

Análise do Potencial Antimarrário *in vitro* de Ligninas Alcalinas Obtidas a Partir das Plantas *Protium puncculatum*, *Buchenavia viridiflora* e *Scleronema micranthum*

Analysis of the *in vitro* Antimalarial Potential of Alkaline Lignins obtained from the plants *Protium puncculatum*, *Buchenavia viridiflora* and *Scleronema micranthum*

Carolina Ávila dos Anjos Santos¹, Josué Filipe de Oliveira Moraes Miranda¹, Karla Crystina Costa dos Santos¹, Lisandra da Silva Lima¹, Diego Santa Clara Marques¹, Maria do Carmo Alves de Lima¹, Iranildo José da Cruz Filho¹.

1. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

carolinaavilaanjos@gmail.com

Palavras-chave

Citotoxicidade
Lignina alcalina
Malária

Keywords

Cytotoxicity
Alkaline lignin
Malaria

Resumo:

As ligninas são moléculas aromáticas que apresentam uma gama de aplicações biológicas, nesse contexto foi realizada a análise do potencial antimarrário *in vitro* de ligninas alcalinas das espécies *Protium puncculatum*, *Buchenavia viridiflora* e *Scleronema micranthum*. Foram verificados parâmetros como a citotoxicidade em células (eritrócitos e hepatócitos) e atividade anti-*Plasmodium falciparum*, utilizando para tanto as cepas 3D7 e Dd2. Os resultados obtidos demonstraram que as ligninas possuem baixa atividade citotóxica e a espécie *Buchenavia viridiflora* apresentou valores de IC50 variando entre $2440 \pm 0,8$ e $9760 \pm 0,1$ ng/mL frente ao *P. falciparum*.

Abstract:

Lignins are aromatic molecules that have a range of biological applications. In this context, the *in vitro* antimalarial potential of alkaline lignins from the species *Protium puncculatum*, *Buchenavia viridiflora* and *Scleronema micranthum* was analyzed. Parameters such as cytotoxicity in cells (erythrocytes and hepatocytes) and anti-*Plasmodium falciparum* activity were verified, using strains 3D7 and Dd2. The results obtained demonstrated that lignins have low cytotoxic activity and the species *Buchenavia viridiflora* presented IC50 values ranging from 2440 ± 0.8 to 9760 ± 0.1 ng/mL against *P. falciparum*.

Artigo recebido em: 08.12.2024.

Aprovado para publicação em: 31.01.2025.

INTRODUÇÃO

A malária, com cerca de 247 milhões de casos em 2021, é uma doença tropical causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, transmitidos por picadas de mosquitos *Anopheles* fêmeas. O ciclo do parasito começa no fígado e, em seguida, ocorre a multiplicação nos eritrócitos (World Health Organization, 2023). Em 2021, a doença causou aproximadamente 619.000 mortes, sendo a maioria dos casos no Brasil concentrados na região amazônica (Ferreira et al., 2022).

O tratamento atual envolve terapias com artemisina (ACTs), os principais antimarrários para o *P. falciparum*, que provoca a maioria dos casos graves (Daily et al., 2022). No entanto, o parasito mostrou resistência a esses medicamentos, reforçando a necessidade de novas moléculas antimarrárias (Plowe, 2022).

Dessa forma, as ligninas alcalinas são macromoléculas aromáticas que possuem diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante (Li *et al.*, 2022), antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária; tais aplicações estão diretamente relacionadas à estrutura fenólica (Araújo *et al.*, 2022). Sendo assim, este estudo tem como objetivo verificar a citotoxicidade em eritrócitos e em hepatócitos além de avaliar o potencial antimalárico *in vitro* de ligninas alcalinas frente ao parasito *Plasmodium falciparum*.

METODOLOGIA

Os galhos e folhas das espécies *Buchenavia viridiflora*, *Protium puncticulatum* e *Scleronema micranthum*, fornecidos pela Mil Madeiras Preciosas Ltda em Itacoatiara (AM) e registradas no SisGen, foram secos a 60 °C por 48 h, moídos e tamisados até atingir 80 mesh, e armazenados a 30 °C.

As ligninas foram extraídas conforme a metodologia de Cruz-Filho *et al.* (2019). O material moído (200 g) foi submetido à extração em Soxhlet com tolueno/etanol (32:68, v/v) por 8 h. Após secagem a 105 ± 2°C por 72 h, foi realizado um pré- tratamento com H₃PO₄ a 1% em autoclave a 121°C por 1 h. Em seguida, realizou-se a deslignificação alcalina com NaOH 1% nas mesmas condições do pré-tratamento ácido. Ao final do processo o sólido foi separado do licor negro por filtração simples e o licor foi acidificado com H₂SO₄ para precipitar a lignina, a qual foi filtrada, lavada e seca a 70 ± 2 °C por 24 h. o rendimento de obtenção foi determinado por gravimetria. Por fim, essas foram caracterizadas pelo método de fenólicos totais.

As atividades biológicas realizadas foram os ensaios de atividade hemolítica e anti-*Plasmodium falciparum*. O potencial hemolítico das ligninas foi avaliado segundo a metodologia de Araujo *et al.*, (2022). Inicialmente, as ligninas foram dissolvidas em DMSO 1% e diluídas em RPMI, incubando-se em eritrócitos saudáveis. Uma suspensão de RBCs a 3% foi cultivada por 72 h em condições padrão, com diluições em série dos compostos variando de 50 a 0,02 µg/mL. Controles negativos e positivos foram estabelecidos com soluções específicas. Após a centrifugação, a liberação de hemoglobina foi quantificada espectrofotometricamente a 450 nm. Além da atividade hemolítica foi realizada um ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT em células de HEPG2 (um hepatoma que mimetiza os hepatócitos) essas células foram tratadas com lignina em concentrações que variaram de 6.25–100 µg/mL.

Os experimentos anti-*Plasmodium falciparum* utilizaram as cepas *P. falciparum* 3D7 (sensível à cloroquina) e Dd2 (resistente) conforme metodologias de Sena Pereira *et al.*, (2018) e Araujo *et al.*, (2022), com modificações. Os parasitas foram cultivados a 5% de hematócrito, 37 °C e 5% de CO₂, substituindo o soro humano por 0,5% de AlbuMAXII. As culturas foram sincronizadas com D-sorbitol a cada 48 h. as ligninas foram testadas em diluições de 10 a 0,014 µM por 72 h, avaliando-se o crescimento do parasito por citometria de fluxo. A concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% (IC₅₀) foi calculada usando o software GraphPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos de ligninas obtidos a partir dos galhos e folhas de *Scleronema micranthum*, os valores foram 67,9 ± 1,1% e 60,2 ± 0,3%. Para *Protium puncticulatum* foram de 73,4 ± 0,1% e 63,1 ± 1,2%. Por fim, para *Buchenavia viridiflora*, os rendimentos foram 67,9 ± 1,1% e 60,2 ± 0,3%, respectivamente. Os resultados da quantificação dos grupos fenólicos presentes nas estruturas químicas das ligninas dos ramos e folhas de *Scleronema micranthum* (237,936 ± 2,533; 166,519 ± 2,171),

Protium puncticulatum ($140,411 \pm 0,929$; $276,624 \pm 0,879$) e *Buchenavia viridiflora* ($237,936 \pm 2,533$ e $166,519 \pm 2,171$) foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de lignina (EAG/g).

Para uso como antimaláricos, biomoléculas devem ter baixa toxicidade em eritrócitos e células hepáticas. As ligninas avaliadas mostraram hemólise abaixo de 10% e baixa toxicidade em células HEPG2 ($>100 \mu\text{g/mL}$), sugerindo seu potencial promissor como antimaláricos.

No que se refere ao ensaio de atividade antimalárica *in vitro*, foi encontrado para os ramos e as folhas das plantas *Protium puncticulatum* e *Scleronema micranthum* na cepa sensível à cloroquina (3D7) valores de inibição inferiores a 20%, ambas não obtiveram efeito inibitório na cepa Dd2 resistente à cloroquina. Em adição, foi descoberto um resultado de IC₅₀ para a *Buchenavia viridiflora* de $2511,44 \pm 0,1 \text{ ng/mL}$ para os ramos e de $4892,38 \pm 0,7 \text{ ng/mL}$ para as folhas em relação a cepa de *P. falciparum* 3D7. No que diz respeito a cepa resistente Dd2, os resultados foram para ramos e folhas, respectivamente: $2440 \pm 0,8 \text{ ng/mL}$ e $9760 \pm 0,1 \text{ ng/mL}$.

O mecanismo de ação das ligninas contra as cepas de *Plasmodium falciparum* ainda não foi relatado na literatura, mas os resultados indicam que essa macromolécula pode possuir atividade citotóxica contra os parasitos.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo apresentaram que as ligninas dos ramos e folhas de *Protium puncticulatum*, *Buchenavia viridiflora* e *Scleronema micranthum* possuem baixa citotoxicidade contra células de mamíferos e baixa atividade hemolítica.

Além disso em relação a atividade antimalárica, a espécie *Buchenavia viridiflora* apresentou resultados positivos. Dessa forma as ligninas se encontram como promissores produtos biológicos que podem, após maiores estudos, ser aplicada nas áreas de ciências da saúde.

FINANCIAMENTO: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

AGRADECIMENTOS: Ao laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT- UFPE), a FACEPE e a Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D. M. F. et al. Biological activities and physicochemical characterization of alkaline lignins obtained from branches and leaves of *Buchenavia viridiflora* with potential pharmaceutical and biomedical applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 219, p. 224–245, 1 out. 2022.

CRUZ FILHO, I. J. et al. In vitro evaluation of alkaline lignins as antiparasitic agents and their use as an excipient in the release of benznidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, p. 123339–123339, 20 jan. 2023.

CRUZ FILHO, I. J. et al. Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1331–1339, fev. 2019.

SILVA, P. R. et al. Lignin from *Morinda citrifolia* leaves: Physical and chemical characterization, in vitro evaluation of antioxidant, cytotoxic, antiparasitic and ultrastructural activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1799–1812, 1 dez. 2021.

DAILY, Johanna P.; MINUTI, Aurelia; KHAN, Nazia. Diagnosis, treatment, and prevention of malaria in the US: a review. **Jama**, v. 328, n. 5, p. 460-471, 2022.

FERREIRA, Marcelo U. et al. Evidence-based malaria control and elimination in the Amazon: input from the International Center of excellence in malaria research network in Peru and Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 4 Suppl, p. 160, 2022.

LI, Xinru; LIU, Ying; REN, Xuehong. Transparent and ultra-tough PVA/alkaline lignin films with UV shielding and antibacterial functions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 216, p. 86-94, 2022.

PLOWE, Christopher V. Malaria chemoprevention and drug resistance: a review of the literature and policy implications. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 104, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO guidelines for malaria**. 2023.

