtenção dos compostos orgânicos obtidos das espécies selecionadas;
- ✓ Analisar a atividade antioxidante dos extratos e dos complexos pelos métodos do radical livre DPPH e ABTS;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos das folhas de espécies de *Vismia*;
- ✓ Testar a atividade dos complexos e extratos contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) guyanensis*.

# CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES DE *Vismia*

## 1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1.1 PLANTAS MEDICINAIS

A humanidade faz o uso de diversas plantas com finalidade fitoterapêutica para o tratamento e a cura de doenças (CÉSAR, 2014). O resultado do uso dessas plantas considerou que plantas medicinais são capazes de aliviar ou curar enfermidades e que tem tradição de uso como remédio pelas pessoas (ANVISA, 2020). Essa prática vem se tornando bastante comum, até mesmo na indústria farmacêutica e cosmética, tanto na produção de fragrâncias como de medicamentos (BORGES, 2017).

Plantas medicinais são comercializadas em mercados populares, em feiras livres e encontradas em quintais de residências, e é por isso que grande parte da população utiliza estes fármacos como alternativa para tratamento de doenças (LEÃO *et al.*, 2007). Além do fácil acesso, ainda permanecem barreiras encontradas pela população carente, como os altos custos dos medicamentos e as dificuldades de acesso a uma consulta médica (DA SILVA *et al.*, 2010). Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA *et al.*, 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), cerca de 4 bilhões de pessoas que vivem nos países em desenvolvimento confiam no poder de cura das plantas e por esta razão as utilizam com frequência (KADIR *et al.*, 2012). Essa utilização, muitas vezes é baseada apenas no conhecimento popular para a recuperação ou a cura da saúde das pessoas, não sendo cientificamente testado e aprovado, ao contrário dos medicamentos fornecidos pelas farmácias. Em muitos casos as pessoas subestimam as propriedades medicinais das plantas e fazem uso delas de forma aleatória. Entretanto, cada vegetal, em sua essência, pode ser alimento, veneno ou medicamento (FRANÇA *et al.*, 2008).

O conhecimento do uso popular de plantas medicinais proporciona para a comunidade científica a descoberta de fármacos e elucidação dos seus efeitos farmacológicos (MARO, 2017). Fármacos são princípios ativos responsáveis pelas respostas medicinais relatadas pelo homem, sendo a principal substância da formulação do medicamento (XAVIER *et al.*, 2015), quando um fármaco se encontra misturado com outras substâncias, como por exemplo, nos chás medicinais e extratos, estes são conhecidos como fitoterápicos (CARMONA *et al.*, 2013).

A utilização de planta medicinal equivocadamente para o alívio das diferentes

afecções pode acarretar efeitos adversos, e os produtos fitoterápicos devem apresentar comprovação de eficácia e segurança, visto que diversos compostos apresentam toxicidade a saúde humana, inclusive para uso na gravidez e lactação (DUARTE *et al.*, 2018).

### 1.1.2 FAMÍLIA HYPERICACEAE

Uma família que se destaca pelo seu potencial químico e biológico, além de ser amplamente utilizada como fitoterápico é a Hypericaceae (OSORIO, 2019). Com bases de estudos filogenéticos, a família Hypericaceae deixou de ser incluída em Clusiaceae e passou a ser uma família independente, passando a ser de um grupo irmã da Clusiaceae (RUHFEL *et al.*, 2011; APG IV, 2016). A família Hypericaceae é constituída por nove gêneros, entre os quais se distribuem 540 espécies em regiões de clima temperado e tropical (STEVENS, 2007). O gênero *Hypericum* é o mais numeroso, incluindo 469 espécies, de acordo com os dados de Crockett e Robson (2011). No Brasil, há somente dois gêneros dessa família: *Vismia* contendo cerca de 30 espécies, mais abundante na região amazônica e *Hypericum* com 23 espécies e maior variedade no sul do país (MARTINS *et al.*, 2018).

A família Hypericaceae apresentam geralmente hábito arbustivo ou herbáceo, ausência de látex colorido, presença de seiva resinosa translúcida ou preta, ovário súpero, estilete alongado e estigma diminuto (JUDD *et al.*, 2009). Nas suas espécies foram identificadas diversas estruturas secretoras como ductos e cavidades de diferentes diâmetros e extensão. Tais estruturas podem acumular material translúcido ou enegrecido, em geral, ricos em compostos fenólicos (TEKIN *et al.*, 2017). As folhas em geral possuem glândulas evidentes na face inferior, podendo ter coloração enegrecida. As peças florais, frutos e até mesmo as sementes também apresentam glândulas (MARINHO *et al.*, 2016).

Plantas dessa família produzem uma série de oxidados e poliisoprenilados benzofenonas, algumas das quais são estruturalmente complexas e biologicamente ativos (CUESTA-RUBI *et al.*, 2005), bem como componentes de óleo essencial que são mais hidrofóbicos por natureza (CROCKETT, 2010).

Na região amazônica, existem diversas espécies de plantas medicinais de uso local, com possibilidade de gerar medicamentos com menor custo para a população (GOMES *et al.*, 2011). O gênero que se destaca na região amazônica é o de *Vismia*,

do qual são conhecidas diversas atividades biológicas como ação antibacteriana, antimalárica, antifúngica, antioxidante, entre outras (OSORIO, 2019). No Estado do Amazonas, a família Hypericaceae está representada por 18 espécies de *Vismia* (VOGEL ELY *et al.*, 2019).

### 1.1.3 GÊNERO VISMIA

O gênero *Vismia* Vand. pertencente a família Hypericaceae, possui cerca de 61 espécies distribuídas no mundo todo, sendo 41 espécies encontradas no Brasil (VOGEL ELY *et al.*, 2019). As espécies desse gênero habitam nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e Central e apenas algumas espécies são encontradas na África (HUSSAIN *et al.*, 2012). No Brasil ocorrem nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, em domínios fitogeográficos como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, sendo 18 espécies no Estado do Amazonas (VOGEL ELY *et al.*, 2019). Espécies *Vismia* dominam grandes clareiras de perturbação da floresta tropical na bacia amazônica (CHAMBERS *et al.*, 2009).

Espécie de *Vismia* são conhecidas popularmente por “Lacre” e são caracterizadas por serem árvores ou arvoretas com base do tronco reta, possuem folhas com pilosidade ferrugínea apresentando coloração verde na região superior e marrom na região inferior, possuem também látex alaranjado, e geralmente ocorrem em vegetação secundária (TALA *et al.*, 2013; VIZCAYA *et al.*, 2012). Em um estudo foi constatado a capacidade do gênero *Vismia* em resistir a altas temperaturas podendo até rebrotar em áreas que sofreram com queimadas, e também sua insistência em permanecer em área de pastagem sendo capaz de sobreviver a competição com gramíneas (MESQUITA *et al.*, 2015).

Vários estudos associam que os extratos referentes as espécies de *Vismia* exibem importantes atividades biológicas associadas a diversas doenças e têm sido utilizada por população indígena, como relatado na tribo Wayãpi, que vive na Guiana Francesa, que faz uso das casca de látex para tratar infecções fúngicas orais em crianças (VIZCAYA *et al.*, 2012 ). Os metabólitos secundários possuem um amplo espectro de atividades biológicas, com substâncias descritas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica (OLIVEIRA *et al.*, 2016) e com atividade antioxidante contra o radical ânion superóxido, óxido nítrico e peróxido nitrito (CAMPOS *et al.*,



2014).

Do estudo químico realizados com as espécies do gênero, observa-se que as antraquinonas representam metabolicamente esse gênero (POLITI *et al.*, 2004), sendo a classe de substância mais isolada nas espécies. Um dos seus principais representantes são as vismiaquinonas (A e B) (SEO *et al.*, 2000) e a Vismiona A (ÁLVAREZ *et al.*, 2008) ambas com comprovada ação antioxidante (LINS *et al.*, 2016). Outras classes químicas como as xantonas (SANTOS *et al.*, 2000; HAY *et al.*, 2004;), cumarinas (LAVAUD *et al.*, 2012), benzofenonas (MARTI *et al.*, 2009), diantronas (POLITI *et al.*, 2004) e antranóides prenilados também têm sido relatadas no gênero (ÁLVAREZ *et al.*, 2008). Estas classes químicas podem se apresentar com hidroxilas fenólicas, o que possibilita a estabilização de radicais livres presentes na célula, conferindo às classes propriedades antioxidantes (GOMES *et al.*, 2011). Os triterpenoides, lignanas, sesquiterpenos, flavonoides e os componentes voláteis são reportados na literatura como minorias em algumas espécies do gênero (VIZCAYA *et al.*, 2012; TALA *et al.*, 2013).

Espécies do gênero vem sendo muito estudadas por diversos fatores, entre ele é devido a sua adaptabilidade e capacidade de sobrevivência em condições extremas e devido a essa adequabilidade, ela pode ser considerada como uma planta de grande importância em estudos de fisiologia, ecologia e alterações climáticas (RODRIGUES, 2019).

#### 1.1.4 *Vismia cayennensis*

*V. cayennensis* (Figura 1) é uma espécie de “Lacre” de pequeno porte que habita em capoeiras que pode atingir até 6 metros de altura, podendo gerar frutos a partir de 2 metros de altura (MARINHO-FILHO; VASCONCELOS-NETO, 1994). É amplamente distribuída nas ilhas caribenhas de Trinidad e Tobago e norte da América do Sul, com ocorrência na Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela, além do Brasil, em todos os estados da região norte, Maranhão e Mato Grosso (ZAPPI *et al.*, 2015).



Figura 1. *V. cayennensis*. Fonte: O autor (2022)

Na literatura há poucos estudos que relatam as atividades biológicas e perfil química para a espécie de *V. cayennensis*. Barbosa *et al.* (2021) identificaram no óleo essencial das folhas hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpenos, além da atividade contra microrganismo como fungos e bactérias. A espécie apresentou capacidade antioxidante em extrato aquoso de folhas na concentração de 80 µg/mL (DOMINGUEZ, 2010). Pesquisa com o extrato da casca do caule de *V. cayennensis* apresentou efeito anti-inflamatório significativo, além disso a confirmação de uma vasta presença de flavonoides, saponinas, taninos, polifenóis, antraquinonas, triterpenos e esteróis (MARÍN *et al.*, 2017).

#### 1.1.5 *Vismia guianensis*

*V. guianensis* (Figura 2) é um Lacre popularmente conhecida como pau-de-lacre, árvore-da-febre, caapiá e caopiá. É uma árvore relativamente pequena que pode chegar de 3 a 7 metros de altura, tendo uma copa irregular e aberta com folhas na face adaxial verde e abaxial amarelo (LORENZI, 2002), podendo variar os aspectos morfológicos e químicos conforme o ambiente em que ela se encontra, devido a quantidade de luz absorvida ou refletida (CAMELO *et al.*, 2012). Encontrada nas

regiões do Norte e Nordeste do Brasil, Colômbia, Venezuela, Guiana (MOURÃO; BELTRATI, 2001).

A espécie apresenta uma vasta atividade biológica que tem sido associada principalmente ao exsudato de látex de laranja dos ramos dessa árvore (MOTTA *et*



Figura 2. *V. guianensis*. Fonte: O autor (2022)

*al.*, 2022). Estudos realizados o óleo essencial de *V. guianensis* mostraram uma atividade antibacteriana contra bactérias Gram negativo e Gram positivo (KALEMBA; KUNICKA, 2003; BURT, 2004; SILVESTRE *et al.*, 2012; NUNEZ *et al.*, 2013) e antimicrobiano (BARBOSA *et al.*, 2021). Um metabólito isolado identificado por Vismiona, mostrou atividade *in vitro* contra linhagens de tumores experimentais – carcinoma de ovário M5076 e melanocarcinoma B16 (PASQUA *et al.*, 1995). Suffredini *et al.* (2007) mostraram uma acentuada atividade letal dos extratos orgânicos e aquosos de *V. guianensis* frente à linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano. Lins *et al.* (2016) revelaram o potencial contra o radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) a partir da fase acetato de etila de partes aéreas dessa espécie.

## 2.1 METODOLOGIA

### 2.1.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados frutos das espécies de *V. cayennensis* e *V. guianensis* no entorno da cidade de Itacoatiara/Amazonas, com as coordenadas geográficas demonstradas na figura 3.



Figura 3. Coordenadas geográficas das espécies coletadas. Fonte: O autor (2022).

Ramos férteis foram herborizados e exsicatas depositadas no herbário da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) campus Itacoatiara, com os números de identificação 4384 e 4385, respectivamente, *V. cayennensis* (Jacq) Pers e *V. guianensis* (Albl.) Choisy e sob registro do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) nº A77799D (Figura 4).

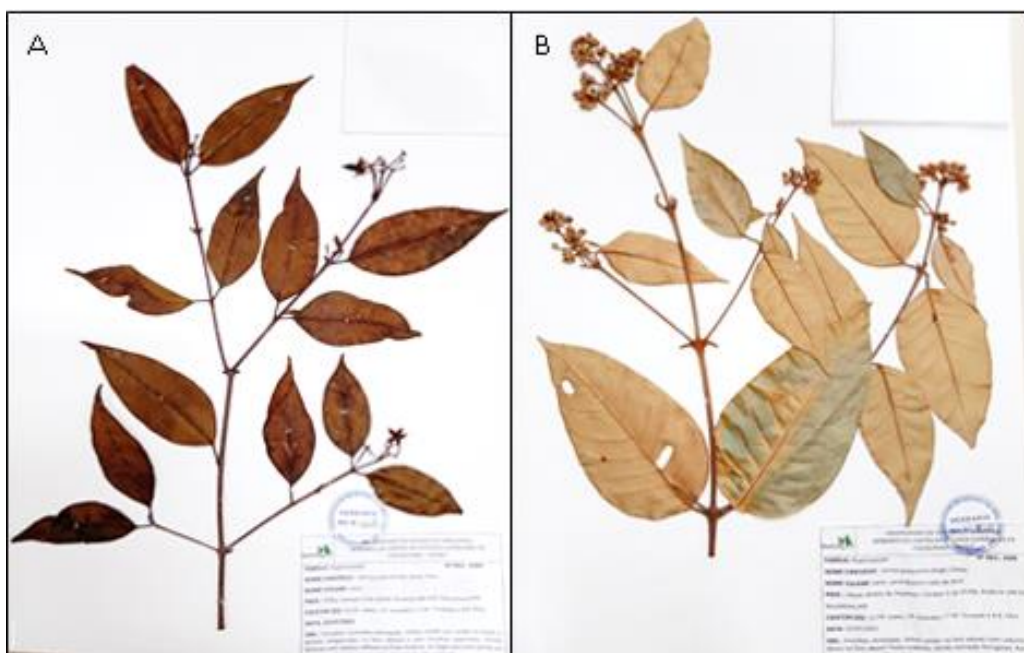


Figura 4. Exsicatas das espécies. (A) *V. cayennensis*; (B) *V. guianensis*. Fonte: O autor (2022).

### 2.1.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO A 70%

Os frutos foram macerados com auxílio de um almofariz e pistilo para a retirada da resina. E a solução extrativa se mantinha em contato com o material vegetal, em repouso a temperatura ambiente por um período de 24 horas. O procedimento foi repetido por 7 vezes, até esgotamento da extração. Foram usados 350mL de etanol dissolvido em 150mL de água para obter uma solução de 70%. As soluções hidroalcolólicas foram concentradas em evaporador rotatório da marca FISATOM, com temperatura a 40° C. Após esse processo, as amostras foram liofilizadas para retirada da água e o produto final foi pesado e armazenado a 4° C (Ilustração 1).

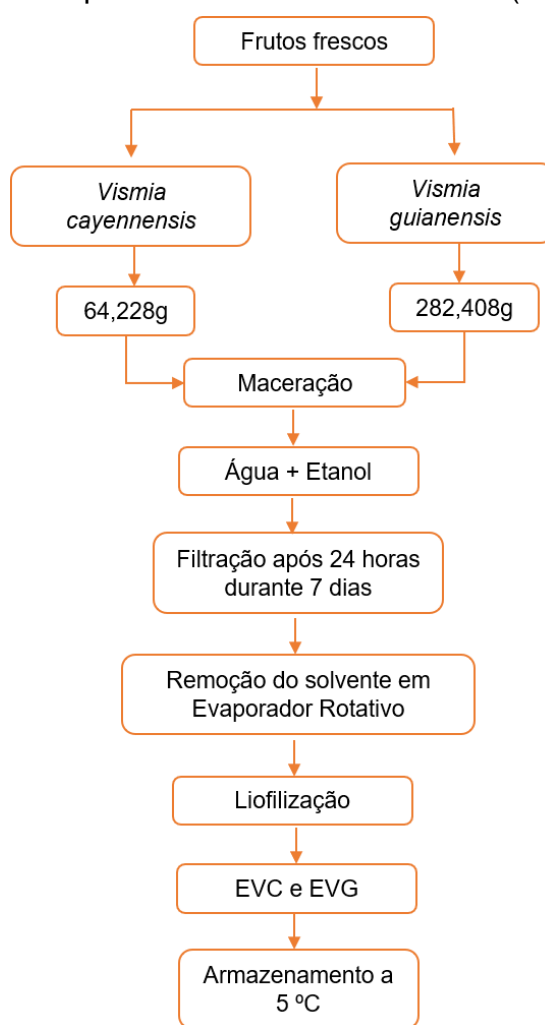


Ilustração 1. Esquema geral da extração hidroetanólica. Fonte: O autor (2023)

A solução hidroalcolóica foi codificada e o rendimento foi calculado



### 2.1.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE HEXANO, DICLOROMETANO, ACETATO DE ETILA E METANOL

Os extratos foram preparados a partir da maceração dos frutos das espécies *Vismia*, em extrações exaustivas com duração de 48 horas para cada troca de solvente, sendo este procedimento repetido 3 vezes. Para cada extração foram utilizados 500mL dos solventes Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e Metanol utilizado na ordem crescente de polaridade e codificadas conforme os solventes e espécies (Ilustração 2).

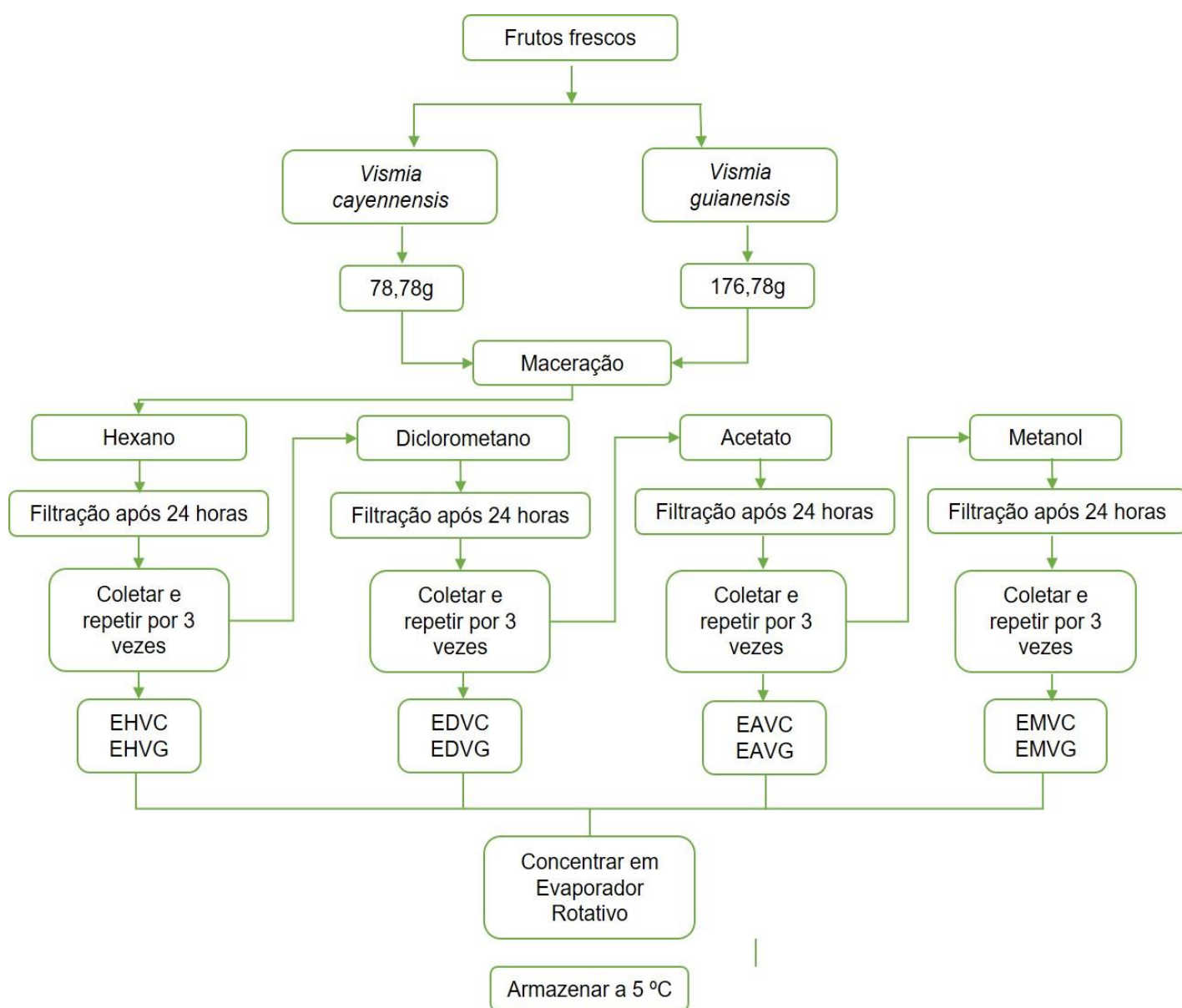


Ilustração 2. Esquema geral de extração de solventes orgânicos. Fonte: O autor (2023)

#### 2.1.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETANO

Para o fracionamento foi utilizada como fase estacionária de sílica gel 60 (0,063-0,2mm/70-230) da marca MACHEREY-NAGEL e fase móvel os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, sendo adicionados na coluna em proporções de ordem crescente de polaridade, diminuindo o solvente de menor polaridade e aumentando o de maior polaridade, em 5mL a cada troca, tendo um valor total de 100mL de eluente. A coluna de vidro utilizada, da marca VIDROLABOR, apresentava as dimensões 30x300mm. No EDVC foi utilizado 60,23g de sílica em gel no interior da coluna. A massa da amostra foi de 0,410g do extrato dos frutos de *V. cayennensis* macerado em 1 grama de sílica no almofariz. E para EDVG, foi utilizado 68,21g no interior da coluna e 1,064g do extrato macerado em 2,120 gramas de sílica no almofariz. As frações foram recolhidas e totalizadas conforme o Ilustração 3.

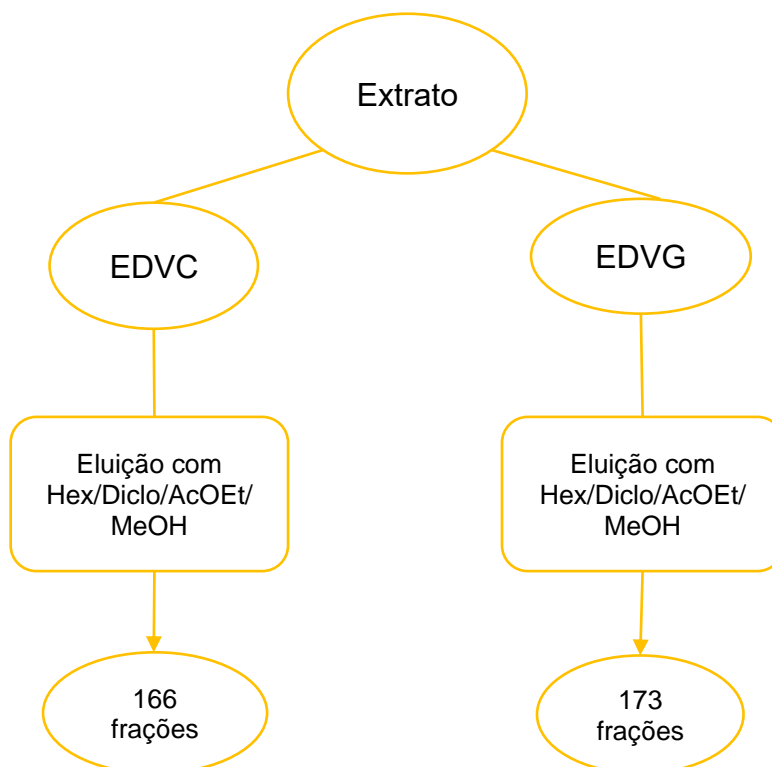


Ilustração 3. Esquema de fracionamento dos extratos de diclorometano de *Vismia*. Fonte: O autor (2023)

#### 2.1.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO

Neste fracionamento foi utilizada de sílica gel 60 (0,063-0,2mm/70-230) da marca MACHEREY-NAGEL e fase móvel os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. A coluna de vidro utilizada, apresentava as dimensões 30x300mm. O extrato EHVG foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica utilizando 62,70g

de sílica no interior da coluna. A massa da amostra foi de 0,746g macerado em 1,5 gramas de sílica no almofariz. Para o extrato EHVC utilizou-se 54,035g de sílica no interior da coluna, além de 0,584g da amostra macerada em 1,2 gramas de sílica no almofariz. As frações foram recolhidas e totalizadas conforme a Ilustração 4.

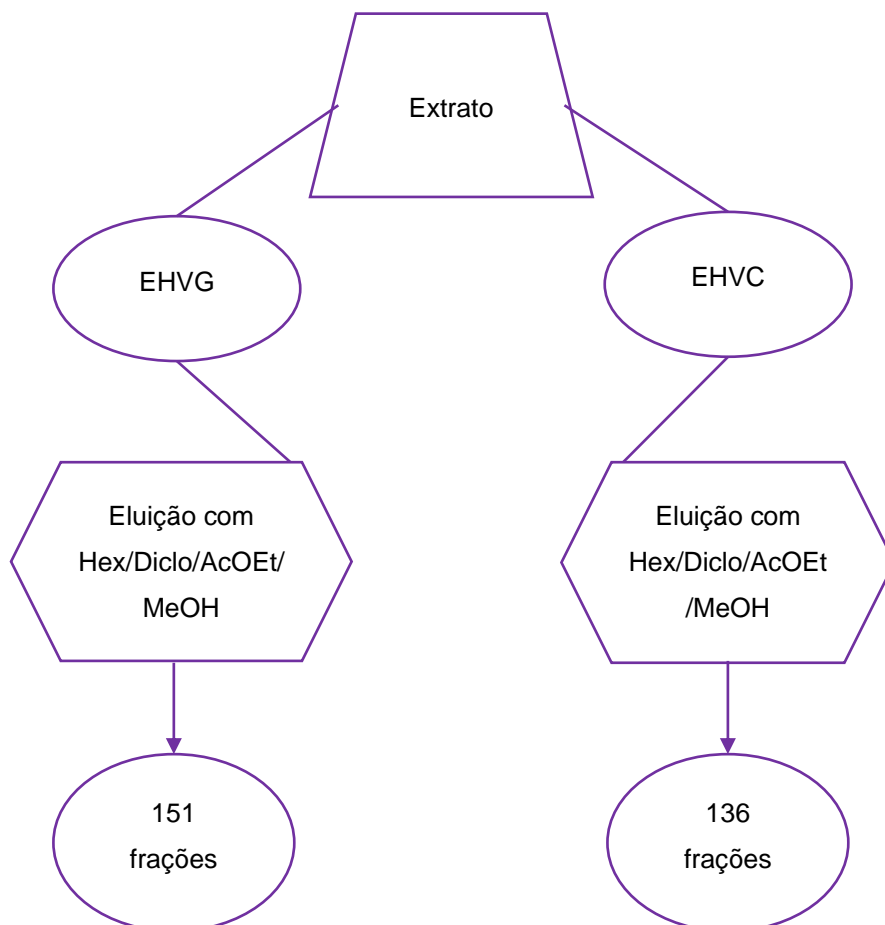


Ilustração 4. Esquema de fracionamento dos extratos hexânicos de *Vismia*.  
Fonte: O autor (2023)

#### 2.1.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As frações recolhidas dos fracionamentos dos extratos, foram submetidas individualmente a diferentes proporções de solventes para visualização de possíveis substâncias na câmara de UV (Ultravioleta). As frações com perfil igual, eram unificadas para a finalidade de obtenção da maior massa possível da fração. Os solventes utilizados foram a mistura de hexano, acetato de etila, metanol e água (2:3:2:3 ou 3:2:3:2) em gradiente de polaridade crescente, totalizando 10 mL de eluente na cuba como fase móvel. A cuba utilizada foi de capacidade para 30 lâminas da marca Global Trade. Como fase estacionária foi utilizada a placa de sílica gel 60



(0,20mm) com indicador fluorescente UV254 da marca MACHEREY-NAGEL da DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, na medida de 20x20 cm). A câmara escura de UV utilizada na visualização desse experimento foi a AG-DC-02 da marca ACS GOLO, em dois comprimentos de onda 254nm e 365nm.

#### 2.1.7 REVELADORES

Para a revelação em CCD, foram utilizados os seguintes reveladores: NP/PEG, hidróxido de potássio 10% e vanilina sulfúrica.

Natural Products Reagent/polietilenoglicol (NP/PEG): solução A – solução metanólica a 1% do éster do ácido  $\beta$ -etilamino difenilbórico. Solução B - solução 45 etanólica a 5% de polietilenoglicol 4000. As soluções A e B são misturadas na proporção 1:1 (v/v). Usado como solução reveladora de flavonoides

Hidróxido de potássio 10%: 10,0g de KOH foram adicionados a 100mL de água. Utilizada na detecção de cumarinas.

Vanilina sulfúrica: são dissolvidas 15g de vanilina em 250mL de etanol a 0 °C. Em seguida são adicionados lentamente 2,5ml de ácido sulfúrico concentrado. Usado para revelar terpenoides (amarelo-marrom) e ácidos graxos (azul).

#### 2.1.8 AVALIAÇÃO QUÍMICA POR APCI/MS (IONIZAÇÃO QUÍMICA DE PRESSÃO ATMOSFÉRICA/ ESPECTROMETRIA DE MASSA)

Para avaliação por espectrometria de massas foram preparadas soluções estoque na concentração de 1000 ppm. Alíquotas (10  $\mu$ L) dessas soluções foram transferidas para vials contendo 1mL de MeOH. Em seguida, 5  $\mu$ L das soluções diluídas foram analisadas por inserção direta no espectrômetro de massas do tipo ion trap, modelo LCQ Fleet, equipado com fonte APCI operando nos modos positivo e negativo. Os parâmetros analíticos utilizados foram os seguintes: corrente de descarga: 5  $\mu$ A; temperatura do temporizador: 320 °C; temperatura capilar: 220 °C; gás de revestimento: 30 psi; gás auxiliar: 10 arb, faixa de massa, m/z 100-1000. Os espectros de MS/MS foram adquiridos utilizando hélio como gás de colisão e energia variando entre 20-30%.

#### 2.1.9 ANÁLISE POR HPLC/UV (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA/ULTRAVIOLETA) SEMI-PREPARATIVO

O fracionamento semi-preparativo através da técnica por HPLC/UV em um cromatógrafo Shimadzu®, foi realizada para a amostra EVC (2 mg). O extrato foi solubilizado em 100 µL H<sub>2</sub>O (Milli-Q). Foi utilizada uma coluna Luna C18 (5 µm, 250 x 10.00 mm) Phenomenex com fluxo de 3,5 mL/min, sendo monitorados entre os comprimentos de onda 235nm e 279nm. Para cada injeção foi utilizada uma carga máxima na coluna de 2 mg em um looping de 100µ. A fase móvel utilizada consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico a 0, 2% (A) e MeOH (B). O gradiente de eluição foi de 20 – 50 % (B) por 7 min, 50-80 % (B) por 15 min, seguido de 30 min a 80 % de (B).

### 2.1.10 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A caracterização estrutural das substâncias foi realizada por RMN [1D: <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C] utilizando-se um espectrômetro Bruker Avance III HD, operando em 400,13 MHz para <sup>1</sup>H e 125,76 MHz para <sup>13</sup>C em solvente clorofórmio deuterado, equipado com sonda multinuclear de observação direta de 5 mm (BBO Plus Smart Probe™).

### 2.1.11 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

#### 2.1.11.1 SÍNTESE DO COMPLEXO Cu-quercetina (QUER-cp)

Em um balão de fundo redondo de 50mL, sob agitação e aquecimento, adicionou 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona (quercetina·2H<sub>2</sub>O) (0,17 g, 0,01 mol) em MeOH (20 ml), deixando até a total dissolução deste. Em seguida, adicionou-se lentamente a solução metanólica de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,25 g, 0,02 mol), deixando sob agitação à temperatura ambiente por 1,5 h (Figura 5). Após agitação, a mistura de reação foi filtrada e deixando para evaporar lentamente à temperatura ambiente. O produto resultante (QUER-cp), foi purificado com t-butanol e deixado em dessecador a vácuo, obtendo rendimento de 77%.

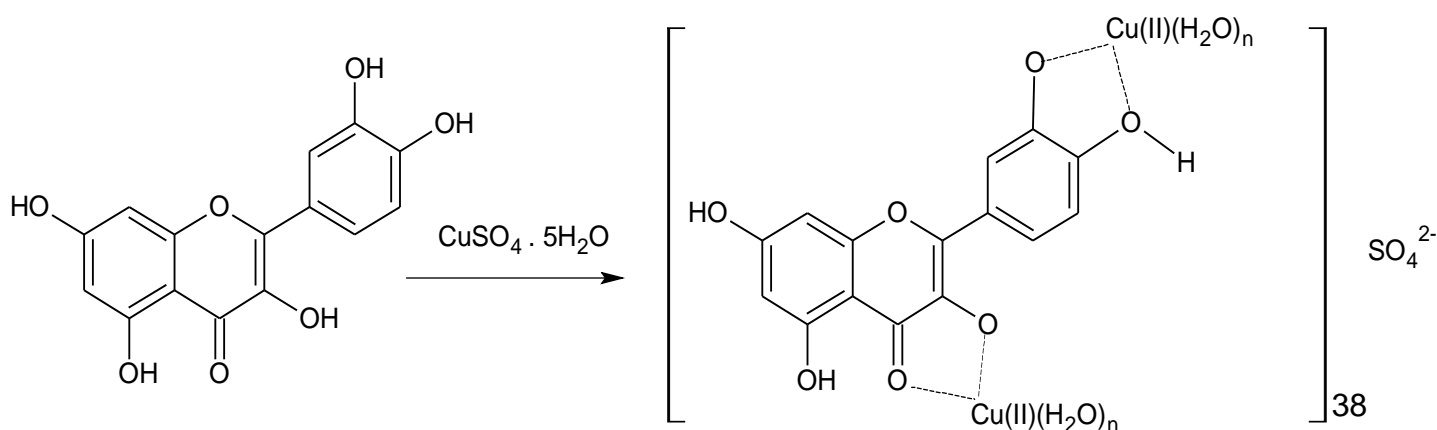


Figura 5. Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cu-quercetina. Fonte: O autor (2023)

### 2.1.11.2 SÍNTESE DO COMPLEXO Cu-catequina (CAT-cp)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, sob agitação e aquecimento, adicionou 2-(3,4- dihidroxifenil) -4H-cromona-3,5,7-triol (catequina-2H<sub>2</sub>O) (0,0029 g, 0,01 mol) em MeOH (20 ml), deixando até a total dissolução deste composto. Em seguida, adicionou-se lentamente solução metanólica de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,125 g, 0,01 mol) deixando sob agitação à temperatura ambiente por 1,5 h (Figura 6). Após agitação, a mistura de reação foi filtrada e o filtrado foi evaporado lentamente à temperatura ambiente. O produto resultante foi purificado com t-butanol e seco em um dessecador a vácuo, obtendo CAT-cp com 60% de rendimento.

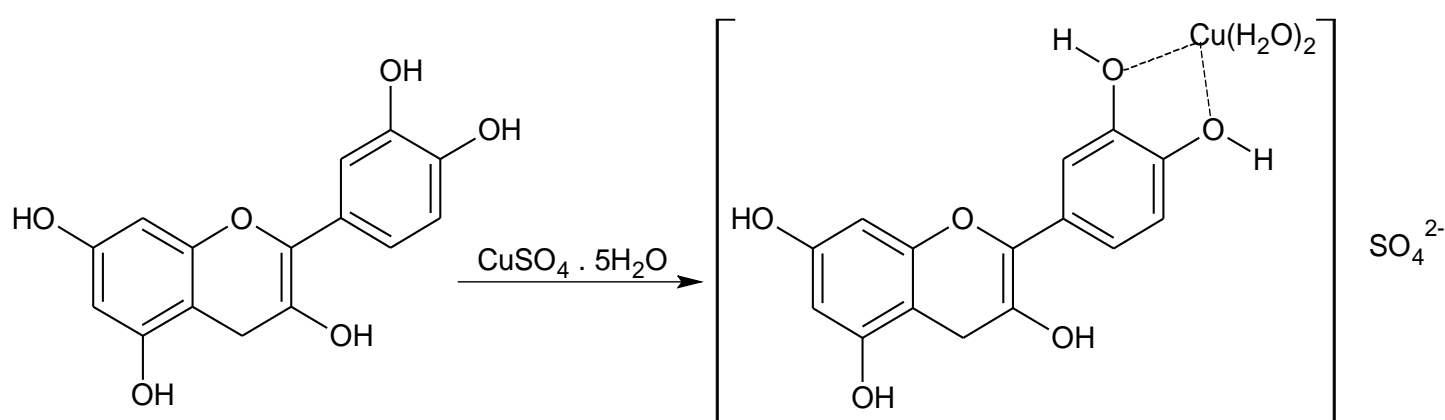


Figura 6. Esquema reacional de síntese e estrutura proposta do complexo Cu-catequina. Fone: O autor (2023)

Ultravioleta visível (UV/vis) na 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.

## 3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Os rendimentos dos extratos (massa de extrato seco/massa do material vegetal, %) dos frutos das espécies *Vismia*, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Através da extração sequencial com diferentes solventes em uma amostra, é possível obter de forma mais completa o perfil químico da parte botânica da planta, levando em consideração que apenas um solvente não seria capaz de extrair todas as classes de metabólitos secundários (SILVA, 2013). Portanto, selecionar um método de extração mais adequado e os solventes é um dos procedimentos mais importantes

para melhorar o rendimento da extração (VIERA, 2016).

<b>Código</b>	<b>Significado</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>EHVC</b>	Extrato Hexano <i>V. cayennensis</i>	0,5847	0,74
<b>EHVG</b>	Extrato Hexano <i>V. guianensis</i>	2,4124	1,36
<b>EDVC</b>	Extrato Diclorometano <i>V. cayennensis</i>	1,2489	1,58
<b>EDVG</b>	Extrato Diclorometano <i>V. guianensis</i>	9,1792	5,19
<b>EAVC</b>	Extrato Acetato de Etila <i>V. cayennensis</i>	1,3600	1,72
<b>EAVG</b>	Extrato Acetato de Etila <i>V. guianensis</i>	2,6202	1,48
<b>EMVC</b>	Extrato Metanol <i>V. cayennensis</i>	1,4878	1,88
<b>EMVG</b>	Extrato Metanol <i>V. guianensis</i>	2,2807	1,29

Tabela 1. Código e rendimento das amostras de extratos orgânicos dos frutos de *Vismia*. Fonte: O autor (2023)

<b>Código</b>	<b>Significado</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>EVC</b>	Extrato hidroetanólico de <i>V. cayennensis</i>	4,4885	6,98
<b>EVG</b>	Extrato hidroetanólico <i>V. guianensis</i>	12,5216	4,43

Tabela 2. Código e rendimento das amostras de extrato hidroetanólico dos frutos de *Vismia*.

O extrato que obteve maior rendimento foi o extrato hidroetanólico de *V. cayennensis* com 6,98% e o menor rendimento foi o extrato hexânico de *V. cayennensis*, demonstrado também em uma pesquisa recente que obteve um rendimento baixo para esse extrato (TRINDADE *et al.*, 2023). Os diferentes rendimentos obtidos em pesquisas, podem estar relacionados a diversos fatores, como natureza da matriz da amostra e o solvente (PIOVESAN, 2016).

### 3.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES

A avaliação da fração EVG oriunda do extrato hidroalcolico de *V. guianensis*, observado apenas no modo de ionização negativo, apresentou íon precursor [M-H] - em  $m/z$  301 (Figura 7). No espectro foi observado fragmentos em  $m/z$  283 [M-H-H<sub>2</sub>O] - e 245 [M-H-2CO] - característico pela perda de uma molécula de água e da saída de duas moléculas de monóxido de carbono (Figura 8).

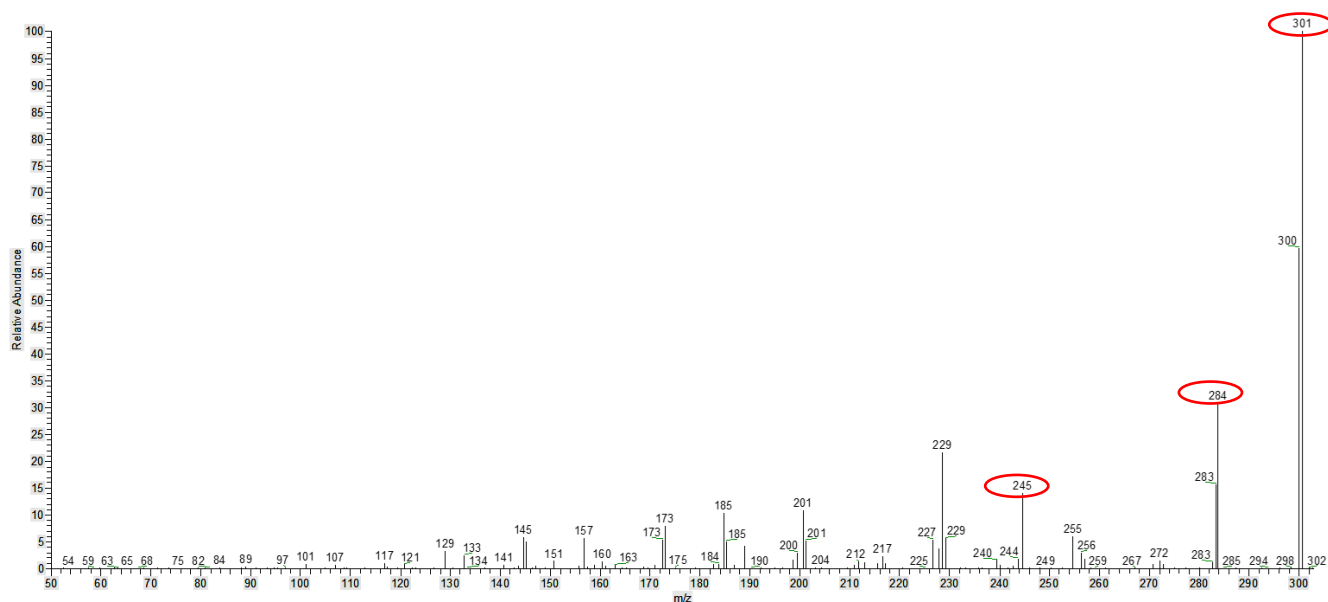


Figura 7. Espectro de massas do íon 301  $m/z$  do extrato hidroalcoólico EVG. Fonte: O autor (2023)

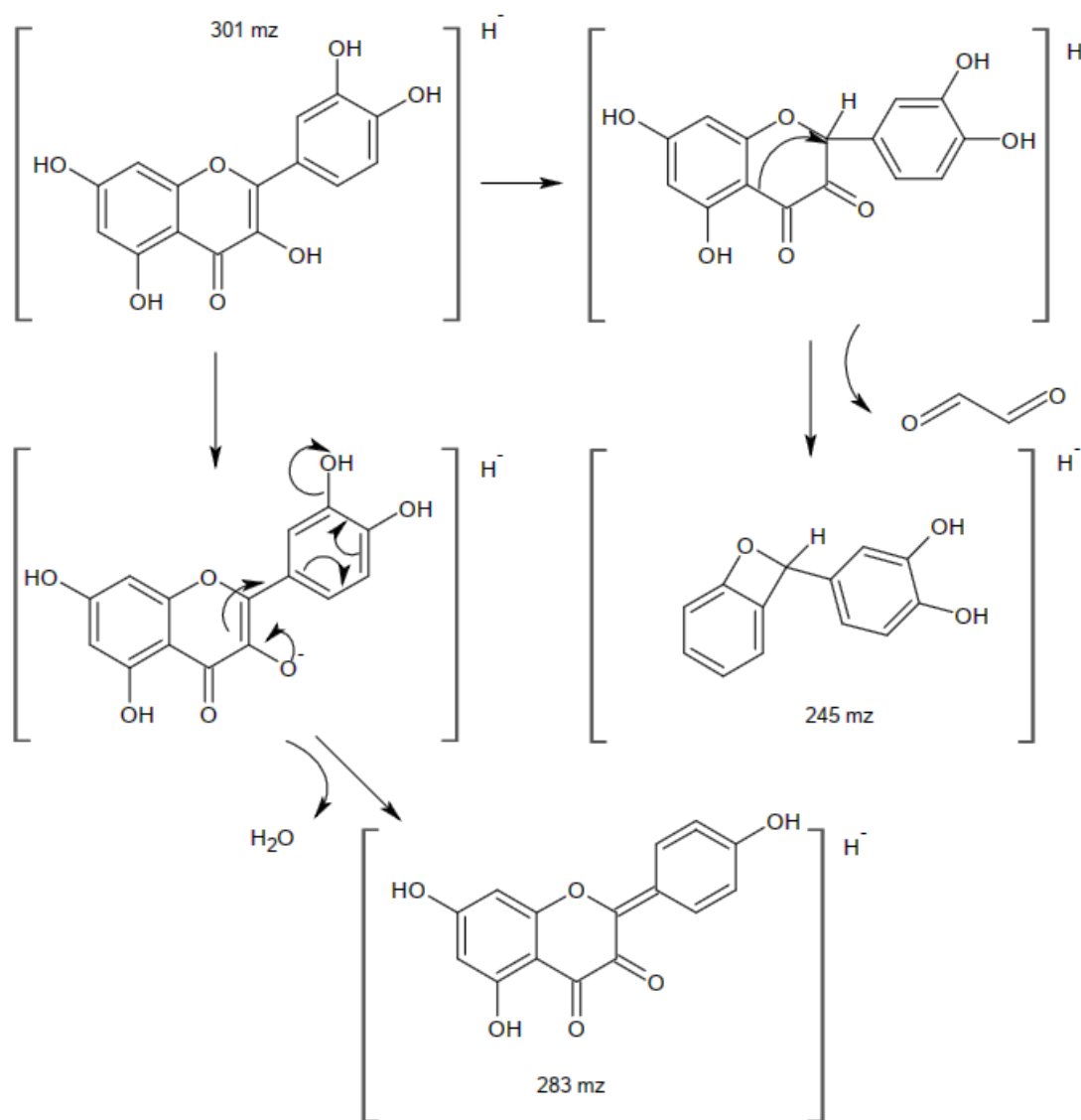


Figura 8. Proposta de fragmentação do íon 301  $m/z$  em 283 e 245  $m/z$ . Fonte: O autor (2023)

Com base na literatura foi identificado o flavonoide quercetina como constituinte majoritário (BERTONCELJ *et al.*, 2011) (Figura 9).

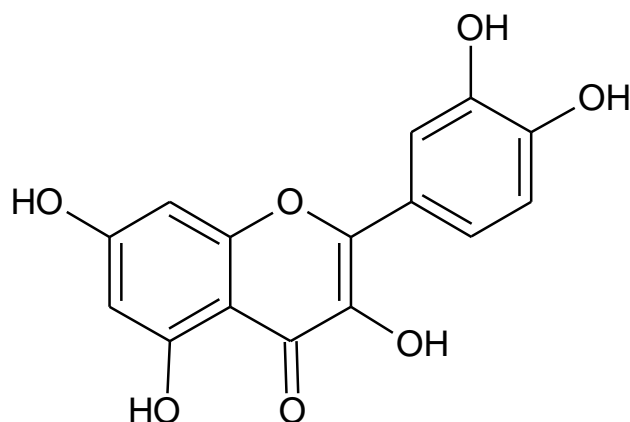


Figura 9. Estrutura da molécula de quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona). Fonte: O autor (2023)

Identificou-se que na amostra EVC havia um pico majoritário de massa 289  $m/z$  (Figura 10). A partir desse íon foi possível observar as fragmentações em perda de grupo em 245  $m/z$  e 205  $m/z$  resultante de uma fissão no anel heterocíclico e em 179  $m/z$  de um catecol, como mostra a proposta de fragmentação (Figura 11).

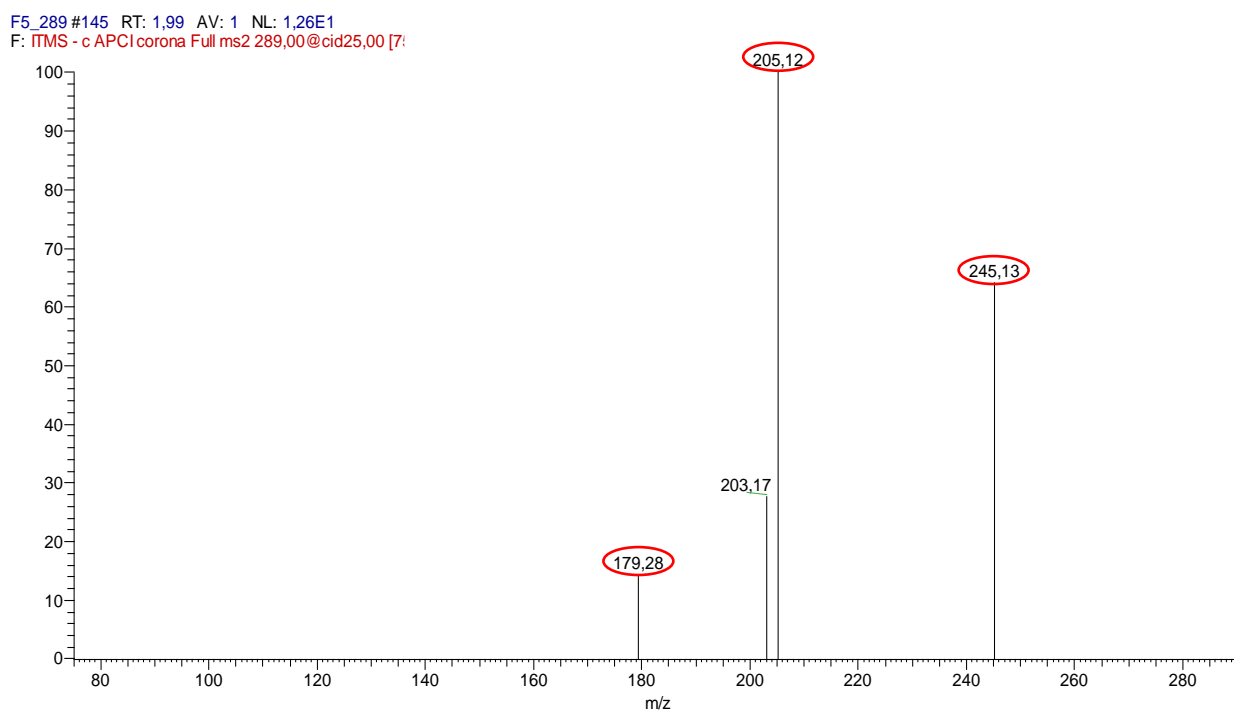


Figura 10. Espectro de massas 289  $m/z$  na fonte APCI do extrato hidroalcolóico EVC. Fonte: O autor (2023)

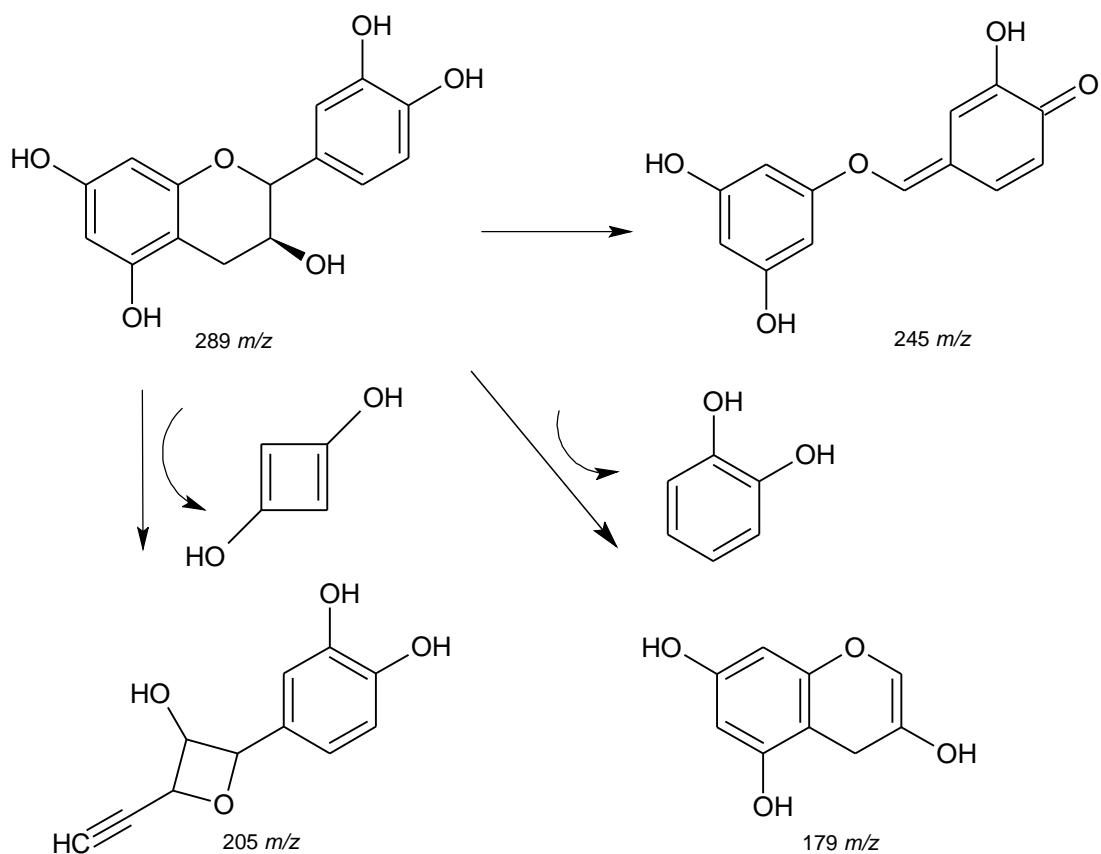


Figura 11. Proposta de fragmentação do íon 289  $m/z$  em 245, 205 e 179  $m/z$ . Fonte: O autor (2023)

Esse pico majoritário de 289  $m/z$ , corresponde a fórmula molecular de  $C_{15}H_{14}O_6$ , sendo um flavonoide denominada (dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol, catequina (Figura 12), já encontrado anteriormente em extrato hexânico de *V. cayennensis* (MOTTA, 2020).

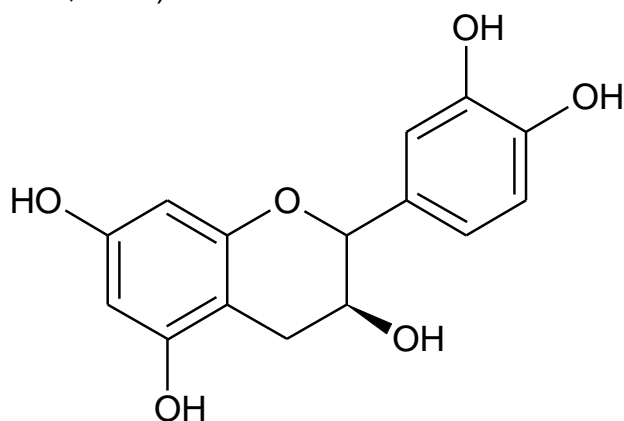


Figura 12. Estrutura dos compostos catequina. Fonte: O autor (2023)

Outra substância encontrada por MS/MS em modo negativo foi a do íon  $283m/z$  encontrada na fração FRVC6-10 com um único fragmento de  $239m/z$  equivalente a perda de 44 daltons (Figura 13), de fórmula molecular  $C_{16}H_{12}O_5$ , denominada de antraquinona fisciona (1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-antraquinona) (OSORIO, 2019) (Figura 14),

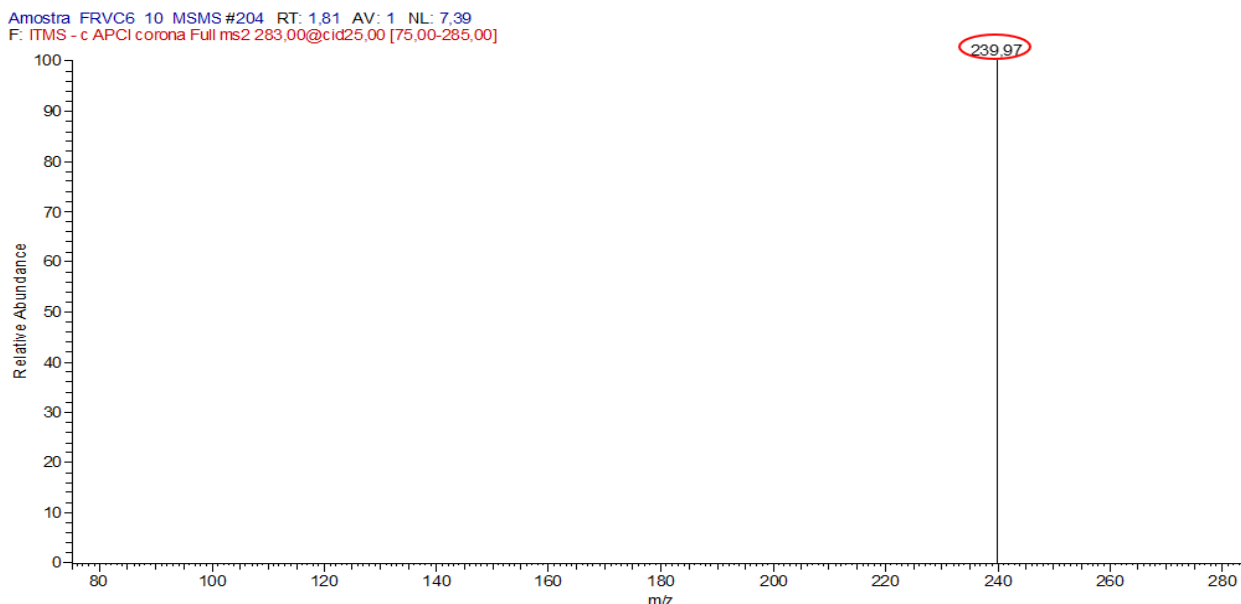


Figura 13. Espectro de massas  $283m/z$  na fonte APCI da fração FRVC6-10. Fonte: O autor (2023).

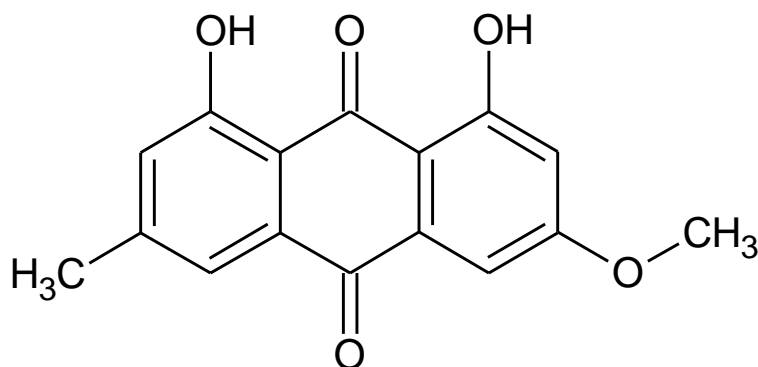


Figura 14. Estrutura dos compostos fisciona. Fonte: O autor (2023)

Através da técnica de HPLC/UV foi possível identificar também a substância catequina no comprimento de onda de 235nm e 279nm do extrato bruto de EVC (Figura 15). O espectro mostra o sinal majoritário entre 8,5 a 9,5 minutos característico desse flavonoide.



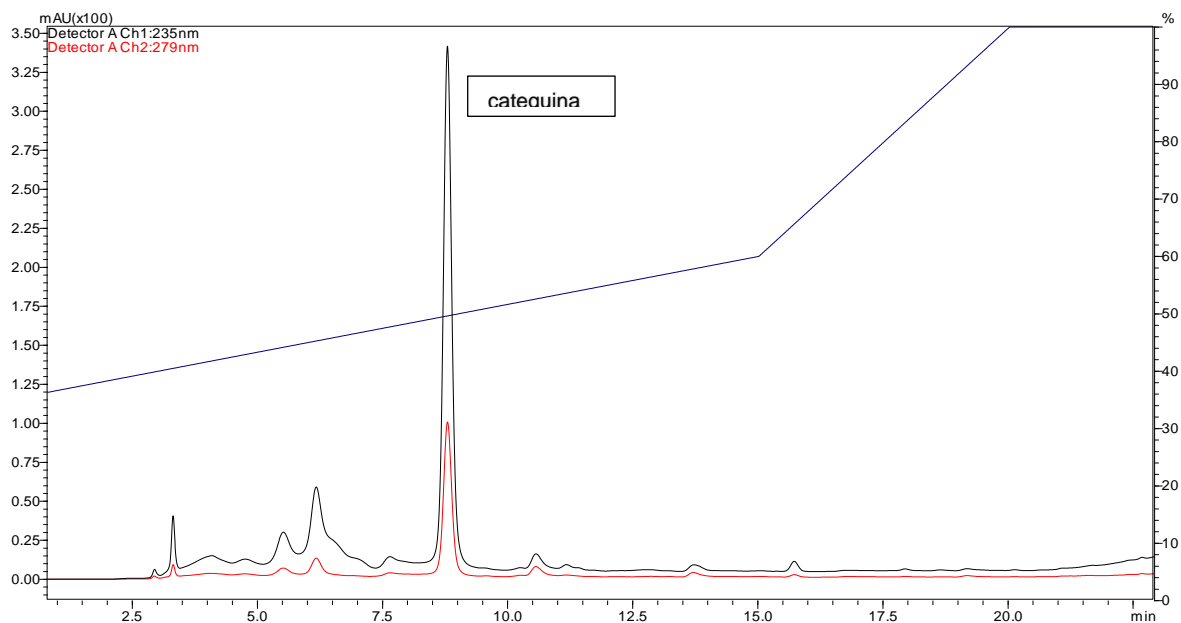


Figura 15. Espectro de HPLC/UV do composto de catequina encontrado na amostra EVC na faixa de 235 a 279nm. Fonte: O autor (2023).

### 3.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA FRVG-4 DO EXTRATO EHVG POR RMN <sup>1</sup>H

A fração codificada com FRVG-4, foi isolada do extrato EHVG na forma de cristal de cor amarelada (Ilustração 5). Através da análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H foi possível analisar os dados espectrais e identificar tal substância.

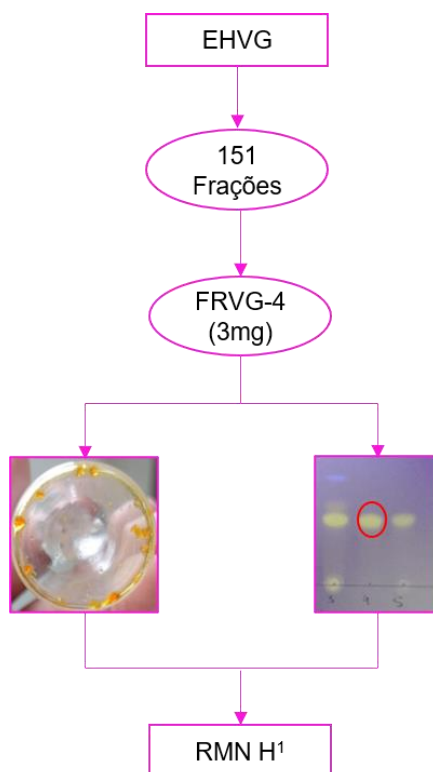


Ilustração 5. Esquema de precipitação dos cristais e análise em CCD para a fração FRVG-4 de EHVG. Fonte: O autor (2023).

O RMN  $^1\text{H}$  da fração FRVG-4 com solvente clorofórmio deuterado, gerou o espectro com os sinais que mostram diversos grupos predominante nessa substância (Figura 16). Foi possível visualizar nas regiões  $\delta_{\text{H}}$  12,35 (s, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  12,15 (s, 1H) dois sinais que podem estar atribuídos a hidroxilas queladas a grupo de carbonila (C=O) (Figura 17). Esse espectro também apresentou 4 sinais na região dos aromáticos, em  $\delta_{\text{H}}$  7,65 (s, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,39 (d,  $J = 2,48$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,10 (s, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,70 (s,  $J = 2,54$  Hz, 1H) todos com integração para  $^1\text{H}$ , característico de hidrogênios acoplados em posições meta (Figura 18).

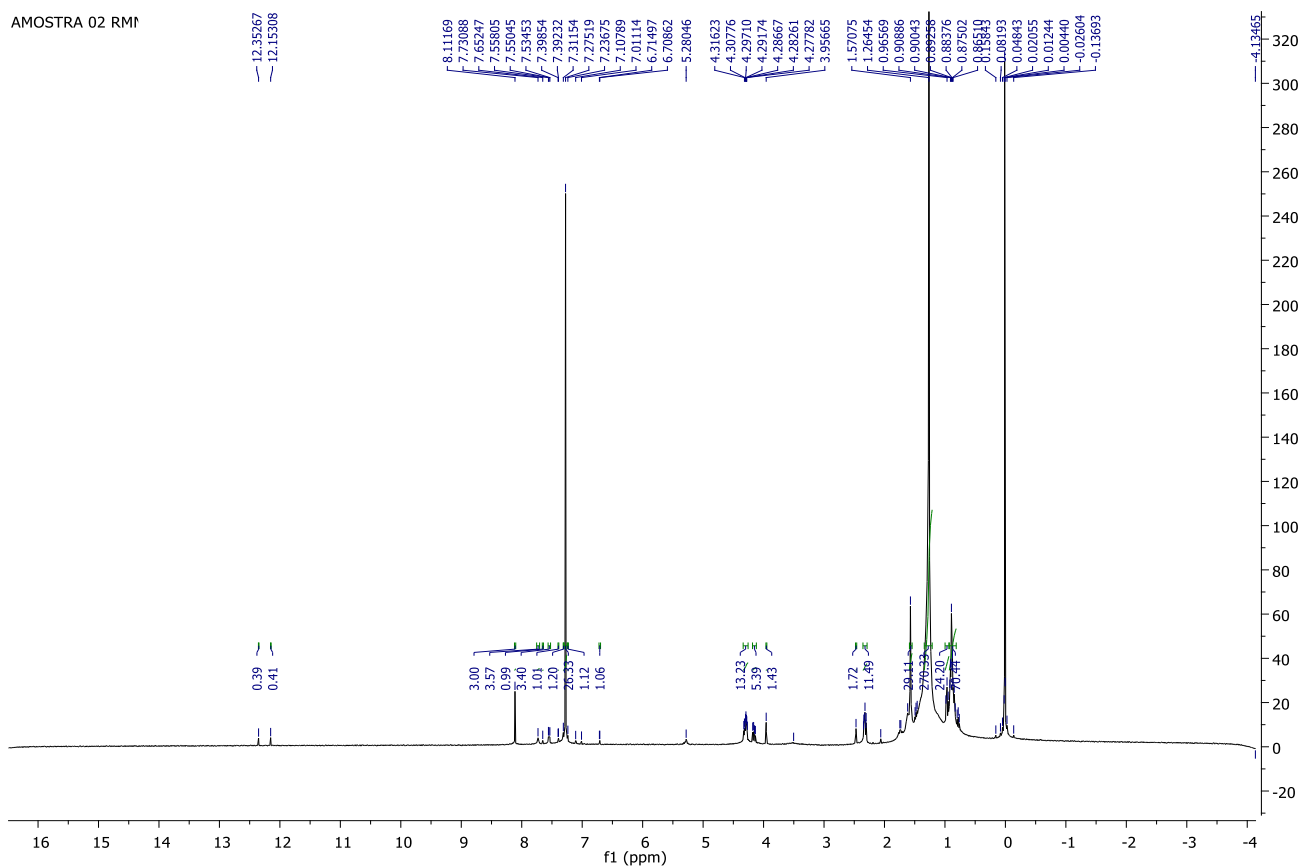


Figura 16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração FRVG-4 do extrato hexânico de *V. guianensis*. Fonte: o autor (2023)

AMOSTRA 02 RMF

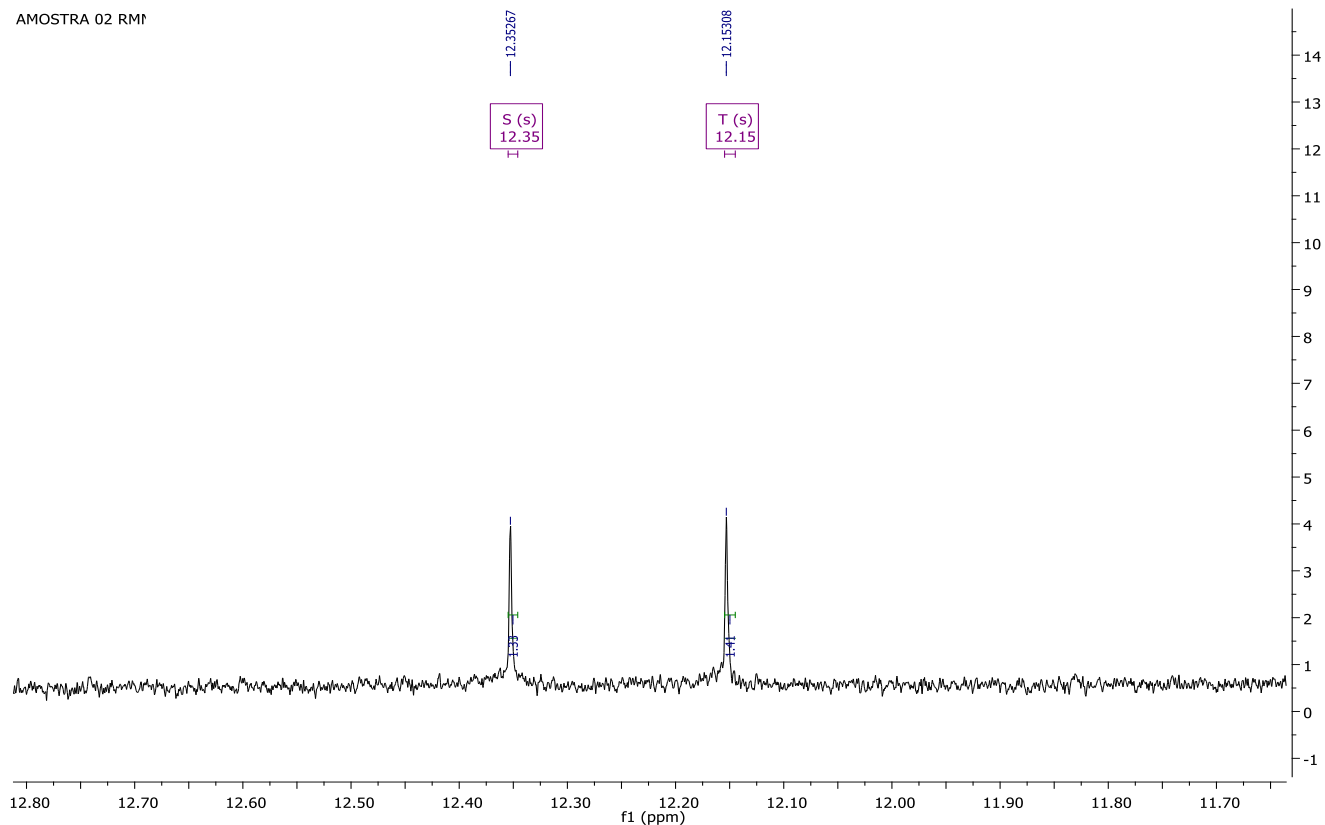


Figura 17. Expansão da região do espectro de RMN <sup>1</sup>H de hidroxilas ligadas a carbonila da amostra FRVG-4.

Fonte: O autor (2023)

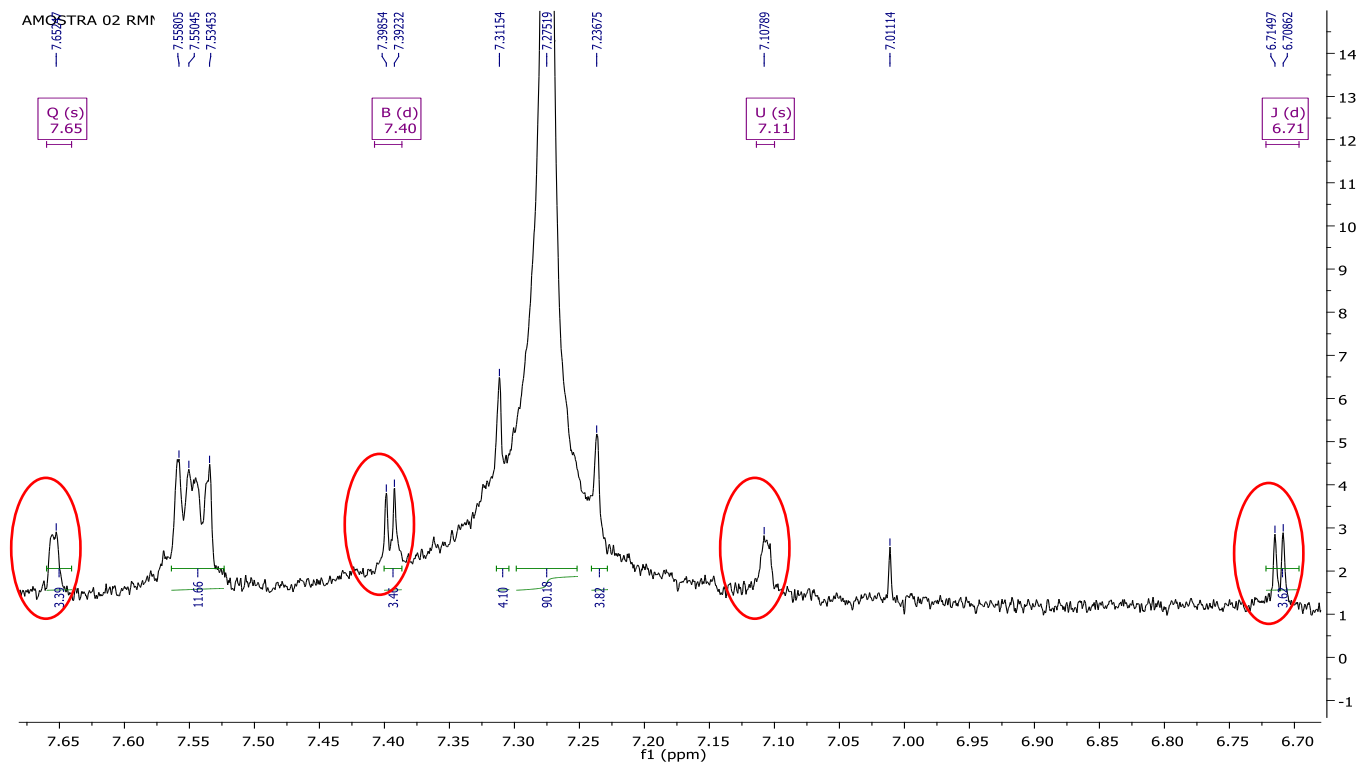


Figura 18. Expansão da região do espectro de RMN <sup>1</sup>H dos aromáticos da amostra FRVG-4. Fonte: O autor (2023)

Essa substância apresentou também um sinal indicativo a uma metila com característica que está ligada a anel aromático em  $\delta$ H 2,47 (s, 3H) (Figura 19). Em  $\delta$ H 3,95 (s, 3H) essa antraquinona exibiu esse sinal relativo a 3 hidrogênios de uma metoxila, ou seja, hidrogênio fazendo ligação a oxigênio (Figura 20). Os demais sinais podem estar conferidos a outra substância em mistura a esses cristais.

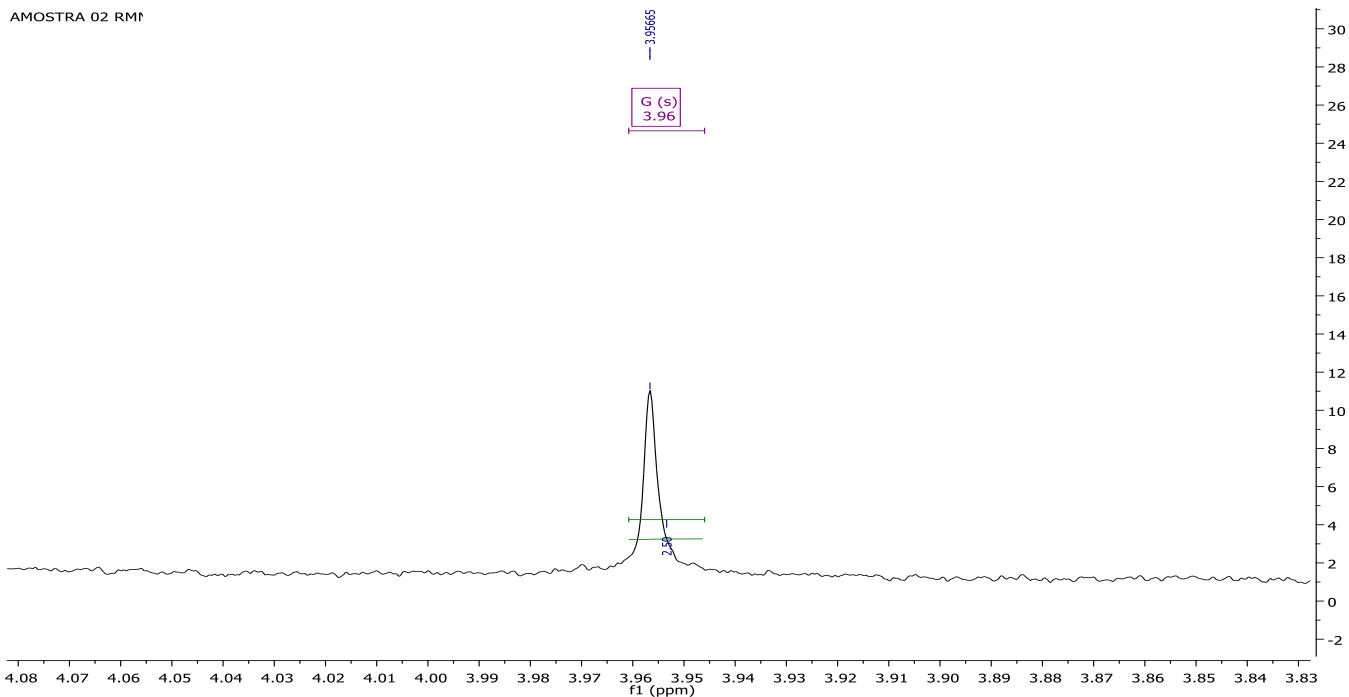


Figura 19. Expansão da região do espectro de RMN  $^1$ H de uma metila da amostra FRVG-4. Fonte: O autor (2023)

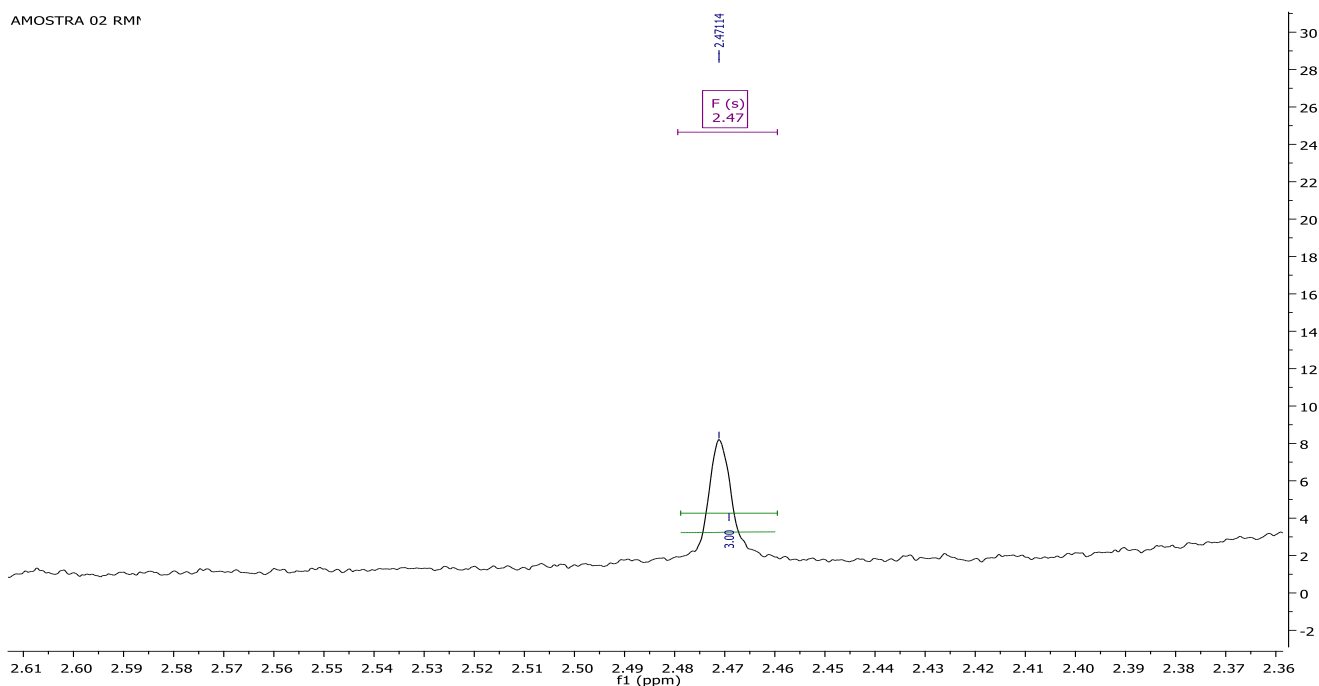


Figura 20. Expansão da região do espectro de RMN  $^1$ H de uma metoxila da amostra FRVG-4. Fonte: o autor (2023).

Essas informações do espectro de hidrogênio de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3), foram comparados com dados da literatura (OTTOBELLI et al., 2011; OSORIO, 2019) permitindo sugerir que esses cristais precipitados na fração FRVG do extrato hexânico de *V. guianensis*, trata-se da antraquinona 1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-antraquinona, fisciona (Figura 21), substância já isolada anteriormente dos frutos de *V. guianensis* (OTTOBELLI et al., 2011).

H	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	Literatura RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ ) em clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) OSORIO, 2019	Literatura RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ ) em clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) OTTOBELLI et al., 2011
1	12,35 (s, 1H)	12,33	12,32
2	7,10 (s, 1H)	7,09	7,20
3	2,47 (s, 3H)	2,46	2,46
4	7,65 (s, 1H)	7,64	7,53
5	7,39 (d, $J = 2,48$ , 1H)	7,39	7,21
6	3,95 (s, 3H)	3,65	3,92
7	6,70 (d, $J = 2,54$ , 1H)	6,70	6,89
8	12,15 (s, 1H)	12,16	12,11

Tabela 3. Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) para o composto fisciona.

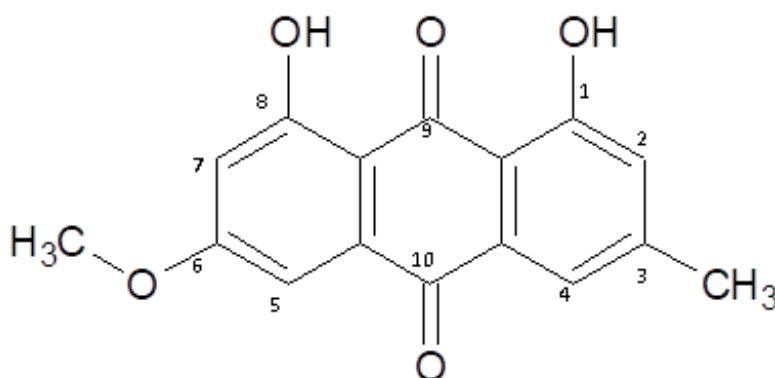


Figura 21. Estrutura química da substância 1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-antraquinona (fisciona). Fonte: O autor (2023)

### 3.1.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

O espectro UV-vis da quercetina livre e complexo Cu-quercetina em DMSO é descrito na figura 22. A quercetina, como a maioria das flavonas e flavonóis, exibe duas grandes bandas de absorção na região UV-vis, a 380nm (banda I) representando a absorção do anel B (sistema cinamoil), e 300nm (banda II) é considerada estar

associado à absorção envolvendo o sistema benzoíla do anel A [16].

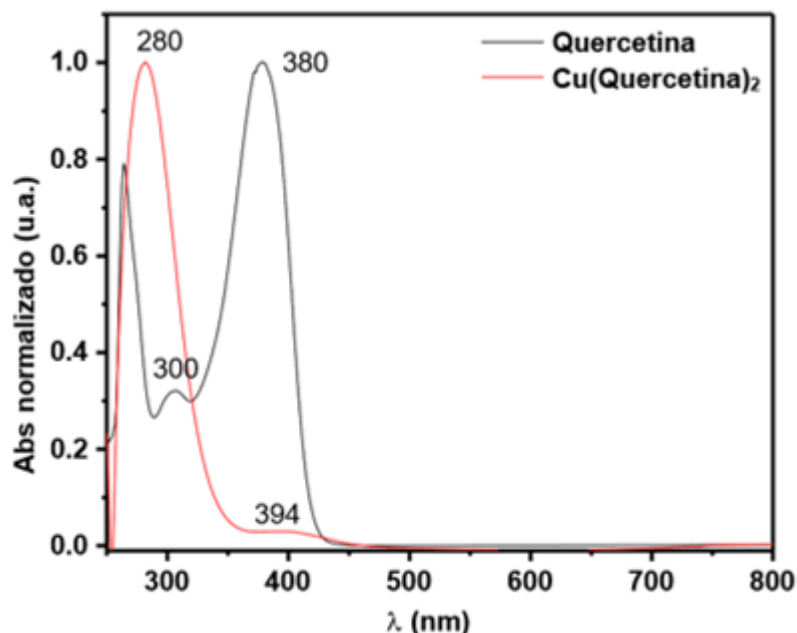


Figura 22. Espectro eletrônico da quercetina livre e complexada em DMSO. Fonte: O autor (2023)

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 de o 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 tem um caráter mais ácido [15], portanto os grupos 3-OH e 4-oxo são os primeiros sítios estar envolvidos 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 [14].

O espectro UV-vis da catequina livre e complexo Cu-catequina em DMSO é descrito na figura 23. A análise do espectro eletrônico da catequina indicou um pico maior em 279nm, 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 400nm atribuída a

transição de carga.

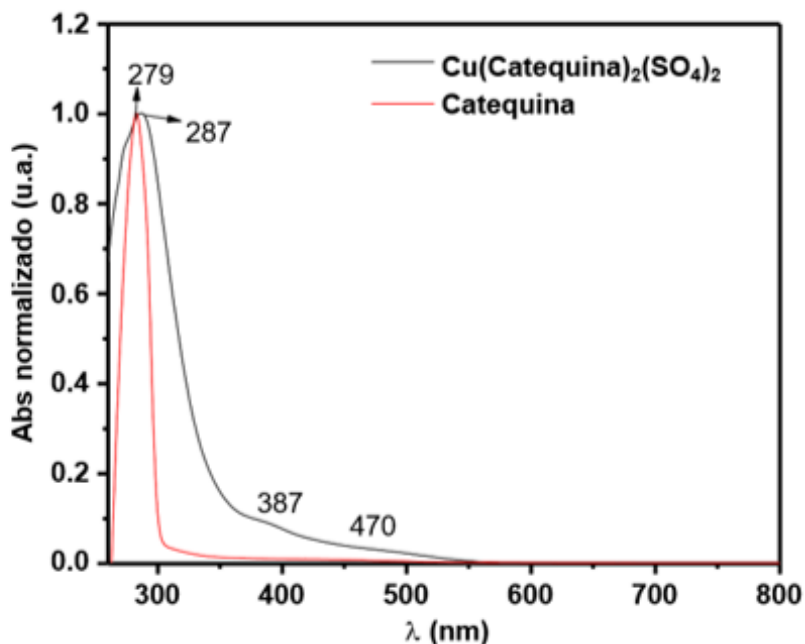


Figura 23. Espectro eletrônico da catequina livre e após a complexação com íons  $\text{Cu}^{2+}$  no solvente DMSO. Fonte: O autor (2023)

Os sítios ativos de coordenação e ligação nos flavonoides livre e após a complexação são mostrados na figura 24.

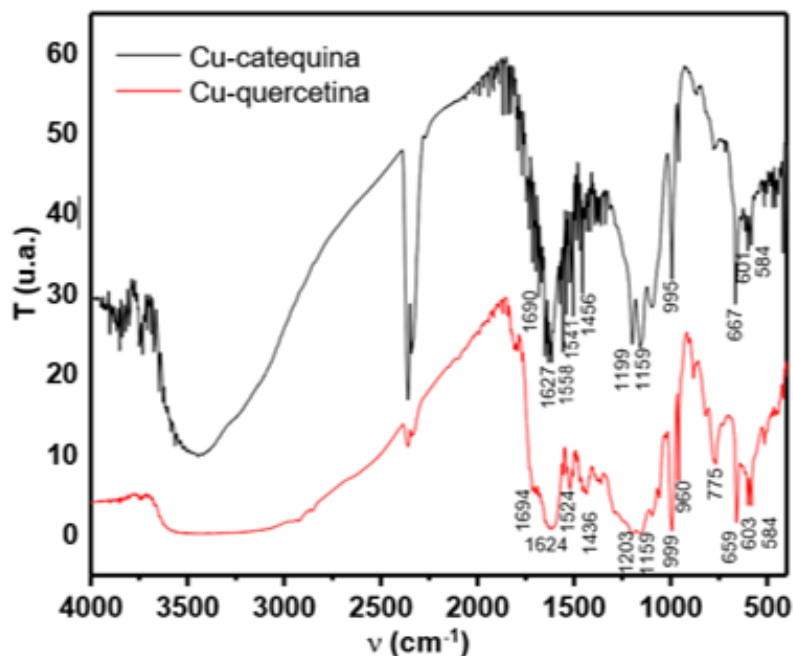


Figura 24. Espectros de infravermelho dos complexos sintetizados neste trabalho na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em pastilhas de KBr. Fonte: O autor (2023)

Ambos os complexos apresentaram uma banda larga por volta de  $3450\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento da ligação O-H ( $\nu$ O-H). A vibração de estiramento de C=O na quercetina livre ocorreu em  $1705\text{ cm}^{-1}$  que foi deslocada para  $1690\text{ cm}^{-1}$  e  $1694\text{ cm}^{-1}$  nos complexos Cu-catequina e Cu-quercetina, respectivamente. O estiramento da ligação C-O-C ( $\nu$ (C-O-C)) é observada em  $1199\text{ cm}^{-1}$  e  $1203\text{ cm}^{-1}$  para Cu-catequina e Cu-quercetina, respectivamente. A presença de  $\nu$ (Cu-O) é observada em  $995\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$  para Cu- catequina e Cu-quercetina, respectivamente.



# CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Vismia***

## 1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1.1 LEISHMANIOSES: DOENÇA TROPICAL

Leishmaniose é uma doença transmitida pela picada do mosquito flebotomíneo fêmea causando infecção pelo protozoário parasita *Leishmania*, sendo encontrado em quatro diferentes continentes de clima tropical e subtropical (ALVAR *et al.*, 2012). Segundo Steverding (2017) a leishmaniose foi disseminada em todo o mundo pelo homem durante as primeiras migrações humanas, além disso, desastres e guerras também contribuíram para a propagação dessa doença.

O vetor pode pertencer aos gêneros *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* e possuem maior participação na transmissão de protozoários das leishmanioses no Brasil e no Mundo (TORRES *et al.*, 2017; WHO, 2018). Os parasitas apresentam duas formas de reprodução e características morfológicas distintas: a forma promastigota (com flagelo livre) encontrada no trato digestivo do inseto e amastigota (sem flagelo livre) interiorizada nas células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

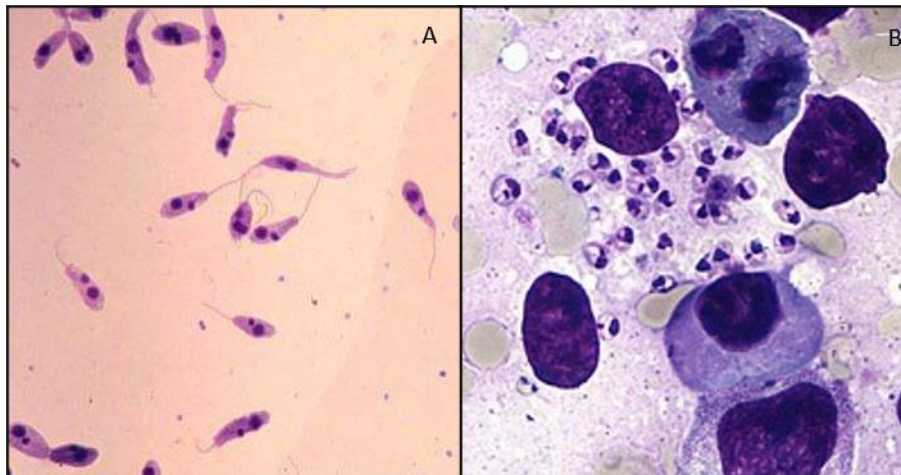


Figura 1. Parasitas da *Leishmania* na forma promastigotas (A) e amastigotas (B).

Fonte: <https://microbeonline.com/nnn-medium-composition-procedure-and-results/>

Atualmente existem três formas principais dessa DN: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e leishmaniose mucocutânea (LCM) (WHO, 2018). A maior parte dos casos de LC ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria (WHO, 2019). A LC é caracterizada por úlceras crônicas com lesões com bordas elevadas, definidas, arredondadas e tecido interno granuloso, geralmente indolor e que podem evoluir para formas graves,

embora não fatais (JENSEN, 2020). A LV é a forma com maior risco de vida, com uma taxa de mortalidade de até 95% se não tratada e de até 10% mesmo quando tratada (NASSIF et al., 2017; VARIKUTI et al., 2018; ONG et al., 2019; RAJ et al., 2020). Ela é o resultado da disseminação de macrófagos infectados do sistema retículo endotelial, com envolvimento na medula óssea, baço e fígado (ABADÍAS-GRANADO et al., 2021). Já a LCM, no que refere a casos de contaminação, 90% residem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru, suas lesões aparecem distantes do local de inoculação e manifesta-se na mucosa do trato respiratório e digestivo superior afetando principalmente a cavidade oral e nasal (MARTINEZ et al., 2019).

No mundo, existem principais espécies que se distribuem de diferentes maneiras de continente para continente e indivíduos da leishmaniose. A Figura 2 mostra que no Brasil encontra-se duas principais doenças da leishmaniose, sendo seu reservatório fundamental os cães e os ratos.

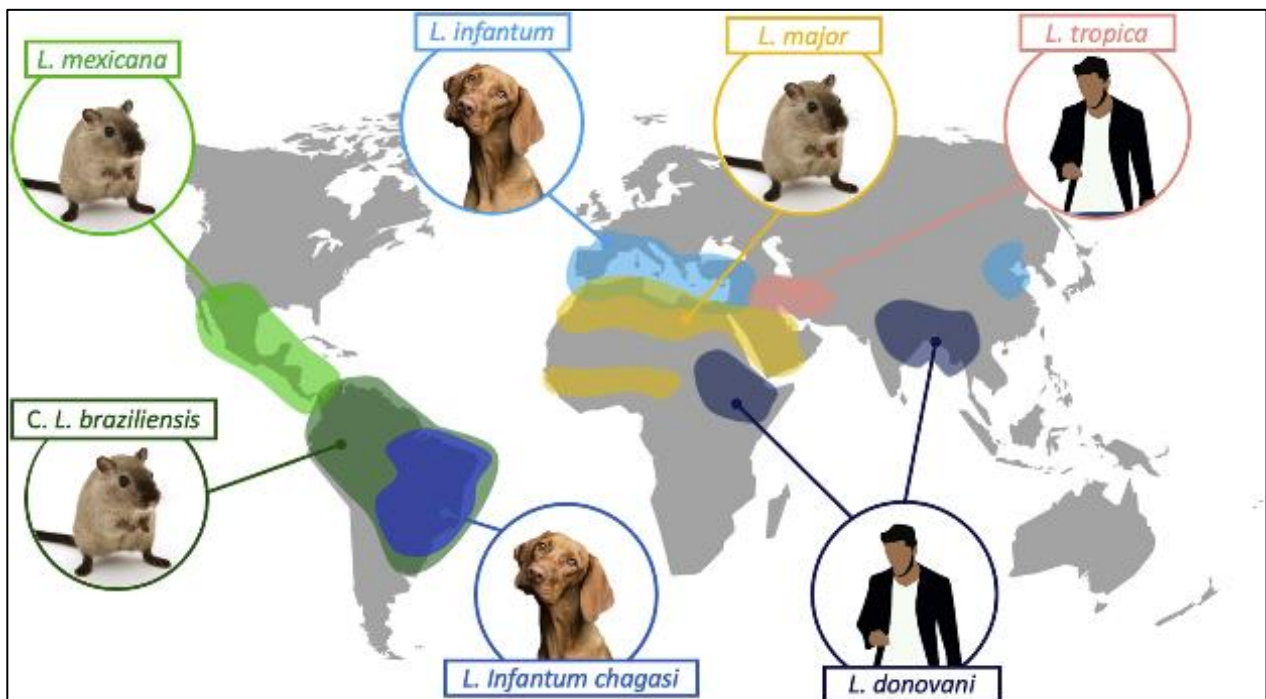


Figura 2. Distribuição geográfica e reservatório fundamental das principais *Leishmania* spp do mundo. Fonte: ABADÍAS et al. (2021).

As espécies mais frequentes de leishmaniose da América são: *L. Mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. infantum chagasi* (LUPI et al., 2009). Entre as *Leishmania* spp. consideradas patogênicas ao homem, as que causam a doença tegumentar no Brasil com maior prevalência são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (ALENCAR; FIGUEIREDO, 2019; VASCONCELOS et al., 2018).

Estudo aponta que os maiores índices de casos da doença confirmados prevalecem nas regiões Norte e Nordeste, sendo a faixa etária de 20 a 59 anos mais atingida (SANTOS *et al.*, 2021). Fatores sociais e ambientais contribuem para um quadro de saúde complexo na Amazônia Ocidental brasileira (Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima) (MENEGUETTI, 2019).

O principal fármaco utilizado no tratamento da leishmaniose no Brasil, é o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime), recomendado pelo Ministério da Saúde por 20 dias para LC na dose de 10 mg-20 mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia e trinta dias para LCM na dose de 20 mgSb<sup>5+</sup>/kg/dia (VASCONCELOS *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019). Esse medicamento é considerado muito eficaz, mas pode causar efeitos negativos para o paciente que utiliza esse tratamento (LRDN, 2016). Não havendo resposta positiva aos antimoniais pentavalentes, o paciente é submetido aos medicamentos alternativos que estão disponíveis no mercado, como anfotericina B, lipossomal, miltefosina, pentamidina e aromomicina (NEVES, 2017; GAMBINO; OTERO Á, 2019), mas a diminuição em sua eficácia, bem como o alto risco de desenvolver resistência ao tratamento levou à suspensão destes tratamentos em alguns países. Por fim, estes compostos também são altamente tóxicos, com efeitos colaterais como turvação da visão, dor no peito, batimento cardíaco irregular e dificuldade para respirar (NASSIF *et al.*, 2017; VARIKUTI *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2018).

Alguns estudos com  $\alpha$ -complexos de hidroxicarboxilato de cobre (II) CuL<sub>2</sub> (65a – 65d) (L = (a) lactato, (b) trifluorolactato, (c) 2- hidroxiiobutirato, (d) trifluoro-2- hidroxiiobutirato) mostraram que no modo de ação frente a promastigotas de *L. amazonensis* o centro metálico é responsável pela atividade do complexo e os ligantes geralmente não são bioativos, mas estão presentes para estabilizar e proteger o centro metálico reativo (ONG *et al.*, 2019; KRASNOVSKAYA *et al.*, 2020). Assim, faz-se necessário desenvolver novos fármacos que possam ser alternativas aos tratamentos atuais.

### 1.1.2 RADICAIS LIVRES: A BUSCA POR ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são produzidos naturalmente no metabolismo dos seres vivos e são neutralizados através de seus antioxidantes (MARTELLI; NUNES, 2014), além disso, estudos revelam a importâncias dessa produção contínua sustenta o

funcionamento do corpo (RAHAL *et al.*, 2014). No entanto, quando é produzido em quantidade excessiva, esse processo tem como resultado um estresse oxidativo que pode levar a diversas consequências celulares acarretando diversas doenças (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Cotinguiba *et al.* (2013) explica que fatores exógenos podem provocar a produção desses radicais em quantidade superior, como poluição, radiação, cigarro, herbicidas entre outros.

Pesquisas apontam diversas doenças em decorrência do desequilíbrio na produção dos radicais livre, como o envelhecimento precoce (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2014), Mal de Alzheimer, Parkinson, Câncer (COVARRUBIAS *et al.*, 2008), cardiopatias e cataratas (SANTOS *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010). A busca por antioxidantes tem aumentado nos últimos tempos, e essa procura tem se referido ao possível papel dessas substâncias na patogênese de muitas doenças (WINTERBOURN, 2008; GIL-CHAVEZ *et al.*, 2013).

A importância da prática de exercício físico e uma dieta rica em antioxidantes oferece como consequência a diminuição do risco do desenvolvimento de enfermidades associadas ao acúmulo de radicais livres, além da melhora na qualidade de vida (VASCONCELOS *et al.*, 2014). Sendo assim, diversos pesquisas vem sendo realizadas na busca de substâncias ativas com alto potencial antioxidante em poupa, resíduos e sementes de frutas (ALVES *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2013; DAIUTO *et al.*, 2014), óleo essencial (XAVIER *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2020), extratos vegetais (VIEIRA *et al.*, 2015; SUKWEENADHI *et al.*, 2020) e até mesmo de geoprópolis de abelhas (SILVA *et al.*, 2013).

Estudos comprovam que os flavonoides apresentam propriedades antioxidantes, sendo possível controlar os radicais de células cancerígenas (AMADO *et al.*, 2011). A interação de compostos fenólicos com centros metálicos pode mudar os efeitos biológicos dos mesmos, sendo a maioria dessas propriedades muitas vezes superiores as dos compostos originais. São vários os exemplos de complexos metálicos, com ligantes naturais, sintéticos ou semissintéticos, que têm sido estudados com o objetivo de melhorar a atividade biológica desses ligantes (MING, 2003). Interessantemente, alguns complexos de cobre têm apresentado atividade biológica, sendo importante realizar testes que possam comprovar essa atividade.

### 1.1.3 ANTIMICROBIANOS: RESISTÊNCIA A FÁRMACOS

O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (DUARTE, 2006).

Duarte (2006) relata que 11 das 80 espécies de plantas medicinais da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas, comumente utilizadas na medicina popular brasileira, apresentaram atividade antimicrobiana, ou seja, contra microrganismos patogênicos. Além disso, os compostos derivados de plantas exibem boa tolerância e aprovação entre os pacientes, parecendo uma fonte confiável de compostos antimicrobianos (GÓRNIAK *et al.*, 2019).

Nascimento *et. al* (2000), avaliaram a atividade antibacteriana de vários extratos de plantas e fitofármacos sobre bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos. A ação antimicrobiana de extratos hexânicos de cascas e de extrato etanólico das raízes de *Vismia* foi testada e comprovada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei* e *Bacillus subtilis* (SANTOS *et al.*, 2007). Outra avaliação antimicrobiana avaliada, mas desta vez a partir da tintura extraída de folhas de *V. guianensis*, mostrou a sensibilidade do organismo de *S. aureus* em quatro diferentes concentrações: 500, 250, 125 e 62,5mg/mL (CAMELO, 2010).

Deste modo, há uma necessidade pertinente de encontrar novas drogas antimicrobianas. A partir disso, o presente estudo selecionou duas espécies de *Vismia* para obtenção de extrato orgânico e análise dos constituintes químicos, além de conhecer as atividades antioxidantes, potencial antimicrobiano de seus extratos e substâncias isoladas e análise de compostos de coordenação com centro metálico.

## 2.1 METODOLOGIA

### 2.1.1 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Para este ensaio 20 µL da amostra foram adicionados a 1,5 mL de solução de Folin Ciocalteu (1:9), após 5 minutos foram adicionados 1,5 mL de bicarbonato de sódio (6%). A mistura reacional foi mantida no escuro por 90 min para posterior análise em Espectrofotômetro de ultravioleta-visível a 725 nm. Foi construída uma curva padrão de ácido gálico de 31,25 a 1000,0 µg/mL, expressa pela equação  $y = 0,0096x + 0,0129$ ,  $R^2 = 0,997$ . Este ensaio foi realizado em triplicado e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (VELIOGLU *et al.*, 1998).

### 2.1.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

No ensaio DPPH, 100 µL da amostra (1 mg/mL) foram misturados com 3,9 mL de solução de DPPH<sup>•</sup> (100 µM) e mantidos no escuro por 30 min. Após isso realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 515 nm. Uma curva padrão de Trolox foi construída de 100 a 2000 µg mL<sup>-1</sup>, expressa pela equação  $y = -0,0006x + 0,9362$ ,  $R^2 = 0,9926$ . Este ensaio foi realizado em triplicado e os resultados foram expressos em µmol ET (MOLYNEUX, 2004).

### 2.1.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO CÁTION RADICAL ABTS

Foi realizada a mistura de 5 mL de solução de ABTS a 7 µM e 88 µL de persulfato de sódio a 140 µM, mantido no escuro por 16 horas. Após isso, 1 mL da solução foi misturado com etanol até absorvância de 0,70 (734nm). Dessa solução 3,0 mL foram misturados com 30 µL de amostra (1 mg/mL) e deixados para reagir no escuro por 6 minutos. Após isso realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 734 nm. A curva padrão de Trolox foi construída entre 100 e 2000 µg mL<sup>-1</sup>, sendo expressa pela equação ( $y = -0,0002x + 0,6548$ ,  $R^2 = 0,9986$ ). Este ensaio foi realizado em triplicado e seus resultados foram expressos em µmol ET (RE *et al.*, 1999).

### 2.1.4 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

#### 2.1.4.1 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS E PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Leishmania) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) criopreservadas no criobanco do Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/COSAS/INPA. Para o cultivo das formas promastigotas foi utilizado o RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado (SFBI) e 50 µg mL<sup>-1</sup> de antibiótico (Gentamicina), incubados a 25 °C de acordo com Jaffe *et al.* (1984), e posteriormente utilizada para os bioensaios.

#### 2.1.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (IC<sub>50</sub>) DOS EXTRATOS DE *Vismia*

A atividade antileishmania das substâncias foram avaliadas pela inibição do

crescimento e mortalidade de promastigotas. As substâncias foram filtradas e diluídas em meio de cultura, para o ensaio foram usadas as concentrações de 125 a 7,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle negativo foi o DMSO 1% (2,2-difenil-1-picril-hidrazil/Merck) e controle positivo foram Pentacarinat<sup>®</sup> (isetionato de pentamidina) e Glucantime<sup>®</sup> (antimoniato de meglumina) nas concentrações de 10 a 0,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de 100 a 7,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A placa de bioensaio (na presença de promastigotas, controles e amostras de *Vismia*), foi incubada em estufa a 25 °C durante 24 a 72 horas. Os bioensaios foram realizados em triplicata e a média do número de células vivas foi utilizada para calcular a IC<sub>50</sub>.

#### 2.1.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A multiplicação das células parasitárias foi determinada pelas curvas sigmoidais, utilizando-se o software GraphPad Prism 9.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares.

#### 2.1.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em ágar (BAUER; KIRBY, 1966), onde as bactérias indicadoras padronizadas foram semeadas com o auxílio de swab estéril em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton. Discos de papel (6 mm) foram embebidos com 30  $\mu\text{l}$  de cada extrato solubilizados em metanol na concentração de 2 mg/mL e deixados evaporar por 24h. Os discos foram colocados nas placas previamente semeadas com os microrganismos testes padronizados. As placas foram armazenadas em geladeira overnight e então incubadas a 35 °C/37 °C por 24h a 48h para bactérias e leveduras respectivamente. Após o período de incubação foi avaliado a formação do halo de inibição (Figura 3).

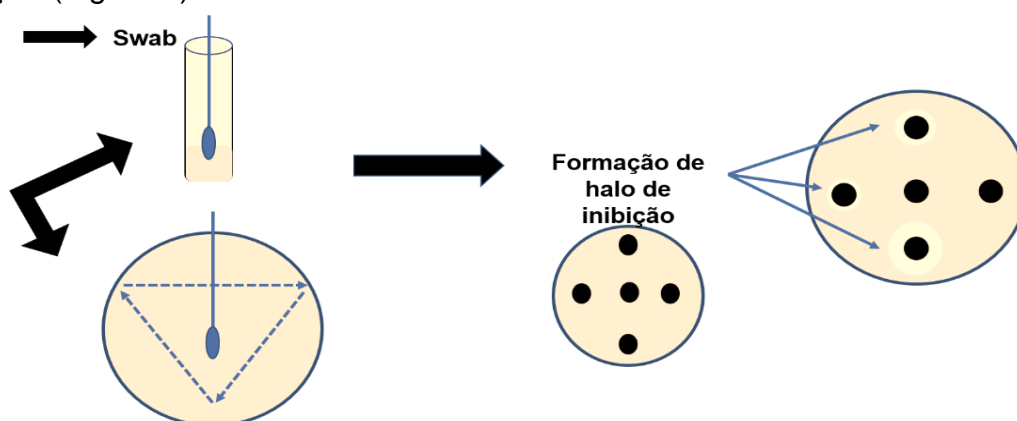


Figura 3. Método de antibiose por difusão em ágar. Fonte: O autor (2022).



As amostras 1(EVC), 2(EVG), 3(EHVG), 4(EMVG), 5(EMVC), 6(EDVG), 7(EHVC), 8(EAVG), 9(EAVC) e 10(EDVC) foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana frente aos seguintes microrganismos indicadores: *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Serratia marcescens*, e *Mycobacterium smegmatis*, cultivados em caldo Luria Bertani e caldo Sabouraud para *Candida albicans* durante 24 e 48 horas, diluídos com solução salina 0,9% de acordo com padronização do tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1%+9,95 mL de ácido sulfúrico a 1%).

### 3.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1.1 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Os resultados da quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS das amostras obtidas estão apresentados na Tabela 1.

Extratos	DPPH ( $\mu\text{M ET}$ )*	ABTS ( $\mu\text{M ET}$ )*	FT (mg EAG/g)**
EVC	1291,4 $\pm$ 28,3	3001,5 $\pm$ 74,24	105,53 $\pm$ 1,62
EVG	1300,3 $\pm$ 7,6	3129 $\pm$ 7,07	99,33 $\pm$ 4,64
EDVG	1113,6 $\pm$ 2,3	2766,5 $\pm$ 130,81	74,56 $\pm$ 3,38
EDVC	861,4 $\pm$ 7,6	2856,5 $\pm$ 102,53	71,46 $\pm$ 0,75
EAVC	226,1 $\pm$ 8,2	944 $\pm$ 42,42	24,33 $\pm$ 1,69
EAVG	642 $\pm$ 7	2394 $\pm$ 70,71	32,92 $\pm$ 1,03
EMVC	76,1 $\pm$ 3,5	426,5 $\pm$ 3,53	5,11 $\pm$ 0,29
EMVG	210,3 $\pm$ 2,3	844 $\pm$ 28,28	13,39 $\pm$ 0,36
EHVC	427 $\pm$ 16,5	1624 $\pm$ 56,56	43,23 $\pm$ 0
EHVG	982 $\pm$ 7	2621,5 $\pm$ 53,03	51,15 $\pm$ 0,29
CAT-cp	182,1,6 $\pm$ 0	-	-
QUER-cp	1778,6 $\pm$ 0	-	-
CAT	1457,9 $\pm$ 2	-	-
QUER	1415,7 $\pm$ 5,3	-	-

Tabela 1. Quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos. \*microlitro de Equivalentes de Trolox; \*\*miligramas de Equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. CAT-cp: complexo de catequina, QUER-cp: complexo de quercetina. O autor (2023).

Os valores de fenóis totais variaram entre 5,11 a 105,23 mg EAG/g. Os que apresentaram os maiores valores foram os extratos EVC e EVG, seguidos dos extratos de diclorometano EDVC e EDVG. Já os extratos EMVC (5,11 ± 0,29) e EMVG (13,39 ± 0,36) apresentaram valores muito baixo na quantificação de fenóis. Em contrapartida, Lins *et al.* (2016), mostraram que frações obtidas em acetato de etila de *V. guianensis* apresentaram maior quantidades de compostos fenólicos, diferenciando dos resultados obtidos nesse estudo. Os compostos fenólicos apresentam uma estrutura química capaz de neutralizar ou sequestrar os radicais livres, atuando no processo oxidativo, ou seja, metabólitos fenólicos apresentam efeito benéfico a saúde (CHUN *et al.*, 2005). Isso ocorre devido os fenóis terem um ou mais hidrogênios de hidroxilas disponíveis para fazer ligação ao radical efetuando a ação antioxidante do organismo, conforme o mecanismo da figura 4.

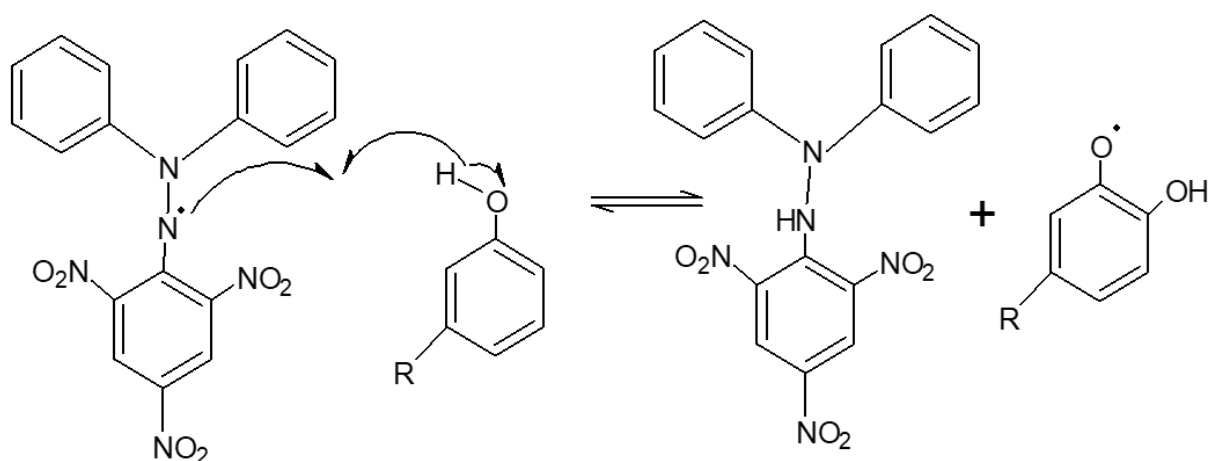


Figura 4. Mecanismo de reação de um fenol com o radical DPPH. Fonte: O autor (2023).

No ensaio de DPPH, pode-se observar que os extratos hidroetanólicos apresentaram maior capacidade de captura dos radicais livres em relação a todos os extratos orgânicos realizados, sendo o extrato de EVC o mais ativo, com capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC) de 1291,4 µM. O complexo QUER-cp destacou-se pela alta eficiência na captura do radical DPPH, apresentando um valor de TEAC de 1787,6 µM, superior a qualquer uma das amostras analisadas neste trabalho e até mesmo comparado com seu ligante de origem QUER que exibiu valor de 1415,9 µM. O complexo CAT-cp apresentou valor de TEAC muito baixo (182,1,6 µM) em comparação ao seu ligante CAT (1457,9 µM), esse resultado pode estar relacionado ao fato de amostra não ter sido solubilizada completamente.

Recentemente uma pesquisa revelou valores superiores a deste estudo, de todos os extratos orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol para estas duas espécies de *Vismia* frente ao radical DPPH, sendo o extrato hexânico de *V. cayennensis* com maior valor (1540,9  $\mu\text{M ET}$ ) e o extrato metanólico desta mesma espécie de menor valor (790,9  $\mu\text{M ET}$ ) (TRINDADE *et al.*, 2023). Os extratos EVC, EVG, EDVG, EDVC e EHVG apresentaram expressivos valores de TEAC frente ao cátion radical ABTS de 3001,5  $\mu\text{M}$ , 3129  $\mu\text{M}$ , 2766,5  $\mu\text{M}$ , 2856,5  $\mu\text{M}$  e 2621,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, demonstrando uma excelente alternativa na ação contra radicais dessa natureza. Além disso o extrato EMVC novamente demonstrou menor eficiência ao ABTS com valor de  $426,5 \pm 3,53 \mu\text{M ET}$ . Uma pesquisa descreveu a atividade antioxidante em extratos dos frutos de *V. guianensis* relacionados aos compostos fenólicos majoritários presentes nesse extrato com valores de  $\text{IC}_{50}$  6,52  $\mu\text{g/ml}$  para DPPH e 10,41  $\mu\text{g/ml}$  para ABTS (ÁLVAREZ *et al.*, 2008).

Esses resultados podem estar relacionados provavelmente a quantidade de fenóis na amostra, visto que, os fenóis são reconhecidos como potentes antioxidantes (SCHNEIDER *et al.*, 2015).

### 3.1.2 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

#### 3.1.2.1 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA FRENTE A *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Os resultados obtidos das avaliações da atividade antileishmania frente a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* estão apresentados na Tabela 2.

Amostra	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
	24h	48h	72h
QUER	82,13	78,09	>100
CAT	83,92	<100	>100
EVC	74,07	74,39	>100
EHVG	>100	89,21	>100
EDVG	>100	>100	>100
EDVC	>100	<100	>100
PTM	0,35	<0,7	<0,7
GLUC	85,4	64,7	>100

Tabela 2. Atividade antileishmania para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e valores calculados de  $\text{IC}_{50}$  por regressão linear das amostras obtidas de *Vismia*. GLUC: Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ; (PTM): Isetionato de pentamidina (Pentacarinat®). Fonte: O autor (2023).

A amostra EVC mostrou melhor atividade antileishmaniana nas concentrações de 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 62,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  sendo capaz de reduzir o número de promastigotas de *L. amazonensis* durante as primeiras 48 horas, não sendo tão eficiente nas 72 horas (Figura 5A). No entanto, este resultado foi um dos mais promissores, aproximando-se de um dos resultados positivos, Glucantime® (GLU) (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) que apresentou IC50 de 85,4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 24 horas e 64,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 48 horas (Figura 5H).

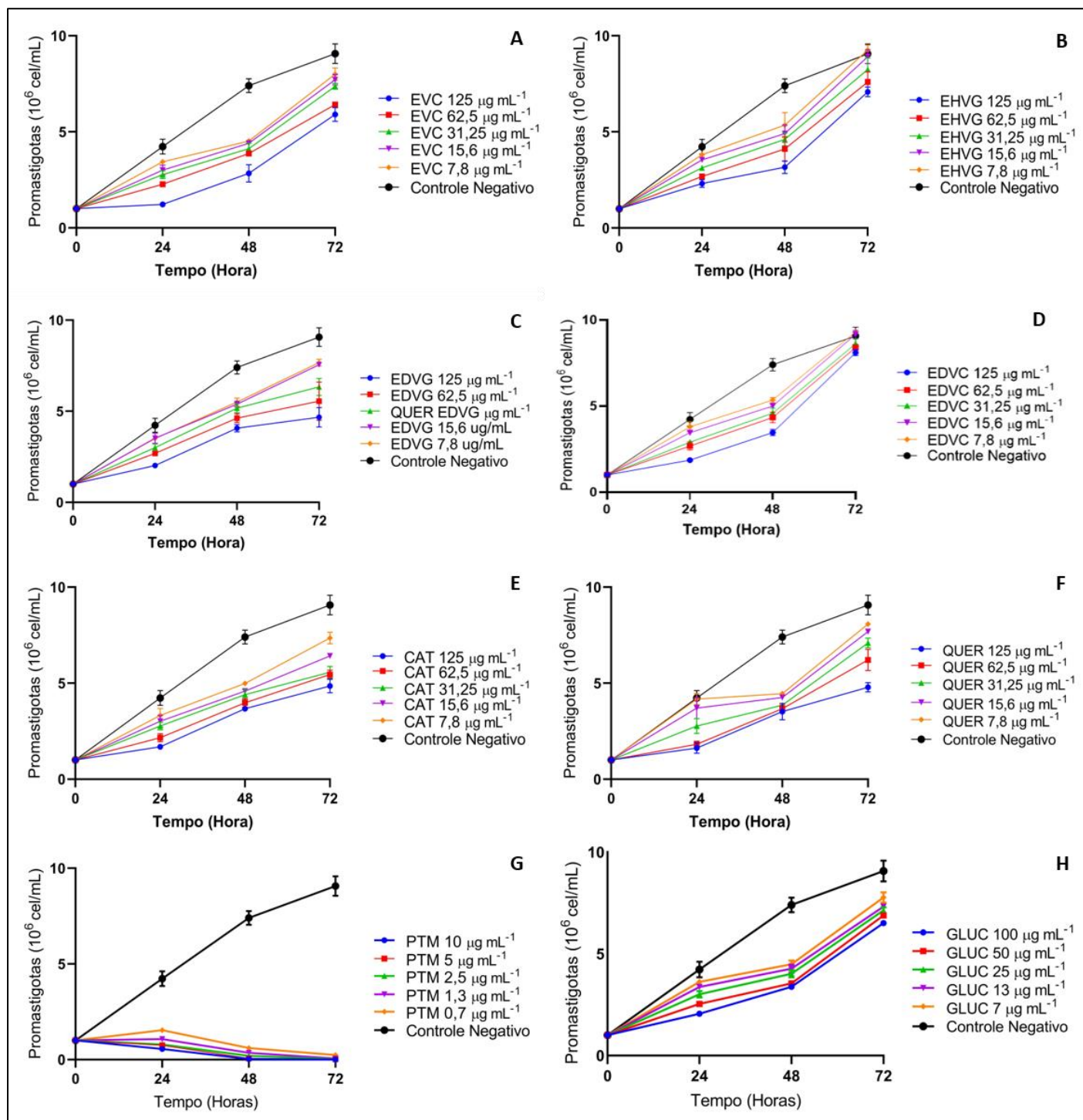


Figura 5. Atividade antileishmaniana de *Vismia* contra *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584). (A) EVC; (B) EHVG; (C) EDVG; (D) EDVC; (E) CAT; (F) QUER; (G) PTM (Pentacarinat®); (H) GLUC (Glucantime®). Os parasitas (106 células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações a 25°C e avaliados de 24 às 72 horas. Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e Isetionato de pentamidina (Pentacarinat® 0,7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram usados como controle positivo. O controle negativo foram os parasitas expostos ao DMSO à 1%. Fonte: O autor (2023).

A amostra de QUER gerou também uma atividade moderada no período de 48 horas ao comparar com o positivo GLU, variando de 82,13  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 78,09  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na concentração  $\text{IC}_{50}$ . Porém, nenhuma das amostras apresentaram um valor próximo do controle positivo PTM (0,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), sendo o mais ativo de todas as amostras testadas (Figura 5G). De todas as substâncias testadas, a amostra que mais se aproximou do controle negativo DMSO, foi a amostra de diclometano EDVG apresentando um  $\text{IC}_{50}$  maior que 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 5C) concluindo que não pode ser capaz de inibir as promastigotas de *L. amazonensis*. Segundo Cuéllar-Cuéllar (2012), o  $\text{IC}_{50}$  dos valores devem estar abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$  para dizer que existe uma possível atividade.

### 3.1.2.2 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA FRENTE A *Leishmania (Leishmania) guyanensis*

Os resultados obtidos das avaliações da atividade anti-leishmania frente a *Leishmania (Leishmania) guyanensis* estão apresentados na tabela 3.

Amostra	IC 50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	
	24h	48h
EVC	88,18	90,39
CAT-cp	85,18	93,43
QUER-cp	78,66	91,35
PTM	4,71	6,34
GLUC	>100	>100

Tabela 3. Atividade antileishmania para as formas promastigotas de *L. guyanensis* e valores calculados de  $\text{IC}_{50}$  por regressão linear das amostras. GLUC: Antimoniato de meglumina (Glucantime® 7,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ; (PTM): Isetionato de pentamidina (Pentacarinat®). Fonte: O autor (2023).

Conforme os resultados observados, todas as amostras submetidas contra promastigotas de *L. guyanensis*, exibiram um valor de  $\text{IC}_{50}$  moderado. O complexo de quercetina teve a maior atividade nas 48 horas de observação em relação as demais, apresentando valores de 78,66  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 91,35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O complexo CAT-cp não apresentou atividade elevada nesta análise, é importante ressaltar que a amostra não foi totalmente solúvel ao DMSO, dificultando a obtenção precisa do resultado.

O Antimoniato de meglumina é o atual medicamento utilizado no tratamento de leishmaniose, mas está por mais de um século sendo utilizado nessa doença (DE CARVALHO *et al.*, 2015). No entanto, a figura 6C mostra que apesar de ele ter sido

avaliado em diferentes concentrações, não foi suficiente contra as cepas de *L. guyanensis*, exibindo valores maiores que  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , ultrapassando os valores do controle negativo. Um estudo relatou sobre a resistência e falhas dessa droga contra cepas de *Leishmania* (ROJAS *et al.*, 2006).

O controle positivo PTM demonstrou a melhor ação contra essas cepas de *L. guyanensis*, sendo que, nenhuma das amostras encontraram-se próximas de seus valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $4,71 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $3,34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 6E). Uma pesquisa revelou a suscetibilidade da pentamidina a para diversos parasitas de *Leishmania* (PADRÓN-NIEVES; PONTE-SUCRE, 2013).

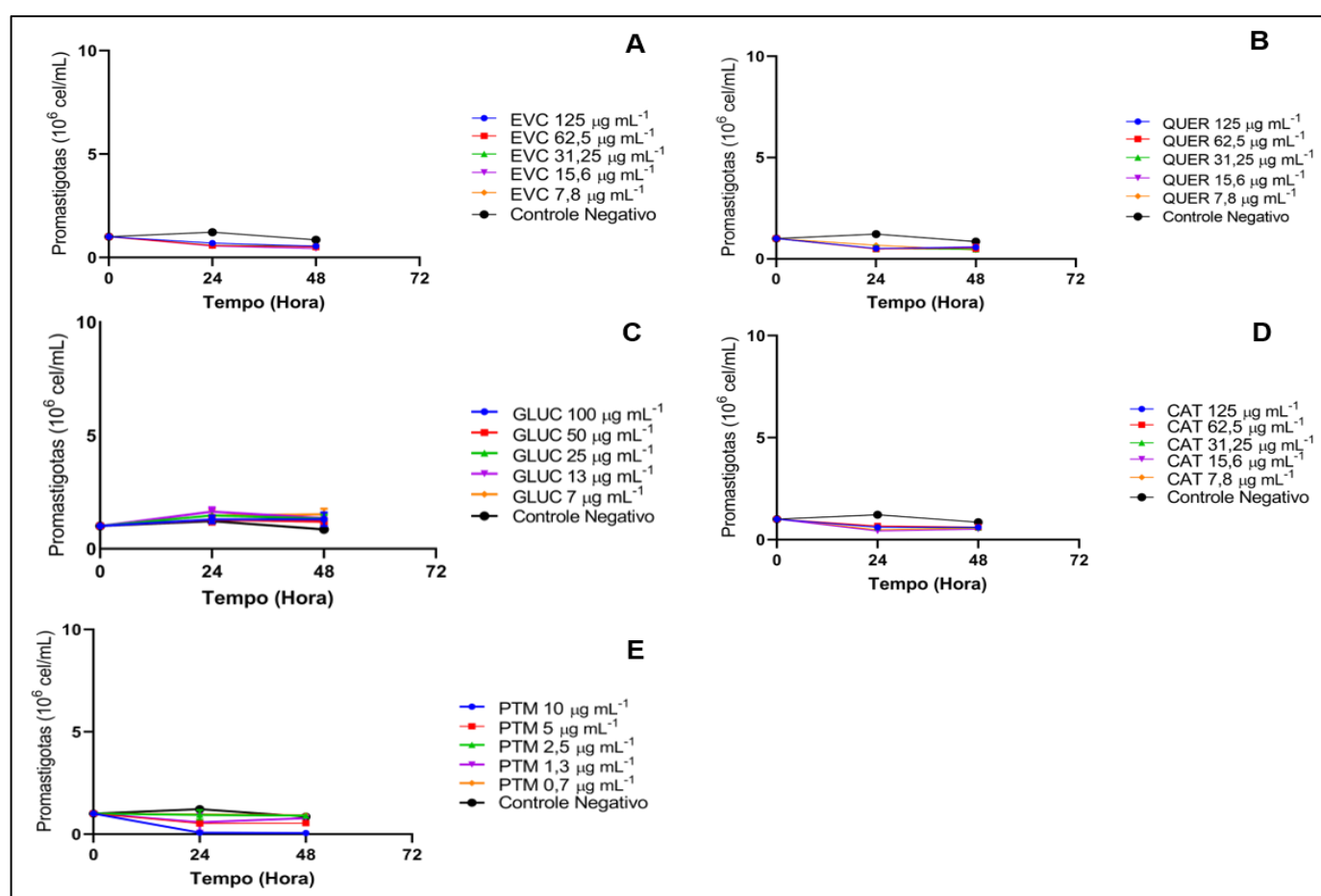


Figura 6. Atividade antileishmaniana de *Vismia* contra *L. (Leishmania) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147). (A) EVC; (B) QUER; (C) GLUC (D) CAT; (E) PTM. Os parasitas ( $10^6$  células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações a  $25^\circ\text{C}$  e avaliados de 24 às 48 horas. Antimoniato de meglumina (Glucantime®  $7,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e Isetionato de pentamidina (Pentacarinat®  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram usados como controle positivo. O controle negativo foram os parasitas expostos ao DMSO à 1%. Fonte: O autor (2023).

Até o momento não foi possível realizar os ensaios de antileishmaniana para os demais extratos dessa pesquisa, além do ensaio de citotoxicidade para todas as

amostras, sendo necessário a continuidade desse estudo para a finalização dessa atividade.

### 3.2.3 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

Pelo método de difusão em ágar, foi detectada atividade antimicrobiana somente para a amostra definida com o código EHVC (Tabela 4). A amostra apresentou atividade apenas para *E. faecalis* com halo de inibição de 12 mm (Figura 7), porém essa foi considerada uma inibição baixa conforme o diâmetro do halo.

Extratos	Atividade (Halo de inibição)
EVC	-
EVG	-
EHVC	+ (12 mm)
EHVG	-
EDVC	-
EDVG	-
EAVC	-
EAVG	-
EMVC	-
EMVG	-

Tabela 4. Atividade antimicrobiana conforme o halo de inibição dos extratos de *Vismia*. Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; Moderada (++): diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm. Negativo (-): ausência de halo. Fonte: O autor (2022).

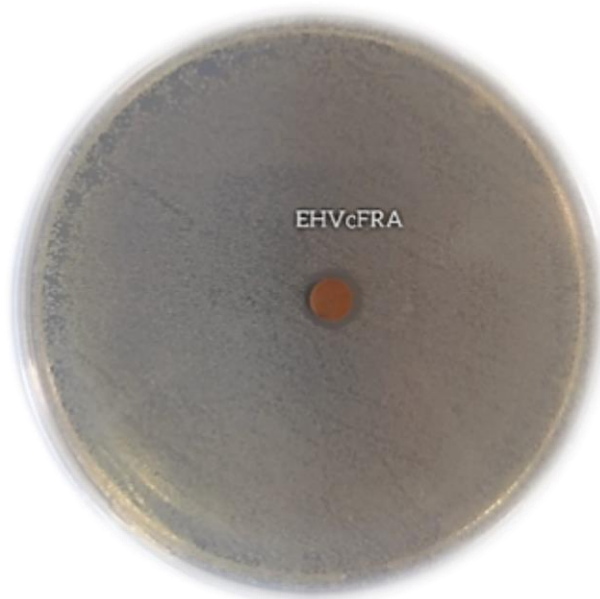


Figura 7. Amostra EHVC em ensaio antimicrobiano com *E. faecalis* ATCC 29212. Fonte: O autor (2022).



Não foi possível a realização dos ensaios antimicrobianos para as substâncias isoladas e seus complexos, devido a pequena quantidade de amostra obtida para realização dos testes.

O interesse por antimicrobianos provenientes de matéria prima vegetal vem se destacando em estudos, principalmente pelo aumento de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas convencionais, o que vem desafiando a ciência e causando sérios riscos à saúde pública em todo o mundo (BEZERRA *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2022; DA CRUZ COSTA *et al.*, 2023). Um estudo revelou que o extrato hidroetanólico das cascas da espécie *V. guianensis*, se mostrou ativo contra a ação da bactéria *E. faecalis* com concentração de 6,25 mg/mL<sup>-1</sup> (OLIVEIRA, 2009). Em contra partida, Sufredini *et al.* (2006), demonstraram que o extrato de *V. guianensis* não possui um potencial significativo contra bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Um estudo recente, mostrou potencial antimicrobiano do óleo essencial para as duas espécies em estudos extraído das folhas, sendo eficaz contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (100 µL/mL) e *E. faecalis* (500 µL/mL), bem como contra os fungos *C. albicans* e *C. krusei* (600 µL/mL cada) (BARBOSA *et al.*, 2021).

Muitos estudos relataram a atividade antimicrobiana de compostos de antraquinona como um derivado de extrato de partes botânicas de *V. laurentii* (KUETE *et al.*, 2007; TALA *et al.*, 2007). Camelo *et al.* (2011) confirmaram que os compostos fenólicos e antraquinonas estão relacionados à atividade antimicrobiana demonstrada contra o microrganismo da pesquisa realizada.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados dessa pesquisa, pode-se ter o conhecimento da importância da investigação acerca das plantas com potencial terapêutico e principalmente no foco em doenças tropicais negligenciadas. Constatou-se que o perfil químico e as atividades biológicas investigadas resultaram nas seguintes conclusões:

✓ Dos extratos para as duas espécies, o que apresentou o maior rendimento foi o extrato hidroetanólico de *V. cayennensis*, ficando logo depois, o extrato de diclorometano de *V. guianensis*;

✓ Através da técnica cromatográfica APCI/MS foi possível a identificação dos compostos fenólicos quercetina e catequina, além da antraquinona fisiona por meio da fragmentação da massa;

✓ Por meio da técnica de cromatografia HPLC/UV foi possível a identificação e isolamento do composto de catequina no extrato hidroalcolico de *V. cayennensis*;

✓ Pela fração do extrato hexânico de *V. guianensis* FRVG foi possível o isolamento de cristais que foram submetidos a técnica de RMN <sup>1</sup>H e caracterizado como a substância fisiona;

✓ O extrato EVG apresentou melhor inibição do radical DPPH. O extrato EVC apresentou melhor inibição do radical ABTS. Além disso, essas duas amostras possuem maior quantidade de compostos fenólicos, sendo possível associar a sua capacidade antioxidante a esses radicais;

✓ Na avaliação antileishmania o extrato EVC apresentou uma moderada atividade contra as promastigotas de *L. amazonensis* nas primeiras 48 horas, e o complexo de quercetina demonstrou a melhor ação entre as amostras testadas contra as cepas de *L. guyanensis* durante as 48 horas de análise;

✓ A amostra EHVC foi a única a demonstrar atividade inibitória contra as cepas de *E. faecalis* com halo de inibição de 12 mm, sendo uma baixa atividade;

✓ Não foi possível realizar testes com o radical ABTS dos complexos, devido à falta de material. Além disso, houve um problema no cultivo das cepas de *Leishmania*, mas o estudo terá continuidade para a elucidação destas atividades.

Portanto a pesquisa corroborou com diversas atividades presentes nas espécies de *V. cayennensis* e *V. guianensis*, contribuindo com informações para essas espécies, visto que a espécie *V. cayennensis* é pouco descrita, além disso, destaca-se principalmente por ser um estudo inédito com a espécie *V. guianensis* contra

promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Através deste trabalho foi possível publicar dois artigos de *Vismia spp* (Anexo I), além da participação em eventos científicos (Anexo II). Espera-se que este estudo tenha continuidade, de forma que possa avaliar outros compostos isolados dessas espécies *Vismia*, frente a promastigotas e amastigotas de espécies de *Leishmania*, visto que, essa é uma DN que atinge a região amazônica.

## 5 REFERÊNCIAS

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermato-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) 2020. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais. Brasília: Anvisa. [Acesso 2023 Jan 11]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>

ALENCAR, Benjamin Franklin Pinheiro; FIGUEIREDO, Ivan Abreu. Perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Maranhão no período de 2015 a 2017. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 10, n. 3, p. 243-250, 2019.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ÁLVAREZ, Edwin et al. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). **Vitae**, v. 15, n. 1, p. 165-172, 2008.

ALVAREZ, Ines et al. Spatiotemporal evolution of upwelling regime along the western coast of the Iberian Peninsula. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 113, n. C7, 2008.

ALVES T.M.A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95:367-373, 2000.

ALVES, Aline Medeiros et al. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabioba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 837-844, 2013.

AMADO, Nathália G. et al. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life sciences**, v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP et al. An update of the Angiosperm Phylogeny

Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

BARBOSA, Antonia Tavares et al. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Fresh *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy and *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. Leaves. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e37410817440-e37410817440, 2021.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BAUER, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4\_ts), 493–496. Doi:10.1093/ajcp/45.4\_ts.493.

**BERTONCELJ J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. Food Chemistry. v. 127, n.1, p. 296–302, 2011.**

BEZERRA, Denise Aline Casimiro et al. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 1, p. 99-106, 2011.

BORGES, A. M. R. Produtos naturais à base de plantas na prevenção e melhoria do fotoenvelhecimento cutâneo. 2017. Tese de Doutorado.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishamiose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2. ed. Brasília; 2017. 191pp.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAMELO, Sarah Regina Pereira et al. Anatomical characterization and Microchemistry of *Vismia guianensis* (aubl.) choisy (Clusiaceae) blade leaf. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 5, p. 1312, 2012.

CAMELO, Sarah Regina Pereira et al. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 12, p. 3224, 2011.

CAMELO, Sarah Regina Pereira. Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Dissertação (Mestrado), 2010.

CARDOSO, Marinho Lucas et al. (Hypericaceae), a new species previously thought to be well-known from the Brazilian Atlantic Forest. 2016.

CARMONA, Fabio; PEREIRA, Ana Maria Soares. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 379-385, 2013.

CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel CFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, S.H. et al. American tegumentar leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and shortterm possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019.

CÉSAR, M. G. A. O estudo das plantas no ensino fundamental. In: Encontro Nacional de Ensino de Química, 2014, Ouro Preto.

CHAMBERS, Jeffrey Q. et al. Hyperspectral remote detection of niche partitioning among canopy trees driven by blowdown gap disturbances in the Central Amazon. **Oecologia**, v. 160, p. 107-117, 2009.

CHUN, Sung-Sook et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

CORREIA OSORIO, Maria Izabel. Estudo químico e biológico dos ramos de espécies do gênero *vismia vand.*(hypericaceae). 2019.

**COSTA, Milena da Cruz et al. Potencial dos compostos bioativos da própolis marrom como antimicrobiano natural em filmes de alginato aplicados na *Piper nigrum*L. *Ciência Rural*, v. 53, 2022.**

COTINGUIBA, George Gomes et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2013.

COVARRUBIAS, Luis et al. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?. **Developmental biology**, v. 320, n. 1, p. 1-11, 2008.

CROCKETT, Sara L. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). **Natural product communications**, v. 5, n. 9, p. 1934578X1000500926, 2010.

CROCKETT, Sara L.; ROBSON, Norman KB. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. **Medicinal and aromatic plant science and biotechnology**, v. 5, n. Special Issue 1, p. 1, 2011.

CUÉLLAR-CUÉLLAR, ARMANDO et al. Evaluación preliminar de la composición química de las hojas de carica papaya ly del efecto anti protozoario de un extracto enriquecido en alcaloides a partir de la misma. **Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA**, v. 4, n. 2, p. 364-376, 2012.

CUESTA-RUBIO, Osmany; PICCINELLI, Anna Lisa; RASTRELLI, Luca. Chemistry and biological activity of polyisoprenylated benzophenone derivatives. **Studies in natural products chemistry**, v. 32, p. 671-720, 2005.

LINS, Antônio C. S. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante das partes aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 157-168, 2016.

**DA CRUZ COSTA, Milena et al. Potencial dos compostos bioativos da própolis marrom como antimicrobiano natural em filmes de alginato aplicados na *Piper nigrum* L. *Ciencia rural*, v. 53, n. 5, p. 19, 2023.**

DAIUTO, Érica Regina et al. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate'Hass'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 417-424, 2014.

DE CAMPOS, Bruno R. et al. The effect of ammonia, nitrite, and nitrate on the oxygen consumption of juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817)(Crustacea: Decapoda). **Journal of Applied Aquaculture**, v. 26, n. 1, p. 94-101, 2014.

DE CARVALHO, Alcione S. et al. Um novo processo para a obtenção do antimoniato de meglumina, visando a produção do medicamento genérico. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 684-696, 2015.

DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira; DE SOUSA, Wendel Cruvinel; DE SOUZA CASTRO, Carlos Frederico. Caracterização química e atividades antioxidante e antifúngica do óleo essencial das flores de [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank.) Pilger](Bixaceae). **Revista Principia-Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, n. 52, p. 80-91, 2020.

DE PRIORIDADES, DEFINIÇÃO. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-2, 2010.

DO AMARAL, CARMO ESTANISLAU. *Vismia conduplicata* (Hypericaceae), a new species from Mato Grosso, Brazil. **Phytotaxa**, v. 338, n. 1, p. 125-129, 2018.

DOMINGUEZ RENGIFO, Daniza. Actividad antioxidante en hoja y corteza de *Pichirina colorada* (*Vismia cayennensis*), automatización y aplicación en una bebida funcional. 2010.

DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLFF, Petr. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2012.

DUARTE, Ana Flávia Schwabe et al. O uso de plantas medicinais durante a gravidez e amamentação. **Visão Acadêmica**, v. 18, n. 4, 2018.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

FRANÇA, Inácia Sátiro Xavier de et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, p. 201-208, 2008.

FURLAN, Grotta Beatriz Mara; Epidemia de Leishmaniose Visceral no município de Campo grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia. Serv. Saúde**, Brasília, 19 (1): 15-24. Jan - mar, 2010.

GAMBINO, D.; OTERO Á, L. Metal Compounds in the Development of Antiparasitic Agents: Rational Design from Basic Chemistry to the Clinic. **Metal ions in life sciences**, vol. 19, p. 331–357, 2019.

GARCIA, Leila Posenato et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. 2011.

GIL-CHAVEZ, G.J. et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Reviews In Food Science And Food Safety**, v.12, n.1, p.5–23, 2013.

GOMES, B. A. Q. Efeitos da suplementação com antioxidantes sobre as alterações oxidativas cerebrais e pulmonares em malária murina. 2011. **Tese de Doutorado**. Master's Thesis, Federal University of Para, Belem, PA, Brazil.

GOMES, Orleyson Cunha. Estudo Químico de *Vismia Japurensis* Reich (clusiaceae) Visando Substâncias Antioxidantes. **XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA–CNPq/FAPEAM**, 2011.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GÓRNIAK, Ireneusz; BARTOSZEWSKI, Rafał; KRÓLICZEWSKI, Jarosław. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry reviews**, v. 18, p. 241-272, 2019.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

HAY, Anne-Emmanuelle et al. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. **Life sciences**, v. 75, n. 25, p. 3077-3085, 2004.

HUSSAIN, Hidayat et al. Chemistry and biology of genus *Vismia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 11, p. 1448-1462, 2012.

HUSSEIN, Ahmed A. et al. Bioactive constituents from three *Vismia* species. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 858-860, 2003.

JAFFE, C.L.; GRIMALDI, J.G.; MCMAHON-PRATT, D. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: morel, C.M- (ed), Genes and Antigens of Parasites. **A Laboratory Manual**. 2ed. Fundação Oswaldo Cruz, p. 47-91, 1984.

JENSEN, Bruno Bezerra. Avaliação da fração diclorometano de *Leishmania ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea. 2020.

JUDD, W. S; CAMPBELL, C. S; KELLOGG, E. A; STEVENS, P.F; DONOGHUE, E. A. **Sistemática de vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009. ed. 3, p. 632

KADIR, Mohammad Fahim; SAYEED, Muhammad Shahdaat Bin; MIA, M. M. K. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by indigenous and tribal people in Rangamati, Bangladesh. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 627-637, 2012.

KALEMBA D, KUNICKA A (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr. Med. Chem.** 10: 813-829.

KAUR, Dasmeet; CHUGH, Vishal; SONI, Giridhar. Antioxidant potential in seeds of *Coriandrum sativum*-an in vitro study. **Journal of Progressive Agriculture**, v. 5, n. 2, p. 66-71, 2014.

KRASNOVSKAYA, Olga et al. Copper coordination compounds as biologically active agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3965, 2020.

KUETE, Victor et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 372-379, 2007.

- LAVAUD, Alexis et al. Paradoxical effects of polyphenolic compounds from Clusiaceae on angiogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 514-523, 2012.
- LEÃO, Roberta Braga Amoras; FERREIRA, Márlia Regina Coelho; JARDIM, Mário Augusto Gonçalves. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.
- LEMOS, Maria Deuzina Alves, Odaíris Holanda de Sousa e Zilene do Socorro Santana Brígida da Silva. Perfil da Leishmaniose Visceral no Brasil: Uma Revisão Bibliográfica. **Facit Business and Technology Journal**. 2019;9(1): 93-11.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa. Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.
- LRDN, Brahim-Paes. Distribuição espaçotemporal dos casos humanos de leishmaniose tegumentar americana notificados no estado do Rio de Janeiro de 2001 a 2013 e associação com variáveis clínicas e populacionais [Doctoral thesis]. **Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz**, 2016.
- LUPI, Omar et al. Tropical dermatology: tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 6, p. 897-925, 2009.
- MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- MARÍN, Karina et al. 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. 39-45, 2017.
- MARINHO-FILHO, Jader; VASCONCELLOS-NETO, João. Dispersão de sementes de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers.(Guttiferae) por morcegos na região de Manaus, Amazonas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 8, p. 87-96, 1994.
- MAROYI, A. *Eucleaundulata* Thunb.: Review of its botany, ethnomedicinal uses, phytochemistry and biological activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**; 10(11): 1030–1036, 2017.
- MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis Morais Franco. Radicais livres: em busca do



equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

MARTI, Guillaume et al. Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 75-85, 2009.

MARTINEZ-RICO, Jessica Carolina; HERZ-RUELAS, Maira Elizabeth; OCAMPO-CANDIANI, Jorge. Leishmaniasis cutânea y mucocutânea: abordaje clínico, diagnóstico y terapéutico. **Piel**, 2019.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, vol. 94, no. 2, p. 103–110, 2016.

MATIAS DOS SANTOS, Gerusa et al. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 58, n. 2, p. 187-192, 2008.

MCGWIRE, B. Satoskar; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MENEGUETTI, N. F. S. P.; SIVIERO, A. Potencial biotecnológico de espécies vegetais oleaginosas ocorrentes em comunidades extrativistas do Acre. **Embrapa Acre- Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2019.

MESQUITA, Rita de Cássia Guimarães et al. Amazon rain forest succession: stochasticity or land-use legacy?. **BioScience**, v. 65, n. 9, p. 849-861, 2015.

MEURER, Igor Rosa; COIMBRA, Elaine Soares. Doenças tropicais negligenciadas e o seu contexto no Brasil. **HU Revista**, v. 48, 2022.

MING, LI-JUNE. Structure and function of “metalloantibiotics”. **Medicinal research reviews**, v. 23, n. 6, p. 697-762, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. **Brasília–DF: Ministério da Saúde, Brasil**, p. 71, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin **J. Sci. Technol.**, v. 50, n. 2, 2004.

MORAIS, Mônica Lopes et al. Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 355-360, 2013.

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

MOTTA, Elizangela Pestana et al. The Anti-Virulence Effect of *Vismia guianensis* against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1834,

2022.

MOURÃO, K. S. M.; BELTRATI, C. M. Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, p. 147-158, 2001.

MURBACK, N.D.N.; NASCIMENTO, R.A.F.; DORVAL, M.E.M.C.; HANS FILHO, G.; NAKAZATO, K.R.O. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **An. Bras. Dermatol.** V.86, n.1, p.55-63, 2011.

NAGLE, A.S. et al. Recent developments in drug Discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11305-11347, 2014.

NASCIMENTO, Gislene GF et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASSIF, Priscila Wolf et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology**, v. 144, n. 8, p. 995-1004, 2017.

NEVES, T.S. Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil: epidemiologia, diagnóstico e perspectivas de controle. Centro Universitário de Brasília. Faculdades de Ciências da Educação e Saúde. Graduação de Biomedicina. 2017, Brasília. Trabalho de conclusão de curso.

NNN medium: Composition, Preparation, Results. Disponível em <https://microbeonline.com/nnn-medium-composition-procedure-and-results/>. Acessado em 12 de jan de 2023.

NUNEZ, Richard et al. Evaluacion de la actividad antibacteriana y efecto citotoxico de extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v. 55, n. 2, p. 29-35, 2013.

OLIVEIRA, Adam Heron de. Atividade antimicrobiana e imunológica in vitro dos extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.)(lacre). 2009.

OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, p. 511-523, 2016.

ONG, Y. C.; ROY, S.; ANDREWS, P. C.; GASSER, G. Metal Compounds against

Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, vol. 119, no. 2, p. 730–796, 2019.

OTTOBELLI, Ivonei et al. Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (araceae) e *Vatairea guianensis* aubl.(fabaceae). **Acta Amazonica**, v. 41, p. 393-400, 2011.

PADRÓN-NIEVES, Maritza; PONTE-SUCRE, Alicia. Resistance markers in *Leishmania*: in vitro susceptibility to leishmanicidal drugs vs. calcein retention isolated from patients. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 32, n. 2, p. 29-33, 2013..

PASQUA, G. et al. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* DC. **Protoplasma**, v. 189, p. 9-16, 1995.

PEDROZA, Laila da Silva. Estrutura molecular e atividade biológica de metabólitos secundários de espécies de *Vismia* Vand (Hypericaceae). 2019.

PIOVESAN, Natiéli et al. **Influência de diferentes parâmetros em métodos de extração de compostos bioativos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) e atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

POLITI, M. et al. HPLC-UV/PAD and HPLC-MSn analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrone. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 15, n. 6, p. 355-364, 2004.

RAHAL, Anu et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, v. 2014.

RAJ, S.; SASIDHARAN, S.; BALAJI, S. N.; DUBEY, V. K.; SAUDAGAR, P. Review on natural products as an alternative to contemporary anti-leishmanial therapeutics. **Journal of Proteins and Proteomics**, vol. 11, no. 2, p. 135–158, 2020.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUES, Tayana Barrozo. Fluorescência da clorofila e emissões de isopreno em função do aumento da temperatura em indivíduos de *Vismia guianensis* na Amazônia Central. 2019.

ROJAS, Ricardo et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 10, p.

1375-1383, 2006.

RUHFEL, Brad R. et al. Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 2, p. 306-325, 2011.

SADOWSKA-BARTOSZ, Izabela; BARTOSZ, Grzegorz. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SANTOS, A. L. et al. Ensaio microbiológico dos extratos e frações da *Vismia guianensis*. Clusiaceae.(Aubl.) Pers. **30º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

SANTOS, Gabriela Romão de Almeida Carvalho et al. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Enfermagem em Foco**, v. 12, n. 5, 2021.

SANTOS, Marcelo H. dos et al. Xanthones from *Vismia latifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 537-539, 2000.

SCHNEIDER, A. L. S. et al. Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* JA Schmidt (Solanaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1103-1111, 2015.

SEO, Eun-Kyoung et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

SILVA, A. B., SILVA, T., FRANCO, E. S., RABELO, S. A., LIMA, E. R., MOTA, R. A., CAMARA, C. A. G. Da. Pontesxfilho, N. T. Atividade antibacteriana, composição química, e citotoxicidade do óleo essencial de folhas de árvore de pimenta brasileira (*Schinusterebinthifolius*Raddi). **Brazilian Journal Microbiologic**, v. 41, p. 158X163. 2010.

SILVA, Ellen Cristina Costa da et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, p. 628-633, 2013.

SILVA, Leomara Andrade da et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). 2018.

SILVA, Natália Coelho da. Comparação do perfil de metabólitos secundários em diferentes órgãos de *phyllanthus niruri* l.(euphorbiaceae). 2013.

SILVESTRE, Raquel G. et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9888-9893, 2012.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan net/cnv/ltabr.def> (2019). Acessado em: 10 Janeiro 2023.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, Wanderley de et al. Doenças negligenciadas. 2012.

STEVENS, P.F. Hypericaceae. The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae alliance, Passifloraceae alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae. **Springer**, Berlin, v. 9, pp. 194-201, 2007

STEVEDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

SUFFREDINI, Ivana B. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 223-226, 2007.

SUKWEENADHI, Johan et al. Antioxidant activity screening of seven Indonesian herbal extract. **Biodiversitas**, v. 21, n. 5, p. 2062-2067, 2020.

TALA, Michel F. et al. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guineensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 310-312, 2013.

TALA, Michel F. et al. Laurentixanthone C: A new antifungal and algicidal xanthone from stem bark of *Vismia laurentii*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 62, n. 4, p. 565-568, 2007.

TEKIN, Tuçe Hazal et al. Full in-vitro analyses of new-generation bulk fill dental composites cured by halogen light. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 436-445, 2017.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.

TRINDADE, Ívina Thayná Miranda et al. Análise quimiométrica e avaliação do potencial antioxidante dos extratos orgânicos de *Vismia* spp. **Concilium**, v. 23, n. 6,

p. 294-306, 2023.

VARIKUTI, Sanjay et al. Host-directed drug therapies for neglected tropical diseases caused by protozoan parasites. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2655, 2018.

VASCONCELOS, Jaira Maria et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.

VASCONCELOS, Thiago Brasileiro de et al. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VELIOGLU, YSO et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VIEIRA, L. M. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.(Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 521-527, 2015.

VIERA, Vanessa Bordin et al. **Compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana na casca de cebola roxa (*Allium cepa* L.) submetidos a diferentes métodos de extração**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

VIZCAYA, Marietta et al. 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.

Vogel Ely, C.; Shimizu, G.H.; Martins, M.V.; Marinho, L.C. *Hypericaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB84140>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

WINTERBOURN, Christine C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. Disponível em: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/Leishreport2019\\_eng.pdf](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/Leishreport2019_eng.pdf) f? ua=1. Acesso em 12 de jan de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): Leishmaniasis. 2018. Disponível em:

[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em 12 de jan de 2023.

XAVIER, Marcelo N. et al. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schlttdl.(Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016.

XAVIER, Thangaraj Francis; KANNAN, Moorthy; AUXILIA, Anthonysamy. Observation on the traditional phytotherapy among the Malayali tribes in Eastern Ghats of Tamil Nadu, South India. **Journal of ethnopharmacology**, v. 165, p. 198-214, 2015.

ZAPPI, Daniela C. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

**Chemical constituents and antioxidant capacity of fruit extracts from  
*Vismia cayennensis***

**Constituintes químicos e atividade antioxidante em extratos dos frutos  
de *Vismia cayennensis***

Recebimento dos originais: 04/04/2023  
Aceitação para publicação: 03/05/2023

**Aniele da Silva Neves Lopes**

Graduation in Chemistry and Biology  
Institution: Federal University of Amazonas  
Address: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, Manaus - AM,  
CEP: 69067-005  
E-mail: aniele.neves16@gmail.com

**Woslon Magalhães Paes**

Graduation in pharmacy  
Institution: Federal University of Amazonas  
Address: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, Manaus - AM,  
CEP: 69067-005  
E-mail: woslon12@gmail.com

**Jaqueline de Araújo Bezerra**

Doctor in Chemistry  
Institution: Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas  
Address: Estr. Coari Itapeua, s/n, Itamarati, Coari - AM, CEP: 69460-000  
E-mail: jaqueline.araujo@ifam.edu.br

**Josiana Moreira Mar**

Doctor in Chemistry  
Institution: Federal University of Amazonas  
Address: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, Manaus - AM,  
CEP: 69067-005  
E-mail: josimoreira54@gmail.com

**Edgar Aparecido Sanches**

Doctor in Chemistry  
Institution: Federal University of Amazonas  
Address: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, Manaus - AM,  
CEP: 69067-005  
E-mail: sanches.ufam@gmail.com



**Paulo José de Sousa Maia**

Doctor in Chemistry

Institution: Federal University of Rio de Janeiro

Address: Av. Pedro Calmon, 550, Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, CEP: 21941-90

E-mail: pmlpcb@gmail.com

**Geone Maia Corrêa**

Doctor in Chemistry

Institution: Federal University of Amazonas

Address: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, Manaus - AM, CEP: 69067-005

E-mail: geonemaia@ufam.edu.br

**Dominique Fernandes de Moura do Carmo**

Doctor in Chemistry

Institution: Federal University of Amazonas

Address: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, Manaus - AM, CEP: 69067-005

E-mail: dominiquefmc@ufam.edu.br

**ABSTRACT**

The genus *Vismia* producing exudates of secretory structures present in botanical parts such as stems, fruits and roots, presenting a wide variety of secondary metabolites of both chemical and biological complexity. The objective is evaluate the antioxidant capacity of the species, in addition to isolating substances from fractions of the fruit extract. The antioxidant capacity of crude fruit extracts of *Vismia cayennensis* was assessed by DPPH and their content of total phenolic compounds was quantified. structures were determined by spectroscopy, including NMR, and compared to literature data. The extracts exhibited antioxidant activity against the radical under investigation, especially the hexane (EHVcFr) and dichloromethane (EDVcFr). The EDVcFr extract also exhibited the highest content of total phenolic compounds. The extract with average polarity EDVcFr, was selected for chromatographic analysis, resulting in the isolation of the triterpene friedelin and three prenylated anthranoids: harunganol B, vismin, and ferruginine A. This is the first account of isolation of harunganol B in the genus *Vismia*. Therefore, the species *V. cayennensis* can be another promising source of phytoantioxidants for future to fight free radicals.

**Keywords:** antioxidant, *Vismia*, resin, isolation.

**RESUMO**

O gênero *Vismia* produz exsudatos de estruturas secretoras presentes em partes botânicas como caules, frutos e raízes, apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários de complexidade química e biológica. O objetivo é avaliar a capacidade antioxidante da espécie, além de isolar substâncias de frações do extrato da fruta. A capacidade

antioxidante de extratos brutos de frutos de *Vismia cayennensis* foi avaliada por DPPH e seu teor de compostos fenólicos totais foi quantificado. As estruturas foram determinadas por espectroscopia, incluindo RMN, e comparadas com dados da literatura. Os extratos apresentaram atividade antioxidante frente ao radical investigado, destacando-se os extratos hexânico (EHVcFr) e diclorometânico (EDVcFr). O extrato de EDVcFr também apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais. O extrato com polaridade média EDVcFr, foi selecionado para análise cromatográfica, resultando no isolamento do triterpeno fritoelina e três antranóides prenilados: harunganol B, vismina e ferruginina A. Este é o primeiro relato de isolamento de harunganol B no gênero *Vismia*. Portanto, a espécie *V. cayennensis* pode ser outra fonte promissora de fitoantioxidantes para o futuro combate aos radicais livres.

**Palavras-chave:** antioxidante, *Vismia*, resina, isolamento.

## 1 INTRODUCTION

Plants of the *Vismia* genus, pertaining to the *Clusiaceae* family, are used in folk medicine to treat a variety of diseases, especially in anti-leishmania, anti-malarial, anti-inflammatory, anti-hemorrhagic, and anti-microbial treatments (LORENZI; SOUZA, 2001). Much of the pharmacological activity of *Vismia spp.* is attributed to the resinous material found in their peel and fruit. These species are widely used by indigenous people living in the Amazon Forest, such as the Yanomami, who extract the resin present in their fruit to treat cutaneous leishmaniasis (MILLIKEN & BRUCE, 1999). The resin is rubbed on the edges of the wounds, which heal after the treatment period. Species of this genus are also employed to treat malaria (ADJANOHOUN & AKÉ-ASSI, 1979; MBWAMBO et al., 2004), dermatitis, skin conditions, rheumatic diseases (LOPES et al., 2012), tumors, and chronic ulcers (REYS et al., 2004). Some *Vismia* species have also been used in folk pharmacopeia as purgative and antipyretic medicines (ALVAREZ et al, 2008).

The most common *Vismia* species in Brazil are *V. brasiliensis* and *V. guianensis* (DI STASI et al., 2002). Other species also found in the country are *V. bacifera*, *V. cauliflora*, *V. cayennensis*, *V. guianensis*, *V. laurentii*, *V. macrophylla*, *V. mexicana*, *V. orientalis*, *V. pozuzoensis*, *V. rubescens*, and *V. tomentosa* (UEMOTO et al., 2019).

A good deal of research has been carried out on *V. guianensis*, whose resin, usually yellowish, orange or red-orange, is rich in starch (MOURÃO & BELTRATI, 2001;



MARTINS et al., 2018). On the other hand, *V. cayennensis* has drawn less interest; the literature presents only a small number of studies on it. Although there are data on its morphoanatomical profile, little research has been conducted on its chemical profile and pharmacological potential.

*V. cayennensis* leaves are amphistomatic with paracytic stomata; its epidermis exhibit simple tector trichomes (DE MOURA et al., 2008). This species produces stiff brownish fruits with succulent and reddish pulp. Its fruits have a honeycomb texture with tiny round seeds (CARMO, 2015).

*Vismia* species are well-known sources of anthranoids (GROSSE, et al., 1997), terpenoids, flavonoids (SEO et al., 2000), quinones (GONZALES et al., 1980; MONACHE, 1985; BOTTA et al., 1986) and xanthones (BOTTA et al., 1986). A large number of prenylated and non-prenylated xanthones has been identified in these species. The antioxidant, antimalarial (SALAS et al., 2008; NOUNGOUE et al., 2008) and antimicrobial properties of these compounds have been previously reported in the literature (ZHOU et al., 2017; BUITRAGO et al., 2015; SILVESTRE et al., 2015).

Other biological activities have already been scientifically identified for *Vismia* species, cytotoxic activity against different cancer cell lines has been reported for methanolic extracts from *V. baccifera*, *V. jefensis*, and *V. macrophylla* leaves (HUSSEIN et al., 2003). The methanolic extract of *V. rubescens* has also been reported as active against *Staphylococcus aureus* (TAMOKOU et al., 2009), whereas *V. baccifera* essential oils have exhibited antifungal activity against *Candida krusei* (VIZCAYA et al., 2014). In addition, the methanolic extract of *V. baccifera* has shown antioxidant capacity against DPPH radicals (BUITRAGO et al., 2016).

This study focuses on a *Vismia* species native to Northern Brazil: *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers (DO CARMO et al., 1981). Locally known as 'lacre', the resinous material present in the bark and fruit of this species has been employed to treat dermatitis, leprosy, herpes, syphilis, scabies, and eczema (KERHARO, 1974).

Notwithstanding, only a small number of studies have been conducted on this species. A recent study identified the antimicrobial capacity of its leaves, especially against *Escherichia coli* and *S. aureus* (at concentrations of 50 µg/mL and 25 µg/mL,



respectively) and *C. parapsilosis* (at 50 µg/mL). This inhibitory activity has been attributed to its having substantial amounts of the sesquiterpenes germacrone and copaene (DA SILVA et al., 2021).

In view of the aforementioned context and considering the scarcity of studies carried out on *V. cayennensis* so far, it is important to further investigate this species. Accordingly, this study performed chemical and biological analyses on *V. cayennensis* to contribute to the existing scientific information on this species. That is, the antioxidant capacity of several crude fruit extracts of *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. was assessed against DPPH radicals, and the main constituents of the most active extract were isolated by chromatography analysis.

## 2 METHODOLOGY

### 2.1 SAMPLING OF PLANT MATERIAL

Fertile branches of *V. cayennensis* were collected at the terra firme rainforest surrounding the city of Itacoatiara, Amazonas, Brazil. These fertile branches were herborized, and their exsiccates were placed at the State University of Amazonas herbarium. At least three meristematic apices, fully expanded leaves, and inflorescences with pistillate and staminate flowers in anthesis were sampled from three different specimens. The plant material was collected for scientific use as described and authorized by the National Genetic Heritage Management System (SisGen) (no. A77799D).

### 2.2 OBTAINING THE RESIN

In order to prepare *V. cayennensis* extracts, 240 g of dry fruits were used. The fruits (Figure 1) were split in halves to facilitate the removal of the resin present inside and posteriorly were ground with a pestle in a glass vessel containing 100 mL of organic solvents.



Figure 1 – Fruits of *Vismia cayennensis* (JACQ.) PERS.



Source: The authors

### 2.3 EXTRACTIONS WITH ORGANIC SOLVENTS

Extraction was performed in ascending order of polarity, using the following solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol. This methodology was adopted in order to extract the constituents present in the resin from the insides of the *V. cayennensis* fruits. After grinding the material, the vessel was left to rest for 48 hr at room temperature. This procedure was repeated 5 more times with solvent renewal. After filtration, the solvents were removed under reduced pressure with a rotary evaporator at approximately 40°C.

### 2.4 DPPH RADICAL SCAVENGING CAPACITY AND QUANTIFICATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS

The extracts were solubilized in P.A. methanol at 2.0 mg/mL and submitted to DPPH radical scavenging capacity analysis and determination of total phenols following microplate reader procedures with minor modifications (MOLYNEUX, 2004; VELIOGLU et al., 1998).

For the DPPH assay, 10 µL of the samples were added to 190 µL of the DPPH solution (60 µM) and incubated in the dark for 30 min. Subsequently, absorbance was read on a microplate reader at 515 nm (Epoch 2, Biotek). A standard Trolox curve was plotted from 100 to 1500 µM ( $y = -0.0004x + 0.7397$ ,  $R^2 = 0.997$ ) with results expressed in µM of Trolox equivalents.



As to the total phenols assay, the samples were added to a 1:1 reaction mixture of Folin Cicoalteu reagent and sodium bicarbonate (6%), kept in the dark for 90 min for further analysis on a microplate reader at 725 nm (Epoch 2, Biotek). A standard curve for gallic acid was plotted from 7.8 to 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0.0029x + 0.2062$ ,  $R^2 = 0.9932$ ) with results expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample.

## 2.5 FRACTIONATION OF EDVCFR

The dichloromethane fruit extract of *V. cayennensis* (EDVcFr) (25 g) was fractionated in Sephadex LH 20 using gradient mixtures of methanol and water in ascending order of elution, forty-five fractions were obtained.

Fractions 4 and 5 were pooled (1g) and subjected to silica gel column chromatography, using hexane (Hex)/ethyl acetate (EtOAc)/ethanol (EtOH) in ascending order of polarity, resulting in the isolation of the fraction EDVcFr 1 (vismin – 5 mg).

Fractions 26 and 27 were chromatographed under the same conditions as above described, obtaining 20 mg of a compound named EDVcFr 2 (1,3,8 trihydroxy-4,5,7-triisoprenyl-7-methyl-antrone-harunganol B).

Fraction 10, labeled as EDVcFr 3 (Friedelin - 10 mg) was subjected to crystallization with 1:1 Hex/AcOEt solvents. The resulting crystals were purified by PTLC (Preparative Thin Layer Chromatography), yielding a pure compound (6 mg) in the form of white crystals.

Fractions 11 to 21 (3.7 mg) were subjected to chromatography on a silica gel column eluted with 1:1 hexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  yielding 72 fractions, resulting in only 5 pooled fractions consistent with TLC. From Fraction 2 was isolated the constituent EDVcFr 4 (ferruginin).

All compounds had their molecular structures elucidated by use of unidimensional NMR techniques, mass spectrometry and compared to literature data.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 ANTIOXIDANT CAPACITY AND ISOLATED COMPOUNDS

Plant extracts are important sources of chemical compounds with high antioxidant activity (LIZCANO et al., 2010).

According to Sousa, Vieira e Lima (2011), the greater the value of the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), the greater the antioxidant capacity of the sample. The result of the antioxidant activity and the determination of total phenols (TF) (Table 1) demonstrated a greater concentration of phenolics in the extract EHVcFr, being that this, like this the extract EDVcFr, showed high antioxidant activity by the DPPH radical scavenging method. However, the other extracts also showed high values in  $\mu\text{M}$  of Trolox equivalents, indicating that the fruit extracts of *V. cayennensis* exhibit good antioxidant capacity, which can be explained by the presence of high concentrations of the phenolic in all extracts.

Table 1 – Antioxidant activity of extracts from *V. cayennensis* fruit.

SAMPLES	DPPH ( $\mu\text{M TE}$ )	FT (mg EAG/g)
EHVcFr	1540,9 $\pm$ 5,2	202,9 $\pm$ 0,5
EDVcFr	1167,5 $\pm$ 3,9	72,2 $\pm$ 0,5
EAVcFr	870,1 $\pm$ 5,2	81,7 $\pm$ 0,7
EMVcFr	790,9 $\pm$ 5,2	85,4 $\pm$ 0,3

E = Extract; Vc = *V. cayennensis*; Fr = Fruit; H = Hexane; D = Dichloromethane; A = Ethyl Acetate; M = Methanol). Source: The authors

The antioxidant activity results for all *V. cayennensis* extracts point to the antioxidant potential of this species. Given that EDVcFr exhibited one of the best results for antioxidant activity against DPPH radicals, this extract was selected for chromatography and isolation of its chemical constituents, resulting in the isolation of the triterpene friedelin and three prenylated anthranoids: 1,3,8 trihydroxy-4,5,7-triisoprenyl-7-methyl-antrone (harunganol B), vismin, and ferruginine A. This is the first account of isolation of harunganol B in the genus *Vismia*, therefore, this work contributes, significantly, with data on the chemical profile of the *V. cayennensis*.

This observed antioxidant activity can be attributed to the presence of some anthranoids in the crude extract (PEDROZA, 2019). The chemical investigation carried

out in this study enabled the identification of the prenylated anthranoids vismin, ferruginine A, and harunganol B. Another constituent presenting evidence of antioxidant capacity (REMLINGER, 2017), identified in this study is the triterpene fridelin.

In addition to the above compounds, the classes of xanthenes, flavonoids, anthraquinones, and quinones, commonly found in *Vismia* spp., are capable of stabilizing the free electron in DPPH radicals due to their phenolic structures. In studies carried out with the compounds 1,2,8-trihydroxyphantone, 1,4,8-trihydroxyphantone, laurenquinone A, xanthone V1, vismiaquinone B, and bivismiaquinone found in *V. rubescens* and *V. laurentii*, a high level of antioxidant activity was observed against DPPH radicals, indicating the antioxidant potential of these constituents (TALA, et al., 2011).

A more recent study has detected antioxidant capacity in ethanolic extracts from *V. guianensis* aerial parts and in the ethyl acetate fraction of this species against the radicals ABTS and DPPH (PINHEIRO et al., 1984). Antioxidant activity of the ethyl acetate extract from *V. guianensis* fruit has also been observed against the same radicals (ALVARREZ et al., 2008). In other studies, the antioxidant activity of the fruits of *V. guianensis* (SILVESTRE et al., 2012) e de *C. paralicola* (OLIVEIRA et al., 2012) was observed and the results were compatible with those described in this work. No work on the antioxidant activity of *V. cayeannensis* has been reported in the literature, therefore, these results significantly contribute to the antioxidant potential of the species.

The results found in these studies are associated to the level of concentration of phenolic compounds in the samples, which corroborates the potential of this species as a source of antioxidants. The antioxidant activity this compounds is mainly due to their chemical structures and reducing properties and acting in the neutralization or kidnapping of free radicals and metal chelation transition, acting both in the initiation stage as in the propagation of the oxidative process. The intermediaries formed by the action of phenolic antioxidants are relatively stable (SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

As can be seen in the compounds isolated in this work, the prenylated anthranoids present in their structure the ability to stabilize the DPPH free radical.



### 3.2 IDENTIFICATION OF ISOLATED COMPOUNDS

**EDVcFr 1** – Isolated as a yellow amorphous solid. Analysis of the spectrum of hydrogen from EDVcFr 1 allowed the following observations: a singlet to an aromatic methyl group at  $\delta$  2.43, the presence of 3 signals simple at  $\delta$  15.77, 11.93 and 10.03, their chemical shifts at low field seem to indicate the presence of phenolic hydroxyls, the simple signal at  $\delta$  11.93 is typical of hydroxyl aromatic chelated to carbonyl, and the presence of two dimethylallyl molecules by the doublets at  $\delta$  3.50 (1H, dd, J=5.1 and 8.2Hz) and  $\delta$  3.48 (1H, dd, J=4,9 e 8,5 Hz). The strong chemical shift of one of the hydroxyl groups ( $\delta$  15.77) along with the presence of an aromatic methyl group are characteristic for 8,9-dihydroxymethyl-antrone derivatives. This data in comparison with the literature data (Table 2), allowed to identify the anthranoid vismin (Figure 2A).

Table 2 –  $^1\text{H}$  NMR signals of Vismin

H	$^1\text{H}$ NMR signals
1	-----
2	5,35, <i>sl</i>
3	9,72, <i>sl</i>
4	-----
5	-----
6	7,01, <i>sl</i>
7	-----
8	6,71, <i>sl</i>
9	-----
10	7,19, <i>sl</i>
11	15,64, <i>sl</i>
12	-----
13	11,93
14	-----
15	3,2-2,6, <i>m</i>
15'	3,2-2,6, <i>m</i>
16	5,10, <i>tl</i>
16'	5,10, <i>tl</i>
17	-----
17'	-----
18	1,59, <i>sl</i>
18'	1,59, <i>sl</i>
19	1,59, <i>sl</i>
19'	1,59, <i>sl</i>
20	2,44, <i>sl</i>

Source: The authors

**Data HR-EIMS (-):** m/z 391.3 (calcd. 392.3 for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>); EIMS m/z (int. rel.): 391 (100), 339 (8), 322 (9), 311 (6), 283 (5), 283 (13), 281 (20), 269 (10), 255 (50), 253 (27), 241 (18), 227 (16), 212 (7), 151 (5).

**EDVcFr 2** - Isolated as a yellow amorphous solid. The NMR spectrum of <sup>1</sup>H reveals two simple signs at δ 12.59 and δ 13.23 referring to the hydroxyl groups forming a hydrogen bond with the carbonyl, two aromatic hydrogens at δ 6.75 (1H, s) and δ 2.3 (2H, s) ppm, a methyl group attached to the aromatic ring at δ 1.81 (3H, d, J = 4.8 Hz, long-distance coupling), it is additionally observed and a simple sign reduced by δ 6.76 referring to the enol hydrogen H-2, the appearance of a signal at δ 6.29 related to the CH<sub>2</sub> of the keto form. Chemical shifts, in higher field, of the chelated hydroxyl groups are characteristic of a 1,8- dihydroxyanthrone. The NMR spectrum of <sup>1</sup>H too shows characteristic resonances of three fragments of group 3,3-dimethylallyl; three triplets to the olefinic hydrogens at δ 4.89 (1H, t, J=6.6 Hz), δ 5.0 (1H, t, J=6.6 Hz) and δ 5.26 (1H, t, J= 7.2 Hz), a doublet at δ 3.50 (2H, d, J=7.07 Hz) and two doublets for the protons of two methylenes at δ 3.35 (Ha, Ha', dd, J = 6.3 and 14.52 Hz) and 3.38 (Hb, Hb', dd, J= 6.31 and 14.52 Hz) and five singlets for olefin methyl at δ 1.85, 1.78, 1.72, 1.70 and 1.54. The fragmentations recorded by mass spectrometry and the <sup>1</sup>H NMR signals (Table III), in comparison with the literature data allowed to identify a trihydroxylated 1,3,8 anthrone. Some prenylated anthranoids, among them the hydroxy compound anthrone B, have been isolated in the fruit extract of *V. japurensis* (REMLINGER, 2017). This molecule is similar to EDVcFr 2 differing only by the presence of three dimethyl groups in the NMR signals. Hence, the molecule was identified as 1,3,8-trihydroxy-4,5,7-triisoprenyl-7-methyl-anthrone (harunganol B) (Figure 2B).

Table 3 – <sup>1</sup>H NMR signals of Friedelin

H	<sup>1</sup> H NMR signals
1	1,95 <i>m</i>
2	2,39 <i>dd</i> (Heq; J = 13.7; 5.0; 2.0) 2,29 <i>m</i> (H ax)
3	-----
4	2,24 ( <i>q</i> ; J = 6,5)
5	-----
6	1,76 ( <i>dd</i> , Heq; J = 8.4; 2.7)
	1,27 ( <i>m</i> , Hax)
7	1,45 ( <i>m</i> )
8	1,37 ( <i>m</i> )
9	-----
10	1,55
11	1,38 (1H; <i>m</i> )
12	1,35 (1H; <i>m</i> )
13	2,3 <i>sl</i> (2H)
14	-----
15	1,27 ( <i>m</i> )
16	-----
17	-----
18	-----
19	1,37 (1H; <i>m</i> )
20	-----
21	1,51 ( <i>m</i> )
22	1,48 (1H; <i>m</i> )
23	0,88 <i>d</i> (6,5)
24	0,73 (3H, <i>sl</i> )
25	0,87 (3H, <i>sl</i> )
26	1,00 (3H, <i>sl</i> )
27	1,05 (3H, <i>sl</i> )
28	1,18 (3H, <i>sl</i> )
29	1,01 (3H, <i>sl</i> )
30	0,95 (3H, <i>sl</i> )

Source: The authors

This is the first time that harunganol B has been isolated from the species *V. cayennensis*, as well as the first record of this substance in the genus *Vismia*.

**Data HR-EIMS (-):** m/z 459.25 (calcd. 460.25 for C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>); EIMS m/z (int. rel.): 459 (20), 415 (51), 403 (100), 401 (53), 373 (73), 361 (12), 347 (10), 333 (7), 317 (29), 305 (8).

**EDVcFr 3** – This compound was isolated as white crystals, the analysis of the hydrogen spectrum showed Eight simple signs assigned to displacements at δ = 0.73, 0.87, 0.88, 0.95, 1.00, 1.01, 1.05 and 1.18 with 3H related integration, for each integrated signal. With seven methyl group signals attached to quaternary carbons and one to tertiary

hydrogen. Multiple signals in  $\delta$  1.30 – 2.36 characteristic regions of hydrogens alicyclics, with two doublets – doublets in  $\delta$  2.39 ( $J = 13.7, 5.0$  and  $2.0$  Hz) referring to H - 2 in the equatorial position. The value of  $J = 13.7$  corresponds to the geminal coupling between H-2ax and H-2eq and the values of  $J = 5.0$  and  $2.0$  Hz corresponding to the axial - equatorial vicinal coupling and equatorial - equatorial of the hydrogens of C - 1 and C - 2. These data (Table IV) are compatible with the triterpene friedelin (Figure 2C).

Table 4 –  $^1\text{H}$  NMR signals of 1,3,8-trihydroxy-4,5,7-triisoprenyl-7-methyl-antrone (harunganol B)

H	$^1\text{H}$ NMR signals
1	13,23
2	6,75 <i>sl</i> (1H); 6,29 <i>sl</i> (2H)
3	-----
4	-----
4 a	-----
5	-----
6	-----
7	-----
8	12,59
8 a	-----
9	-----
9 a	-----
10	2,3 <i>sl</i> (2H)
10 a	-----
11	3,36 <i>dd</i> (2H; 6,31 e 14,52)
11'	3,38 <i>dd</i> (2H; 6,31 e 14,52)
12	4,91 <i>tl</i> (1H; 6,6)
12'	5,0 <i>tl</i> (1H; 6,6)
13	-----
13'	-----
14	1,72 <i>sl</i> (3H)
14'	1,78 <i>sl</i> (3H)
15	1,85 <i>sl</i> (3H)
15'	1,85 <i>sl</i> (3H)
16	3,5 <i>d</i> (2H; 7,07)
17	-----
18	-----
19	1,70 <i>sl</i> (3H)
20	1,85 <i>sl</i> (3H)
21	1,81 <i>d</i> (3H; 18,01)

Source: The authors

**Data MS:** MS (IE, 70 eV),  $m/z$  (%): 426 [M]<sup>+</sup> (16), 273 (20), 205 (10) and 69 (100).



**EDVcFr 4** –  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Table V) was observed splitting two signals in low field ( $\delta$ 16.65 and  $\delta$ 16.02;  $\delta$ 9.90 and  $\delta$ 9.63) due to the chelation of hydroxyl groups, signal strength reduction in H-2 ( $\delta$ 5.79) and appearance of a simple signal at  $\delta$ 3.60 related to  $\text{CH}_2$  in the diketone form. The data obtained were compared with the literature for this substance (TALA et al., 2011) allowing to identify the existence of three tautomeric forms of a prenylated anthranoid known as ferruginine A.

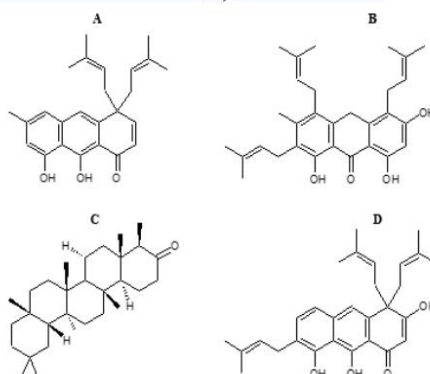
Table 5 –  $^1\text{H}$  NMR signals of ferruginine A.

H	$^1\text{H}$ NMR signals
2	6,71, <i>sl</i>
6	7,01, <i>sl</i>
10	7,19, <i>sl</i>
15	4,63, <i>tl</i>
16	4,73, <i>tl</i> , $J = 6,7\text{Hz}$
$\text{CH}_2$ (tautômero)	3,60, <i>sl</i>
4 $\text{CH}_3$	1,53, <i>sl</i>
$\text{CH}_3$	1,49, <i>sl</i>
$\text{CH}_3$	1,47, <i>sl</i>

Source: The authors

**Data HR-EIMS (-):**  $m/z$  459.4 (calcd. 460.25 for  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ); EIMS  $m/z$  (int. rel.): 459 (10), 391 (100), 339 (14), 325 (11), 311 (9), 297 (7), 283 (12), 279 (8), 255 (21), 227 (6). These data are compatible with the prenylated anthranoid ferruginine (Figure 2D).

Figure 2 – Structures of isolated compounds (A-Vismin; B-Harunganol B; C-Friedelin, D – Ferruginine A).



Source: The authors

#### 4 FINAL CONSIDERATIONS

By means of chemical investigations, it was possible to observe the presence of antioxidants in the EDVcFr extract, which corroborates the use of this species in folk medicine. The constituents identified in this study can contribute to the knowledge of the chemical profile of the family as this class of compounds is widely employed as chemotaxonomic markers in some species. This is the first account of isolation of harunganol B in the genus *Vismia*. Therefore, the species *V. cayennensis* can be another promising source of phytoantioxidants for future application in herbal medicine to fight free radicals and associated diseases.

However, the results obtained in this work indicate the continuity of the chemical research and the antioxidant potential of the species, considering that the other extracts were not fractionated and new constituents can be identified and evaluated against the DPPH radical. In addition, other assays to evaluate the antioxidant activity of the obtained extracts and its constituents are important, for example, 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid (ABTS), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and  $\beta$ -carotene/linoleic acid co-oxidation.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to PPGCTRA–UFAM (Postgraduate Program in Science and Technology for Amazon Resources at Federal University of Amazonas) for providing the necessary infrastructure and FAPEAM (Research Support Foundation of the State of Amazonas) for the financial support by means of following public notices: 003/2020 – PAINTER (process no. 062.00907/2020), 003/2020 – PAINTER (process no. 062.00830/2020), 001/2021 – MULHERES NA CIÊNCIA/FAPEAM (process no. 01.02.016301.01748/2021), 010/2021 - CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS (process no. 01.02.016301.03330/2021-23). We are also grateful to the INPA herbarium and CESIT for their support.

## REFERENCES

ADJANOHOOUN EJ, AKÉ-ASSI L. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Abidjan: éd. Centre National de Floristique, 1979, 358 p.

ALVAREZ E, ÍMENEZ GOJ, POSADA ACM, ROJANO BAG, GARCÍA GHJ. P. and DURANGO, D.L.R. Antioxidant activity and phenolic content of extracts from berries of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). *Vitae*. 15(1):165-72, 2008.

BOTTA B, DELLE MONACHE G, DELLE MONACHE F, BETTOLO GBM, MENICHINI F. Vismione H and prenylated xanthones from *vismia guineensis*. *Phytochemistry*. 25(5):1217-9, 1986. doi: [10.1016/S0031-9422\(00\)81583-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81583-6).

BUITRAGO A, ROJAS J, ROJAS L, VELASCO J, MORALES A, PEÑALOZA Y et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Táchira-Venezuela. *Nat Prod Commun*. 10(2):375-7, 2015. doi: [10.1177/1934578X1501000244](https://doi.org/10.1177/1934578X1501000244)

BUITRAGO D A, ROJAS-VERA J, PEÑALOZA Y. In vitro antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in los Andes, Venezuela. *Rev Biol Trop*. 64(4):1431-9, 2016.

CARMO, E. M. D. Critérios para distinção de frutos, sementes e plântulas de *Vismia cayennensis* (Jacq.) pers. e *Vismia japurensis* (Reich), árvores das florestas secundárias da região de Manaus. In: Congresso de Iniciação Científica do INPA-CONIC, Manaus, Vol. IV, 2015.

CHUN, SS, VATEM, DA, LIN, YT, SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*. 40, 809, 2005.

DA SILVA AT, DA SILVA VHN, LOPES BYK, GUESDON ADSN, MAIA IR, PJS et al. Chemical Composition and Biological Activities of Essencial Oils from Fresh *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy and *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. Barbosa. *Res Soc Dev*. 10(8): e37410817440-e37410817440, 2021.

DE MOURA FD, ROCHA DE A J, T. OHANA D, S. DE MEND M, LUIZ P. FE J, CLAUDIA F. A. Histological Study of the Leaf, Bark and Fruit of *Vismia cayennensis*. *Int J Bot*. 4(3):321-5, 2008. doi: [10.3923/ijb.2008.321.325](https://doi.org/10.3923/ijb.2008.321.325).

DI STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C. A; SOUZA-BRITO, A.R.M. MARRIOT, A. and SANTOS, C. M. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica: -2. Educ Rev e ampl. Editora UNESP, 2002.



DO CARMO M, MIRAGLIA M, MESQUITA AAL, DE JESUS M, VAREJÃO C, GO-TTLIEB OR et al. Anthraquinones from *Vismia* species. *Phytochemistry*. 20(8):2041-2, 1981. doi: [10.1016/0031-9422\(81\)84067-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)84067-8).

GONZALES J GONZALES, DELLE MONACHE F, DELLE MONACHE G, MARINI BETTOLO G. Chemistry of the genus *Vismia*. *Journal of Medicinal Plant Research*. 40(12):347-50, 1980. doi: [10.1055/s-2008-1074983](https://doi.org/10.1055/s-2008-1074983).

GROSSE, BK BALASUBRAMANIAN, V. and KAPADIA, G.J. Isolation and characterization of prenylated anthranoids from *Vismia guianensis*. In: 38th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. City, Iowa: University of Iowa. p. 26-30, 1997.

HUSSEIN AA, BOZZI B, CORREA M, CAPSON TL, KURSAR TA, COLEY PD et al. Bioactive constituents from three *Vismia* species. *J Nat Prod*. 66(6):858-60, 2003. doi: [10.1021/np020566w](https://doi.org/10.1021/np020566w), PMID [12828475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12828475/).

KERHARO JO. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Paris: Vigot Frères, 1974.  
LINS ACS, AGRA MF, CONCEIÇÃO DCO, PINTO FCT, CAMARA, C.A. and SILVA, T.M.S. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). *Revista Virtual de Química*. 8(1):157-68, 2016.

LIZCANO LJ, BAKKALI F, BEGOÑA RUIZ-LARREA M, IGNACIO RUIZ-SANZ J. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem*. 119(4):1566-70, 2010. doi: [10.1016/j.foodchem.2009.09.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.043).

LOPES ISS, MACHADO JER, SILVA IA, MARINHO CEMR, MGV, RANGEL JAF. Levantamento de plantas medicinais utilizadas na cidade de Itapetim, Pernambuco, Brasil. *Rev Biol Farmácia*. 7(1):115-21, 2012.

LORENZI H & SOUZA HM. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3 Odessa N, editor. Instituto Plantarum, 2001.

MARTINS MV, SHIMIZU GH, BITTRICH V. Flora da reserva Ducke, estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. *Hoehnea*. 45(3):361-71, 2018. doi: [10.1590/2236-8906-13/2018](https://doi.org/10.1590/2236-8906-13/2018).

MBWAMBO ZH, APERS S, MOSHI MJ, KAPINGU MC, VAN MIERT S, CLAEYS M et al. Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. *Planta Med*. ;70(8):706-10, 2004. doi: [10.1055/s-2004-827199](https://doi.org/10.1055/s-2004-827199), PMID [15368649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15368649/).

MILLIKEN W & BRUCE A. The use of medicinal plants by Yanomami indians of Brazil, Part II. *J Bot.*;51(3), 1999.



MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 26(2):211-9, 2004.

MONACHE F, D. Chemistry and biological activity of the secondary metabolites of *Vismieae*. *Rev latinoam Quim.* 16-1:5-15, 1985.

MOURÃO KSM, BELTRATI CM. Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae). *Braz J Biol.* 61(1):147-58, 2001. doi: [10.1590/s0034-71082001000100019](https://doi.org/10.1590/s0034-71082001000100019), PMID [11340473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11340473/).

NICOLETTI, M, MARINI-BETTOLO GB, DELLE MONACHE, F, DELLE MONACHE G. Keto-enolic tautomerism and spectral data of prenylated anthranoids from *Vismia* genus. *Tetrahedron*, v. 38, n. 24, 1982. p. 3679-3686.

NOUNGOUE DT, ANTHEAUME C, CHAABI M, LENTA NDJAKOU B, NGOUELA S, LOBSTEIN A et al. Anthraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*. *Phytochemistry.* 69(4):1024-8, 2008. doi: [10.1016/j.phytochem.2007.10.026](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.026), PMID [18067931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18067931/).

OLIVEIRA, R. F. et al. Biflavonoids from the unripe fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidant activity. *Natural Product Communications*, v. 7, n. 12, p. 1934578X1200701215, 2012.

PEDROZA L DA S. Estrutura Molecular e atividade biológica de metabólitos secundários de espécies de *Vismia* Vand (Hypericaceae) [tese] (Doutorado em Química), Universidade Federal do Amazonas, 2019.

PINHEIRO RM, MAC-QUHAE MM, BETTOLO GBM, MONACHE FD, G. M. and Delle MONACHE. Prenylated anthranoids from *Vismia* species. *Phytochemistry.* 23(8):1737-40, 1984. doi: [10.1016/S0031-9422\(00\)83481-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83481-0).

REMLINGER M. Estudo dos resíduos de aminoácidos de friedelina synthase de *Maytenus ilicifolia* envolvidos com sua especificidade biossintética (dissertação) Mestrado, Repositório Institucional UNESP, 2017.

REYS C, ESTRADA ME, APAN TR. AMEKRAS, B. and JANKOWSKI C. K. Cytotoxic effects of mamea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life*, New York. 75:1635-47, 2004.

SALAS F, CIANGHEROTTI C, SALAZAR-BOOKAMAN M. ROJAS, J. AND MORALES, A. Toxicidade aguda act analgésica extracto acuoso hojas *Vismia bacífera* L. Var. *Dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentacion. *Rev. Fac. Farm.* 49(1):5-9, 2008.

SEO EK, WANI MC, WALL ME, NAVARRO H, MUKHERJEE R, FARNSWORTH NR et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry*. 55(1):35-42, 2000. doi: [10.1016/s0031-9422\(00\)00208-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00208-9), PMID [11021642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11021642/).

SILVESTRE RG, DE MORAES MM, LINS ACR, LIMA-FILHO MT, CAMARA JV, SILVA TM. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. *Afr J Biotechnol*. 11(41):9888-93, 2012.

SOARES, SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 2002, p 15, 71.  
SOUSA, MSB, VIEIRA, LM, LIMA, A. Total Phenolics and in vitro Antioxidant Capacity of Tropical Fruit Pulp Wastes. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, n. 3, 2011, p. 202-210.

TALA MF, TAMOKOU JDD, TCHAKAM PD, Tane P. Kuate, J. R. and Wabo, H. K. Antioxidant xanthenes, anthraquinones and semisynthetic derivatives from *Vismia rubescens* and *Vismia laurentii*. *Pharmacologyonline*. v. 3, 2011, p. 1410-8.

TAMOKOU JDE D, TALA MF, WABO HK, KUIATE JR, TANE P. 2009. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal Ethnopharmacol*. 124(3):571-5, 2009. doi: [10.1016/j.jep.2009.04.062](https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.062), PMID [19464353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19464353/).

UEMOTO KAV, AMARAL MDCED, MARTINS MV, SHIMIZU GH, BITTRICH V. Caracterização da venação e superfície foliar como subsídio à taxonomia de *Vismia* Vand. (Hypericaceae). *Rev Pibic*. 26(26), 2019. doi: [10.20396/revpibic262018758](https://doi.org/10.20396/revpibic262018758).

VELIOGLU YS, MAZZA G, GAO L, OOMAH BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem*. 46(10):4113-7, 1998. doi: [10.1021/jf9801973](https://doi.org/10.1021/jf9801973).

VIZCAYA M, PÉREZ C, ROJAS J, ROJAS-FERMÍN L, PLAZA C. MORALES, A. and PEREZ, P. Composición química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de corteza de *Vismia baccifera* var. *Dealbata*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 34, 2014, p. 86-90.

ZHOU P, ZHANG XS, XU ZB, GAO SX, ZHENG QW, XU MZ et al. Staphylococcal enterotoxin B administration in pregnant rats alters the splenic lymphocyte response in adult offspring rats. *BMC Microbiol*. 17(1):1, 2017. doi: [10.1186/s12866-016-0921-2](https://doi.org/10.1186/s12866-016-0921-2). PMID [28049431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049431/).

## Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Fresh *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy and *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. Leaves

Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy e *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers.

Composición química y actividades biológicas de los aceites esenciales de hojas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy y *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers.

Received: 06/21/2021 | Reviewed: 06/29/2021 | Accept: 06/30/2021 | Published: 14/07/2021

### Antonia Tavares Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8441-2699>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [antoniatavares92@hotmail.com](mailto:antoniatavares92@hotmail.com)

### Vitor Hugo Neves da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1184-2241>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [hugor\\_ns@hotmail.com](mailto:hugor_ns@hotmail.com)

### BrunaYuka Koide da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5228-7520>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [brunaykoide@gmail.com](mailto:brunaykoide@gmail.com)

### Aniele da Silva Neves Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3830-9631>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [aniele.neves16@gmail.com](mailto:aniele.neves16@gmail.com)

### Isabel Reis Guesdon

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1372-250X>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [isabelbio@gmail.com](mailto:isabelbio@gmail.com)

### Paulo José Sousa Maia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3101-3712>  
Universidade Federal do Rio de Janeiro-Macacá, Brazil  
E-mail: [pmlpcb@gmail.com](mailto:pmlpcb@gmail.com)

### Maxwell Adriano Abegg

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0328-1122>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [maxabegg@gmail.com](mailto:maxabegg@gmail.com)

### Geone M. Corrêa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9458-8305>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [geonemaia@ufam.edu.br](mailto:geonemaia@ufam.edu.br)

### Dominique Fernandes de Moura do Carmo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8835-1619>  
Universidade Federal do Amazonas, Brazil  
E-mail: [dominiquefmc@ufam.edu.br](mailto:dominiquefmc@ufam.edu.br)

### Abstract

The *Vismia* Vand. genus encompasses many species indigenous to the Amazon rain forest where they are popularly known as “Lacre” bark and leaves are widely employed by locals to treat dermatophytoses. The aim of this study was to investigate the chemical composition of essential oils (EOs) extracted from the aerial parts of the species *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy and *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. and to assess their antimicrobial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 and *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 as well as the fungi *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 and *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932. The analysis of the chemical composition of the essential oil extracted from *V. guianensis* leaves (EOVg) indicated 46 components, of which three sesquiterpenes predominated, namely: (E)-caryophyllene (10.40%),  $\alpha$ -copaene (29.45%), and (E)-nerolidol (24.06%). As to the essential oil from *V. cayennensis* leaves (EOVc), 61 components were identified, of which two oxygenated sesquiterpenes stood out as the main components, namely, germacrene (25.42%) and curzerene (25.29%). EOvG exhibited Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 1.56  $\mu\text{g/mL}$  against the yeast *C. parapsilosis* whereas EOvC was active against the bacteria *E. coli* and *S. aureus* as well as the yeast *C. parapsilosis*. The results obtained in this study strongly recommend further research on the essential oils



in question with a view to isolating and identifying the components responsible for their observed antimicrobial activities.

**Keywords:** Essential oils; Chemical composition; Hypericaceae.

#### Resumo

O gênero *Vismia* Vand. apresenta espécies distribuídas na região amazônica, onde são conhecidas popularmente como “Lacre” e suas cascas e folhas são utilizadas no tratamento de dermatofitoses. Este trabalho objetivou realizar o estudo da composição química dos óleos essenciais das partes aéreas das espécies *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy e *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. e avaliar a atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 e *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 bem como aos fungos *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 e *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932. Sobre a composição química das amostras de óleo essencial (OE), foram identificados 46 constituintes no óleo essencial da espécie *V. guianensis* (OEVg), destes, três foram identificados como majoritários, os sesquiterpenos: *trans*-cariofileno (10,40%),  $\alpha$ -copaeno (29,45%) e o *trans*-nerolidol (24,06%). Na amostra de óleo essencial da espécie *V. cayennensis* (OEVc) foram identificados 61 constituintes, dos quais, destacaram-se dois sesquiterpenos oxigenados como constituintes majoritários, a germacrona (25,42%) e o curzereno (25,29%). O OEVg apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1,56  $\mu\text{g/mL}$  para cepas fúngicas da *C. parapsilosis* e o OEVc foi ativo para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e para a levedura *C. parapsilosis*. Os resultados obtidos sugerem o isolamento e identificação dos constituintes responsáveis pelas atividades observadas.

**Palavras-chave:** Óleo essencial; Composição química; Hypericaceae.

#### Resumen

El género *Vismia* Vand. tiene especies distribuidas en la Región Amazónica, donde se les conoce popularmente como “Lacre” y su corteza y hojas se utilizan en el tratamiento de la dermatofitosis. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la composición química de los aceites esenciales de las partes aéreas de las especies *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy y *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. y evaluar la actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 y *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 y los hongos *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 y *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932. Sobre la composición química de las muestras de Aceite Esencial (AE), se identificaron 46 constituyentes en el aceite esencial de la especie *V. guianensis* (AEVg), de los cuales tres fueron identificados como principales sesquiterpenos *trans*-cariofileno (10,40%),  $\alpha$ -copaeno (29,45%) y *trans*-nerolidol (24,06%). En la muestra de aceite esencial de la especie *V. cayennensis* (AEVc) se identificaron 61 constituyentes, de los cuales se destacaron dos sesquiterpenos oxigenados como constituyentes mayoritarios, germacrón (25,42%) y curzereno (25,29%). AEVg tuvo una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 1,56  $\mu\text{g/mL}$  contra cepas fúngicas de *C. parapsilosis* y AEVc fue activo contra bacterias *E. coli* y *S. aureus* y contra la levadura *C. parapsilosis*. Los resultados obtenidos sugieren el aislamiento e identificación de los constituyentes responsables de las actividades observadas.

**Palabras clave:** Aceite esencial; Composición química; Hypericaceae.

## 1. Introduction

Essential oils from plants have been widely used in medicine, agriculture, perfumery, and cosmetics (Paolini, et al., 2010; Thuy, et al., 2021; Maia, et al., 2019; Kr̄mal, et al., 2015; Razavi, et al., 2021; Saikia, et al., 2020; Stojanović-Radić, et al., 2020). Several research groups are currently conducting studies on the chemical composition and biological potential of essential oils extracted from numerous plants, such as *Vismia* Vand. spp. (Simões et al., 2007). *Vismia* is an extensive genus of the Hypericaceae family, consisting of small trees inhabiting the tropical and subtropical regions of Central and South America (Hussain et al., 2012).

Notwithstanding the extensiveness of this genus, the literature provides scientific studies on essential oils from three *Vismia* species alone. Rojas et al. (2011) studied essential oils obtained from *V. guianensis* (Aubl.) Choisy fruit, *V. baccifera* Planch. & Triana fruit, and *V. macrophylla* Kunth leaves and reported antimicrobial activity for *V. baccifera* var. *dealbata* (Kunth) Ewan against the microorganisms *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984, *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884, and *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887, with MIC values ranging from 9 to 37  $\mu\text{g/mL}$ . Another study by Rojas et al. (2010) on the essential oil (EO) extracted from *V. baccifera* fruit pointed to broad-spectrum bactericide activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900, and *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter

1886) Trevisan 1887. By means of CG-EM analysis, the researchers identified 27 chemical components in *V. baccifera* EO, chiefly *trans*-cadin-1,4-diene, *cis*-cadin-1,4-diene, and  $\beta$ - caryophyllene.

Additionally, Rojas et al. (2011) described the fungicide potential of *Vismia* essential oils, which supports the scientific community's interest in identifying the chemical components and assessing the pharmacological actions of this genus. In this vein, this study aimed at investigating the chemical profile and antimicrobial potential of essential oils extracted from *V. guianensis* and *V. cayennensis* (Jacq.) Pers. leaves against the microorganisms *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 and *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron e Talice 1932.

## 2. Materials and method

### 2.1 Collection of plant samples

Dry leaves from the aerial parts of the species under investigation were collected at several sites in Itacoatiara, Brazil: *Vismia cayennensis* (03°05'36.9"S, 058°27'44.7"W Gr longitude, and  $\pm 5$  m altitude) and *V. guianensis* (03°05'39.8"S, 058°27'43.8"W Gr longitude,  $\pm 4$  m altitude). Then, the samples were identified and deposited at the herbarium collection of the Universidade do Estado do Amazonas, at the Centro de Estudos Superiores de Itacoatiara–CESIT (Voucher number 0055) and at the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA (Voucher number 18448).

#### 2.1.1 Extraction of essential oils from *Vismia guianensis* and *V. cayennensis* leaves

The essential oils from *V. guianensis* and *V. cayennensis* leaves were obtained by hydrodistillation of fresh material in a modified Clevenger-type apparatus coupled to a round bottom flask with distilled water (5 L) for approximately 4 hours. Next, the EO samples were centrifuged (3500 rpm) for 10 minutes for water/oil separation, which was done with a graduated micropipette. Extractions were performed in triplicate, with 800 g of fresh leaves of both *Vismia* species in each flask. Then, the EO samples were stored in Eppendorf tubes, sealed, and kept at  $-4$  °C until analysis and testing. The samples of *V. guianensis* and *V. cayennensis* EOs were coded as EOvg and EOvc, respectively.

#### 2.1.2 Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS)

The obtained essential oils underwent analysis in a SHIMADZU gas chromatographer coupled to a SHIMADZU QP2010 mass spectrometer (GC-MS). For component chromatography, a 30 m  $\times$  0.25 mm DB-5MS column with 0.25  $\mu$ m inner film thickness was employed. The chemical components were identified by interpreting their respective mass spectra, calculating their Kovats Indexes (KIs), and matching them up to data found in the literature. The calculated KIs were then compared to those tabulated for isolated compounds by Adams (2007).

## 2.2 Biological assays

### 2.2.1 Antimicrobial assay

The antimicrobial activity test was carried out at the Microbiology Laboratory of the Exact Sciences and Technology Institute (ICET/UFAM), using the microplate dilution test to analyze the antibacterial and antifungal potential of EOvg and EOvc.

### 2.2.2 Microorganisms

The EO samples underwent antimicrobial susceptibility tests *in vitro* according to the protocol described in the literature (Vaz et al., 2009), using a panel with ATCC strains (American Type Culture Collection, USA). The antibacterial

activity of the essential oils was assessed against the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), Gram-negative bacterium *Escherichia coli* (ATCC 25922), and fungi *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

### 2.2.3 Preparation and standardization of microbial inoculums

The bacterial and fungal strains were grown in Mueller Hinton broth for 24 h at 37 °C and standardized by adding sterile PBS (pH 7.2) until obtaining turbidity equal to that of the suspension in the 0.5 tube on the McFarland scale (approximately  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL). Then, a spectrophotometric reading was performed at 620 nm to confirm the microorganism concentration. Subsequently, small amounts of bacterial and fungal strains were removed, with the aid of a sterile loop, and added to 5 mL of sterile LB broth and 5 mL of YPD broth for the bacteria and fungi in question, respectively. The microorganism concentration was confirmed by spectrophotometer reading.

### 2.2.4. Preparation of EO samples

Firstly, a 10% dimethyl-sulfoxide (DMSO) solution was prepared by diluting DMSO (100 µL) in sterile distilled water (900 µL). Then the EO<sub>Vg</sub> and EO<sub>Vc</sub> samples were diluted in 10% DMSO by solubilizing the samples (10 mg) in the previously prepared solvent (100 µL). Through this procedure, stock solutions of each sample were prepared to a concentration of 100 µg/mL. The assays were performed on five 96-well ELISA microplates, which were divided as follows:

1. The wells used validating the method and measurement of results were identified as “positive and negative controls”: the positive control comprised the culture medium, bacterial or fungal suspension and the reference antimicrobial standard whereas the negative control consisted of the culture medium and 10% DMSO;
2. Wells identified as “blank” contained the culture medium and the essential oil of each sample in order to eliminate the turbidity caused by its color when evaluating the results; and
3. Wells identified as “assay” contained the culture medium, a mixture of essential oil with DMSO, and the bacterial or fungal suspension.

## 2.3 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

### 2.3.1 Microdilution for bacteria

MIC was performed in triplicate at 1:2 concentration. The bacteria under investigation were *E. coli* and *S. aureus*. Chloramphenicol and 10% DMSO were employed as reference standard (positive control) and negative control, respectively. The 96 microplate wells were filled with the LB broth (100 µL). Then, in the first well, 100 µL of the EO stock solution was added prepared initially in concentration at 100 µg/mL. After a serial dilution was conducted in the seven consecutive wells, removing 100 µL from the highest concentration well, resulting in a solution of up to 0,39 µg/mL. The assay was performed in triplicate for each concentration. Likewise, the LB broth (50 µL) plus Chloramphenicol (50 µL) were added to the positive control whereas the LB broth (50 µL) plus 10% DMSO (50 µL) were added to the negative control, in triplicate. Finally, the microorganism suspensions (10 µL) were added to every well and incubated for 24 hours at 37 °C.

### 2.3.2 Microdilution for fungi

MIC was performed in triplicate for *C. albicans* and *C. parapsilosis* with methanol (positive control) and 10% DMSO (negative control) as reference standard. The microplate wells were filled with the YPD broth (100 µL). Then, in the first well, 100 µL of the EO stock solution was added prepared initially in concentration at 100 µg/mL. After a serial dilution was conducted in the seven consecutive wells, removing 100 µL from the highest concentration well, resulting in a solution of up to



0,39 µg/mL. The YPD broth (50 µL) plus methanol (50 µL) were added to the positive control whereas the YPD broth (50 µL) plus 10% DMSO (50 µL) were added to the negative control, in triplicate. Then, the microorganism suspensions (10 µL) were added to the wells and incubated for 48 h at 37 °C. After incubation, a visual reading and a reading with Resazurin dye (100 µg/mL) of the microbial growth were performed.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Yields

Table 1 shows the variation in yields of EOvg and EOvc. EOvg yield was higher in September/2019 (0.04%), a period of intense drought, and lower yield in November/2019 (0.03%), the rainy season in the region. EOvc exhibited a yield of 0.54% in the dry season, a satisfactory value as compared to that obtained for EOvg during the same period. The difference between the yield values may be attributed to several factors, e.g., temperature, rainfall, place and time of sample collection, which can have critical effects on both the quantity and quality of essential oils.

**Table 1.** Yields of essential oils extracted from fresh *Vismia cayennensis* and *V. guianensis* leaves.

Plant sample	Year/month	Temperature	Sample code	Plant mass (g)	Yield
<i>V. guianensis</i>	September 2019	32 °C	EOvg	800 g	0.04%
	November 2019	30 °C		800 g	0.03%
<i>V. cayennensis</i>	September 2019	35 °C	EOvc	800 g	0.54%
	November 2019	30 °C		800 g	0.24%

\* EOvg: Essential oil from *Vismia guianensis*; EOvc: Essential oil from *V. cayennensis*. Source: Authors.

The lower yields of the essential oils during the rainy season may be due to lixiviation, i.e., continuous rain may result in loss of hydro-soluble substances in leaves and roots. This may apply to plants that produce alkaloids, glycosides, and even volatile oils (Evans, 1996; Waltermann & Mole 1994).

#### 3.1.1 Chemical composition of essential oils

The analysis of the chemical composition of OEvg revealed 46 components, of which sesquiterpenes were the most common ones (63.91%): (E)-caryophyllene (10.40%),  $\alpha$ -copaene (29.45%), and (E)-nerolidol (24.06%). OEvc presented 61 chemical components, in which a high proportion (50.71%) of oxygenated sesquiterpenes was found: germacrone (25.42%) and curzerene (25.29%). The chemical profile of both essential oils showed a high percentage of sesquiterpenes, mostly hydrocarbon sesquiterpenes. For example, *V. guianensis* has  $\alpha$ -humulene (2.84%),  $\beta$ -selinene (0.79%),  $\alpha$ -guaiane (0.16%), cyperene (0.20%),  $\alpha$ -selinene (1.14%),  $\alpha$ -muurolene (0.23%), and  $\delta$ -cadinene (2.27%) as well as two oxygenated sesquiterpenes, namely, caryophyllene oxide (0.88%) and viridiflorol (0.41%). In addition to this class of metabolites, hydrocarbon monoterpenes, such as  $\alpha$ -pinene (0.09%) and  $\beta$ -pinene (0.08%), and other components were identified, albeit in lesser quantities (Table 2).

**Table 2.** Substances found in *Vismia guianensis* EO.

Substance	Class	Area %	RT	KI <sub>cal</sub>	KI <sub>tab</sub>
<i>α-pinene</i>	HM	0.09	4.971	932	932
<i>β-pinene</i>	HM	0.08	6.091	977	974
<i>α-copaene</i>	HS	29.45	21.361	1370	1374
<i>Cyperene</i>	HS	0.20	22.461	1397	1398
<i>(E)-caryophyllene</i>	HS	10.40	23.154	1414	1417
<i>α-guaiene</i>	HS	0.16	23.830	1430	1437
<i>α-humulene</i>	HS	2.84	24.621	1450	1452
<i>β-panasinsene</i>	HS	0.26	25.520	1472	1381
<i>β-selinene</i>	HS	0.79	25.980	1483	1489
<i>α-selinene</i>	HS	1.14	26.267	1490	1498
<i>α-murolene</i>	HS	0.23	26.425	1494	1500
<i>β-bisabolene</i>	HS	0.63	26.836	1504	1505
<i>δ-cadinene</i>	HS	2.27	27.185	1513	1522
<i>Sesquisabinene</i>	HS	1.59	27.447	1519	1457
<i>(E)-nerolidol</i>	OS	24.06	28.989	1557	1561
<i>Caryophyllene alcohol</i>	OS	0.29	29.385	1567	1570
<i>Caryophyllene oxide</i>	OS	0.88	29.616	1572	1482
<i>Guaiol</i>	OS	0.74	30.240	1588	1600
<i>Viridiflorol</i>	OS	1.04	30.493	1594	1582
<i>Copaborneol</i>	OM	1.41	30.689	1598	NI
<i>Agarospinol</i>	OS	2.80	31.289	1613	1646
<i>Cadina-1(6),4-diene &lt;trans&gt;</i>	OS	0.94	31.957	1630	1461
<i>Cadin-4-eno-7-ol &lt;cis&gt;</i>	OS	0.89	32.035	1632	1635
<i>α-murolol</i>	OS	0.62	32.135	1634	1644
<i>Intermedeol</i>	OM	2.04	32.531	1644	1665
<i>α-bisabolol</i>	OS	1.39	33.615	1670	1385
<b>Total</b>		<b>87.23</b>			

RT: Retention Time; KI<sub>cal</sub>: Calculated Kovats Index; KI<sub>tab</sub>: Tabulated Kovats Index; NI: Not Identified; HS: Hydrocarbon Sesquiterpene; OS: Oxygenated Sesquiterpene; OM: Oxygenated Monoterpene; HM: Hydrocarbon Monoterpene. Source: Adams (2017).

The analysis of the EOvc indicated the presence of hydrocarbon monoterpenes, such as *α-pinene* (0.08%), *sabinene* (0.04%), *myrcene* (0.24%), *limonene* (0.10%), and *terpinolene* (0.02%). Higher percentages were found for hydrocarbon sesquiterpenes, e.g., as *(E)-caryophyllene* (2.15%), and *β-selinene* (0.42%), as well as oxygenated sesquiterpenes, e.g., *viridiflorol* (0.45%), *spatulenol* (0.86%), and *caryophyllene oxide* (0.97%). Likewise, small percentages of other components were identified, as shown in Table 3.



**Table 3.** Substances found in *Vismia cayennensis* EO.

Substance	Class	Area %	RT	KI <sub>cal</sub>	KI <sub>tab</sub>
<i>α-pinene</i>	HM	0.08	4.93	931	932
<i>Sabinene</i>	HM	0.04	6.067	976	969
<i>Myrcene</i>	HM	0.24	6.330	987	988
<i>Limonene</i>	HM	0.10	7.581	1038	1024
<i>β-fundandrene</i>	HM	0.05	7.642	1040	1025
<i>(Z)-β-ocimene</i>	HM	0.21	8.124	1060	1044
<i>terpinolene</i>	OM	0.02	9.516	1116	1086
<i>δ-elemene</i>	HS	0.33	19.698	1329	1335
<i>(E)-caryophyllene</i>	HS	2.15	23.159	1414	1417
<i>α-humulene</i>	HS	0.22	24.626	1450	1452
<i>germacrene-D</i>	HS	0.76	25.670	1476	1484
<i>β-selinene</i>	HS	0.42	25.980	1483	1489
<i>curzerene</i>	OS	25.29	26.290	1491	1499
<i>muurolene</i>	HS	0.20	26.434	1494	1500
<i>γ-cadienene</i>	OS	0.42	27.192	1513	1513
<i>spathulenol</i>	OS	0.85	29.455	1568	1577
<i>germacrone</i>	OS	25.42	32.742	1644	1693
<i>caryophyllene oxide</i>	OS	0.97	29.622	1572	1482
<i>viridiflorol</i>	OS	2.44	29.799	1577	1592
<i>cubeban-11-ol</i>	-	0.96	30.221	1587	1595
<i>Rosifolol</i>	OS	0.45	31.259	1612	1600
<i>δ-cadinene</i>	HS	0.54	31.968	1630	1522
<i>cadin-4-eno-7-ol &lt;cis&gt;</i>	HS	0.98	32.049	1632	1635
<i>α-muurolol</i>	HS	0.30	32.147	1634	1500
<i>hexadienoic acid</i>	-	0.88	32.365	1631	NI
<i>intermedeol</i>	OM	5.28	32.560	1642	1665
<i>naphthalenol</i>	-	0.40	32.930	1649	NI
<i>1,2,4,5 tetramethyl-[2,4] heptane</i>	-	0.48	33.406	1666	NI
<i>(E)-γ-bisabolene</i>	HS	0.73	42.589	1890	1529
<b>Total</b>		<b>71.21</b>			

RT: Retention Time; KI<sub>cal</sub>: Calculated Kovats Index; KI<sub>tab</sub>: Tabulated Kovats Index; NI: Not Identified; HS: Hydrocarbon Sesquiterpene; OS: Oxygenated Sesquiterpene; OM: Oxygenated Monoterpene; HM: Hydrocarbon Monoterpene. Source: Adams (2017).

Sesquiterpenes preponderate in essential oils from most *Vismia* spp. Rojas et al. (2011) describe three sesquiterpenes as the main components in a sample of *V. baccifera* EO, i.e., cadina-1,4-diene <trans> (36.6%), cadina-1,4-diene <cis> (18.8%), and β-caryophyllene (11.9%). They also identified β-caryophyllene (20.1%), germacrone D (11.6%), and β-elemene (7.0%) in a sample of essential oil extracted from *V. macrophylla* leaves. Monoterpenes and sesquiterpenes have been depicted as biologically active in the literature. Lima et al. (2005), investigating the action of the monoterpenes α-pinene and β-pinene, found satisfactory activity against *C. albicans*, *C. tropicalis* (Castell.) Berkhout, *C. parapsiolisis*, *C. stellatoidea* (C.P.

Jones & D.S. Martin) Langeron & Guerra, *C. krusei* (Castell.) Berkhout, and *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. In a previous study carried out by Peñuelas et al. (2005), monoterpenes were shown to have thermotolerance, photoprotection, and antioxidant properties due their ability to capture oxygen radicals produced during photosynthesis. On the other hand, sesquiterpenes have been highlighted in several essential oils due to their strong odor and anti-inflammatory and antifungal power (Zheng et al., 1992).

### 3.2 Biological activity

#### 3.2.1 Microdilution assay for fungi and bacteria

The literature indicates remarkable antimicrobial activity in essential oils from *Vismia* spp. According to Pérez and colleagues (2011) and Montanari and colleagues (2011), essential oils extracted from *V. macrophylla* fruit are active against Gram-positive (*S. aureus* and *E. fecalis*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria, with MIC values ranging from 150 µL/mL to 740 µL/mL. Those studies also observed antimicrobial activity in the essential oil extracted from leaves of the same species, effective against the Gram-positive bacteria *S. aureus* (100 µL/mL) and *E. faecalis* (500 µL/mL) as well as against the fungi *C. albicans* and *C. krusei* (600 µL/mL each). Screening results for antifungal and antibacterial activities are depicted in table 4.

**Table 4.** Antibacterial and antifungal activities (MIC values in µg/mL) of OEVg and OEVc.

Species	Essential oils	Bacterial strains		Fungal strains	
		SA	EC	CA	CP
<i>V. guianensis</i>	EOVg	>1000	>1000	>1000	1.56
<i>V. cayemensis</i>	EOVc	25	50	>1000	50

\*EOVg: Essential oil from *Vismia guianensis*; EOVC: Essential oil from *V. cayemensis*; SA: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); EC: *Escherichia coli* (ATCC 25922); CA: *Candida albicans* (ATCC 10231); CP: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Source: Authors.

OEVg inhibited fungal growth of *C. parapsilosis* strains at 1.56 µg/mL concentration. As stated by Holetz et al. (2002), samples with MIC values below 100 µg/mL are classified as very active, i.e., they strongly inhibit microbial growth. MIC values between 100 and 500 µg/mL denote satisfactory antimicrobial activity. Values between 500 and 1000 µg/mL indicate moderate activity whereas those above 1000 µg/mL imply poor inhibitory activity. In this study, OEVg exhibited strong antimicrobial activity against the strains under investigation.

Silvestre et al. (2012), investigating the essential oil extracted from *V. guianensis* fruit, reported antimicrobial activity against *S. lentus* (Kloos et al. 1976) Schleifer et al. 1983 (MIC equal to 78 µg/mL). Their research also identified β-caryophyllene (25.8%), α-copaene (13.1%), and δ-cadinene (11.6%) as the main components.

The main components of OEVg were (E)-caryophyllene sesquiterpenes (10.40%), α-copaene (29.45%), and (E)-nerolidol (24.06%). According to previous research, sesquiterpenes function as antimicrobial agents (CITÓ et al., 2003). The mechanism is still unclear, but it has been speculated that the lipophilic compounds found in this essential oil bind to and rupture the membrane of some microorganisms (COWAN, 1999). Reinsvold et al. (2011) showed that (E)-caryophyllene acts against microorganisms and, thus, can be used as antibiotic. This compound can also function biochemically as an anesthetic, anti-inflammatory, and spasmolytic drug. Other authors have reported antimicrobial activity of (E)-caryophyllene in kidney cell culture (RC-37), supporting its use as a prospective antimicrobial agent (Astani, 2009; Reichling & Schmitzler 2009).

Another study by Gelinski et al. (2007) indicates that (E)-nerolidol acts as a limited-spectrum antibiotic as it is not effective against some bacteria such as *Salmonella* Lignieres 1900 sp., *E. coli*, and *Proteus* Hauser 1885 sp. This finding

corroborates the results obtained in this study, i.e., the inactivity of OEVg against the bacteria *E. coli* and *S. aureus* as well as against the yeast *C. albicans*, probably due to this essential oil having this sesquiterpene as one of its main components.

The sesquiterpene  $\alpha$ -copaene is one of the main components of copaiba oil (*Copaifera* L. sp.). Studies have already shown that this oil can inhibit the growth of bacteria (Bloese, 2003; Biavatti et al., 2006; Veiga & Pinto, 2002) and fungi (Craveiro et al., 1981; Wang, 2000; Souza et al., 2005). The microbial inhibitory capability of this oil is attributed to  $\alpha$ -copaene.

OEVc exhibited strong inhibition against the bacteria *E. coli* and *S. aureus* at concentrations of 50  $\mu\text{g/mL}$  and 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and against the yeast *C. parapsilosis* at 50  $\mu\text{g/mL}$  concentration. The main components identified in this essential oil are the oxygenated sesquiterpenes curzerene (25.29%) and germacrone (25.42%). Zhang and colleagues (2017) found curzerene to be one of the main components of the essential oil extracted from *Curcuma phaeocaulis* Valetton and attributed its observed antifungal activity ( $\text{IC}_{50}$ , 153.33-580.09  $\mu\text{g/ml}$ ) and inhibition of bacterial growth ( $\text{IC}_{50}$ , 485.00-778.33  $\mu\text{g/ml}$ ) to this sesquiterpene.

Another research conducted by Ogunwande et al. (2005) identified curzerene (19.7%) and germacrone (27.5%) as the main components of essential oils extracted from fruit and leaves of *Curcuma phaeocaulis*, respectively. The same study reports strong antibacterial activity for the essential oil extracted from *Eugenia uniflora* L. fruit and leaves against *S. aureus* and *Bacillus cereus*, respectively, with MIC equal to 39  $\mu\text{g/mL}$ . In addition to treating cancer and hepatitis, other studies indicate that germacrone can be employed as an antimicrobial agent (Wang et al., 2000).

#### 4. Conclusion

The findings of this study are relevant in that they show the antimicrobial potential of EOvg and EOvc against some microorganisms, namely, *C. parapsilosis* (EOvg and EOvc), *E. coli* (EOvc), and *S. aureus* (EOvc). This antimicrobial action can be explained by the presence, in large quantities, of some components in the plant species under investigation. The prevailing sesquiterpenes in EOvg — i.e., (E)-caryophyllene (10.40%),  $\alpha$ -copaene (29.45%), and (E)-nerolidol (24.06%) — as well as the main components found in OEVc — i.e., germacrone (25.42%) and curzerene (25.29%) — have demonstrated antimicrobial action. With the aim of addressing the paucity of information about essential oils from *V. guianensis* and *V. cayennensis*, this study has contributed their chemical profiles, indicated their antimicrobial potential, and, thus, provided a basis for future research with a view to isolating and characterizing the compounds responsible for the biological activities of OEvg and EOvc.

#### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA – UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPeAM (process n°. 001/2021 - Mulheres na Ciência). We are also grateful to the Herbarium from INPA and CESIT for the kindly support, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico – CNPq.

#### References

- Adams R.P. (2007). *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. EUA: Allured Publishing Corporation, p. 804.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 4168-4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>.



- Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler P. (2009). Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 1-7. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep187>.
- Bellitti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6932-6938. <https://doi.org/10.1021/jf049444v>.
- Biavatti, M. W., Dossin, D., Deschamps, F. C., & Lima, M. D. P. (2006). Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (2), 230-235. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200017>.
- Bloise, M. I. (2003). Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. *Cosmetics & Toiletries* 15(5): 46-49.
- Buitrago, A., Rojas, J., Rojas, L., Velasco, J., Morales, A., Peñaloza, Y., & Díaz, C. (2015). Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Vismia macrophylla* Leaves and Fruits Collected in Táchira-Venezuela. *Natural Product Communications*, 10(2), 375-382. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1501000244>.
- Cardoso, P. R. (2011). *Estruturas secretoras em plantas*. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo.
- Citó, A. M. G. L., Souza, A. A., Lopes, J. A. D., Chaves, M. H., Costa, F. B., Sousa, S. A. A., & Amaral, M. P. M. (2003). Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burceraceae): Composição química do óleo essencial e avaliação citotóxica frente à *Artemia salina* Leach. *Anais da Associação Brasileira de Química*, 52(2), 74-76.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Craveiro, A. A., Fernandes, A. G., Andrade, C. H. S., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., & Machado, M. I. L. (1981). *Óleos essenciais de plantas do nordeste*. Fortaleza: Editora UFC. 210p.
- Evans, W. C. (1996). *Trease and Evans' Pharmacognosy*, (14a ed.), WB Saunders Company: cap. 7.
- Gelinski, J. M. L. N., Dalla Rosa, J. C., Paravisi, E. D. F. A., Baratto, C. M. (2007). Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lizozima. *Evidência*, 7(2), 131-144.
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, 30(2), 374-381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.
- Hidayat Hussain, J. H., Al-Harrasi, A., Saleem, M., Green, I. R., Ree, T. V., & Ghulam, A. (2012) Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology*, 50, 1448-1462. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.680972>
- Křtůmal, K., Kubátková, N., Večeřa, Z., & Mikuška, P. (2015). Antimicrobial properties and chemical composition of liquid and gaseous phases of essential oils. *Chemical Papers*, 69, 1084-1092. <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0118>.
- Lima, I. O., Oliveira, R. D. A. G., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., Farias, N. P., & Navarro, D. D. F. (2005). Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2), 199-203. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322005000200007>
- Madigan, M., & Martinko, J. (2004). The Bacteria. In: *Brock- Biology of Microorganisms*. *Prantice Hall*, 718-814.
- Maia, P. J. S., Cruz, J. F., Augusto, F. A. de F., Santos, S. de F. F., & Souza, E. A. (2019). Photophysical properties of a perylene derivative for use as catalyst in ethanol electrooxidation. *Research on Chemical Intermediates*, 45, 5451-5472. <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03911-3>
- Marinho, L. C., Ely, C. V., & Amorim, A. M. (2017). Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Hypericaceae. *Rodriguésia*, 68, 979-986. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768333>
- Martins, M. V., Shumizu, G. H., & Bittrich, V. (2018). Flora da Reserva Ducke, Estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. *Hoehnea*, 45(3), 361-371. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-13/2018>
- Montanari, R. M., Barbosa, L. C., Demuner, A. J., Silva, C. J., Carvalho, L. S., & Andrade, N. J. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. *Química Nova*, 34(9), 1550-1555. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900013>
- Ogunwande, I. A., Olawore, N. O., Ekundayo, O., Walker, T. M., Schmidt, J. M., & Setzer, W. N. (2005). Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *International journal of Aromatherapy*, 15(3), 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2005.07.004>.
- Paolini, J., Ouariachi, E. M. E., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Desjobert, J. M., Costa, J., & Muselli, A. (2010). Chemical variability of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from East Morocco. *Chemical Papers*, 64: 550-556. <https://doi.org/10.2478/s11696-010-0051-5>
- Peñuelas, J., & Munné-Bosch, S. (2005). Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in plant science*, 10(4), 166-169. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.02.005>
- Pérez-López, A., Cirio, A. T., Rivas-Galindo, V. M., Aranda, R. S., & de Torres, N. W. (2011). Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the essential oil and  $\delta$ -cadinene isolated from *Schinus molle* fruit. *Journal of Essential Oil Research*, 23(5): 25-28. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700477>

- Reinsvold, R. E., Jinkerson, R. E., Radakovits, R., Posewitz, M. C., & Basu, C. (2011). The production of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium *Synechocystis*. *Journal of plant physiology*, USA, 168(8), 848-852. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.006>
- Razavi, F., & Khajehsharif H (2021) A colorimetric paper-based sensor with nanoporous SBA-15 for simultaneous determination of histidine and cysteine in urine samples. *Chemical Papers*. 75: 3401–3410 <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01548-4>
- Rojas, J., Buitrago, A., Rojas, L., & Morales, A. (2011). Essential oil composition of *Vismia macrophylla* leaves (Guttiferae). *Natural product communications*, 6(1), 85-86. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1100600120>
- Saikia, S., Tamuli, K. J., Narzary, B., Banik, D., & Bordoloi, M. (2020) Chemical characterization, antimicrobial activity, and cytotoxic activity of *Mikania micrantha* Kunth flower essential oil from North East India. *Chemical Papers*. 74, 2515–2528. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01077-6>
- Silveira, J. C., Busato, N., Costa, A., & Junior, E. C. (2012). Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. *Enciclopédia Biosfera*, 8 (15), 2038-2052.
- Silvestre, R. G., de Moraes, M. M., Lins, A. C., Ralph, M. T., Lima-Filho, J. V., Camara, C. A., & Silva, T. M. (2012). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. *African Journal of Biotechnology*, 11(41), 9888-9893. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3834>
- Simões, E. P., Schenkel, G., Gosmann, J. C. P., Mello, L. A. M., & Petrovick, P. R. (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed.- Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 467-495.
- Souza, E. L. D., Lima, E. D. O., Freire, K. R. D. L., & Sousa, C. P. D. (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 48(2), 245-250. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000200011>
- Stojanović-Radić, Z., Čomić, L., Radulović, N., Dekić, M., Randelović, V., & Stefanović, O. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Erodium* species: *E. cicutarium* L., *E. cicutarium* L., and *E. absinthoides* Willd. (Geraniaceae). *Chemical Papers*. 64, 368–377. <https://doi.org/10.2478/s11696-010-0014-x>
- Thuy, B. T. P., Hieu, L. T., My, T. T. A., Hai, N. T. T., Loan, H. T. P., Thuy, N. T. T., Triet, N. T., Anh, T. T. V., Dieu, N. T. X., Quy, P. T., Trung, N. V., Quang, D. T., Huynh, L. K., & Nhung, N. T. A. (2021). Screening for *Streptococcus pyogenes* antibacterial and *Candida albicans* antifungal bioactivities of organic compounds in natural essential oils of *Piper betle* L., *Cleistocalyx operculatus* L. and *Ageratum conyzoides* L. *Chemical Papers*. 75, 1507–1519. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01404-x>
- Vaz, A. B., Mota, R. C., Bomfim, M. R. Q., Vieira, M. L., Zani, C. L., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2009). Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian journal of microbiology*, 55(12), 1381-1391. <https://doi.org/10.1139/W09-101>
- Veiga Junior, V. F., & Pinto, A. C. (2002). O gênero *copaifera* L. *Química nova*, 25(2):273-286. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>
- Zhang, L., Yang, Z., Wei, J., Su, P., Pan, W., Zheng, X., & Du, Z. (2017) Essential oil composition and bioactivity variation in wild-growing populations of *Curcuma phaeocaulis* Valetton collected from China. *Industrial Crops and Products*, 103,274-282. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.019>
- Zheng, G. Q., Kenney, P. M., & Lam, L. K. (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of natural products*, 55(7),999-1003. <https://doi.org/10.1021/np50085a029>
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, cap. 3.
- Wang, H. K. (2000). The therapeutic potential of flavonoids. *Expert opinion on investigational drugs*, 9(9), 2103-2119. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.9.2103>



## CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers.

Aniele da Silva Neves Lopes<sup>1</sup>, Woslon Magalhães Paes<sup>1</sup>, Jaqueline de Araújo Bezerra<sup>2</sup>, Paulo José de Sousa Maia<sup>3</sup>, Dominique Fernandes de Moura do Carmo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – Universidade Federal do Amazonas Rua Nossa Senhora do Rosário, 3683 – Tiradentes – Itacoatiara/AM

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas- Av. Sete de Setembro, 1975 - Centro, Manaus/AM

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro-Macaé Av. Aluizio da Silva Gomes, 50 - Novo Cavaleiros, Macaé/RJ

*aniele.neves16@gmail.com, woslon12@gmail.com, jaqueline.araujo@ifam.edu.br, pmlpcb@gmail.com, dominiquefmc@ufam.edu.br*

### Resumo:

A atividade antioxidante, avaliada pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), e o teor em compostos fenólicos totais (mg EAG/g) de extratos brutos dos frutos da espécie *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers., foram quantificadas neste trabalho. Apesar de todos os extratos terem apresentado expressiva atividade antioxidante frente ao radical avaliado, os extratos hexânico (EHVcFr) e diclorometano (EDVcFr) foram os mais ativos com valores de  $1540,9 \pm 5,2$  e  $1167,5 \pm 3,9$   $\mu\text{M ET}$ , respectivamente, porém o extrato EHVcFr quem apresentou o maior teor de fenólicos totais dentre os extratos ensaiados. Assim, considerando o expressivo resultado do extrato de média polaridade, o extrato EDVcFr foi submetido a procedimentos cromatográficos o que resultou no isolamento do triterpeno friedelina e dos antranóides prenilados 1,3,8 triidroxi-4,5,7-triisoprenil-7-metil-antrone (harunganol B) e vismina, cujas estruturas foram elucidadas por análise espectroscópica, incluindo RMN (1D) e comparação com os dados da literatura.

**Palavras-Chave:** Antranóides, Atividade antioxidante, *Vismia*

### 1. INTRODUÇÃO

Plantas da espécie do gênero *Vismia*, família Clusiaceae, são utilizadas na medicina popular para tratar uma variedade de doenças. São aplicadas, por exemplo contra a malária na África Ocidental (ADJANOHOUN & AKEÂ ASSI, 1979). Erveiros de feiras abertas citam essas espécies para o tratamento de enfermidades reumáticas e dermatoses (LOPES et al, 2012), além do tratamento medicinal, as espécies apresentam importância para a economia na produção de madeira, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas (DISTASI; HIRUMA-LIMA,2002).

No presente estudo a atenção é voltada a uma planta nativa do Norte do Brasil, a espécie *Vismia cayennensis* (MIRAGLIA et al, 1981), localmente conhecida como “lacre”, seu latex é usado no tratamento de dermatite, hanseníase, herpes, sífilis, saran e





## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CAULE DE *Vismia* sp.** de autoria de **Antonia Tavares Barbosa, Aniele da Silva Neves Lopes e Dominique Fernandes de Moura do Carmo**, foi apresentado sob a forma de pôster digital no evento **III Simpósio Regional Norte de Farmacognosia** realizado em **01/12/2021 a 02/12/2021**, evento on-line.

Manaus, 06 de janeiro de 2022.

Cecilia Veronica Nunez

Leopoldo Clemente Baratto



Realização:



Apoio:



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **ABORDAGEM QUIMIOMÉTRICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Vismia* spp.** de autoria de **Ívina Thayná Miranda Trindade, Aniele da Silva Neves Lopes, Aquila De Souza Neves, Felipe Moura Araújo Da Silva, Jaqueline de Araújo Bezerra e Dominique Fernandes de Moura do Carmo**, foi apresentado sob a forma de pôster digital no evento **III Simpósio Regional Norte de Farmacognosia** realizado em **01/12/2021 a 02/12/2021**, evento on-line.

Manaus, 06 de janeiro de 2022.

Cecilia Veronica Nunez

Leopoldo Clemente Baratto



Realização:



Apoio:



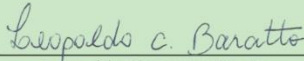


## MENÇÃO HONROSA

Certificamos que o trabalho intitulado **ABORDAGEM QUIMIOMÉTRICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Vismia* spp.** de autoria de Ivina Thayná Miranda Trindade, Aniele da Silva Neves Lopes, Aquila De Souza Neves, Felipe Moura Araújo Da Silva, Jaqueline de Araújo Bezerra e Dominique Fernandes de Moura do Carmo recebeu Menção Honrosa, na respectiva área temática de submissão, no evento **III Simpósio Regional Norte de Farmacognosia**, realizado em 01/12/2021 a 02/12/2021, evento on-line.

Manaus, 06 de janeiro de 2022.

  
Cecilia Veronica Nunez

  
Leopoldo Clemente Baratto



Realização:



Apoio:




## CERTIFICADO

XXVI SIMPÓSIO  
DE PLANTAS  
MEDICINAIS  
DO BRASIL



Certificamos que o trabalho intitulado "**Avaliação da atividade biológica de extratos de *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy**" de autoria de **Rafaela Rolim da Silva, Aniele da Silva Neves Lopes, Ivina Thayna Miranda Trindade, Jaqueline Bezerra de Araújo e Dominique Fernandes de Moura do Carmo**, foi apresentado no dia 27 de outubro de 2022 na Modalidade Pôster, durante o **XXVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, na Universidade Federal do Oeste do Pará.

  
Rosa Helena Veras Mourão  
Presidente do XXVI Simpósio de  
Plantas Medicinais do Brasil





# CERTIFICADO

XXVI SIMPÓSIO  
DE PLANTAS  
MEDICINAIS  
DO BRASIL



Certificamos que o trabalho intitulado "**Atividades biológicas de extratos de *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers.**" de autoria de **Aniele Silva Neves Lopes, Rafaela Rolim da Silva, Ívina Thayná Miranda Trindade, Jaqueline Bezerra de Araújo, Paulo José de Sousa Maia e Dominique Fernandes de Moura do Carmo**, foi apresentado no dia 27 de outubro de 2022 na Modalidade Pôster, durante o **XXVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, na Universidade Federal do Oeste do Pará.

**Rosa Helena Veras Mourão**  
Presidente do XXVI Simpósio de  
Plantas Medicinais do Brasil



Verifique o código de autenticidade fd580ac3f31416c1b176 em <https://www.submissao.agronfoodacademy.com/valida>



**AGRON FOOD**  
ACADEMY

# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE *Vismia* spp.**, de autoria de **Aniele da Silva Neves Lopes, Bruno Bezerra Jensen, Antônia Maria Ramos Franco, Paulo José de Sousa Maia, Dominique Fernandes de Moura do Carmo**, foi Apresentado e Publicado com êxito no evento **I Congresso Brasileiro de Química dos Produtos Naturais**, realizado em **12/04/2023 a 12/04/2023**, de forma online, promovido pela Agron Food Academy.

**Jaelyson Max Pereira de Medeiros**  
Diretor Administrativo  
Editora Agron Food Academy - 38.296.675/0001-01