

4.03.01 - Farmácia / Farmacotecnia

## PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPLEXO ANTIMONIAL PENTAVALENTE-QUERCETINA (SbV-QUE)

Joyelanne K. C. Souza<sup>1\*</sup>, Valcilaine T. Barbosa<sup>2</sup>, Luciano A. M. Grillo<sup>3</sup>, Camila B. Dornelas<sup>4</sup>

1. Estudante de Iniciação Científica da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL

2. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFAL

3. Doutor, Professor e Pesquisador da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL

4. Doutora, Professora e Pesquisadora da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL / Orientadora

### Resumo:

A quercetina, que tem ação leishmanicida e quelante, tem se demonstrado uma alternativa para o tratamento da leishmaniose, tendo em vista a toxicidade dos antimoniais. Com isso, este trabalho objetivou preparar e caracterizar o complexo antimônio-quercetina nas formas de solução e pó.

Utilizando quercetina anidra e hexahidroxiantimoniato (V) de potássio, formou-se o complexo e este foi seco por rotaevaporação, liofilização e *spray dryer*. Tanto o complexo em solução, quanto em pó seguiram para caracterização para observação de suas propriedades.

Foi visto por fluorimetria aumento de fluorescência e desvio batocrômico (de 371 para 379 nm) por UV-Vis para a solução, que indicou a formação do complexo. Entre os principais resultados para o pó, o FTIV indicou o sítio de ligação do complexo, sendo este na carbonila na posição 4 e envolvendo a hidroxila do C-3, ocorrendo quelação cetona-enólica. Os resultados corroboraram para a confirmação da formação do complexo em solução e pó.

**Autorização legal:** Não se aplica.

**Palavras-chave:** leishmaniose; antimônio; flavonoide.

**Apoio financeiro:** UFAL, CNPq, FAPEAL, FINEP e CAPES.

### Introdução:

Estando entre as doenças negligenciadas, a leishmaniose é uma antroponose de alta mortalidade, cujo tratamento é feito com quimioterápicos, sendo o medicamento de primeira escolha fármacos a base de antimônio (NEVES et al., 2016). Este é um semimetal com diferentes estados de oxidação (principalmente +3 e +5). Atualmente são utilizados fármacos antimoniais pentavalentes como recurso para reduzir a toxicidade dos trivalentes (VIEIRA, 2008). Ainda assim, esta terapia continua sendo limitante por sua toxicidade a órgãos como coração, fígado e rins, além da via de administração, parenteral, que, associada ao longo período de tratamento, causa abandono por muitos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Nesse cenário, é legítima a busca de novos medicamentos que sejam eficientes e menos agressivos ao paciente, o que justifica a investigação da quercetina. Trata-se de um flavonoide que possui atividade leishmanicida reconhecida tanto para o estágio amastigota do parasito da *Leishmania (Leishmania) donovani* (TASDEMIR et al., 2006) e *L. (L.) amazonensis* (MUZITANO et al., 2006a, b), e para as formas amastigota e promastigota da *L. (L.) infantum chagasi* (VILA-NOVA et al., 2012), dispondo de melhor desempenho que fármacos de segunda escolha, como anfotericina B e pentamidina (VILA-NOVA et al., 2012). Além disso, a quercetina é pentahidroxilada e possui grupamento carbonila, que lhe confere atuação como agente quelante, possibilitando a formação de complexos com metais ou semimetais, como o antimônio. O complexo antimônio-quercetina já foi descrito em literatura, tendo sido avaliado quanto à despoluição de águas (ROJAS et al., 2013) e determinação de flavonoides (VISWANATHAN et al., 2000), mas nada a respeito da leishmaniose.

O objetivo deste estudo, por conseguinte, foi sintetizar o complexo antimonial pentavalente-quercetina (SbV-QUE) em solução e pó, e caracterizá-los, a fim de tecer maiores considerações sobre seu potencial leishmanicida, próxima etapa do trabalho.

### Metodologia:

Para a preparação do complexo, foi solubilizado 0,2g de hexahidroxiantimoniato (V) de potássio (Sigma Aldrich Co.) em 100mL de água milli-Q com auxílio de ultrassom e, separadamente, a 0,2g de quercetina (Sigma Aldrich Co.) foi solubilizada de 100mL metanol (Dinâmica®), adaptado de VISWANATHAN; SRIRAM; YOGESWARAN, 2000).

A caracterização do SbV-QUE solução foi feita por fluorimetria, onde foi utilizado espectrofluorímetro RF-5301PC Shimadzu com excitação em 370nm (Tóquio, Japão) e por espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis), utilizando-se espectrofotômetro Micronal AJX-6100PC (São Paulo, Brasil).

Após isso, o complexo foi seco por três técnicas: rotaevaporação (SbV-QUE ROTA), liofilização (SbV-QUE LIO) e *spray drying* (SbV-QUE SD). O rotaevaporador IKA® RV10 (Staufen, Alemanha) foi utilizado a 80°C quando o objetivo foi a secagem total da solução e a 60°C quando objetivou apenas a retirada do metanol (recurso utilizado previamente à liofilização e ao *spray drying*). Foi utilizado liofilizador Terroni® LD1500 (São

Carlos, Brasil) por 24 horas após congelamento prévio da amostra. O mini *spray dryer* Büchi B-290 (New Castle, Estados Unidos) foi utilizado com os seguintes parâmetros: com temperatura de entrada de 200°C, temperatura de saída variando de 75 a 85°C, bomba (alimentação) 33% e aspirador 85%.

Para caracterização do pó, foram realizadas as técnicas de difratometria de raios X (DRX), espectrometria de fluorescência de raios X (EDX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IV), termogravimetria (TG) e microscopia de fluorescência. A técnica de DRX fez uso do método de pó, pelo qual as amostras pulverizadas foram expostas a uma radiação monocromática. O equipamento utilizado foi da Shimadzu, modelo XRD-6000 com uma fonte de radiação de CuK  $\alpha$  com voltagem de 30 Kv e corrente de 30 mA, com filtro de Ni. Os dados foram coletados na faixa de  $2\theta$  de 5 a 40 graus com velocidade de goniômetro de 2°/min com um passo de 0,02 graus. A técnica de EDX foi feita análise sob vácuo, incluindo o balanço de carbono. A pesquisa foi feita através de espectrômetro de fluorescência de raios X dispersivo de energia EDX-7000/8000, equipamento Shimadzu. As análises FT-IV foram feitas em Thermo Scientific Smart-Omni Sampler Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer (Massachusetts, EUA), utilizando-se partilhas de KBr. A TG foi feita em analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo DTG-60. Cada amostra foi corrida em nitrogênio com taxa de temperatura de 10°C/min, de 100 a 800°C e comparada aos perfis de perda observados para os materiais de partida sob as mesmas condições de análise. A microscopia de fluorescência foi realizada através de Microscópio Axion Vision, utilizando-se filtro Alexa (vermelho), no comprimento de onda de 546nm, dotado com sistema ApoTome para melhoramento de imagem.

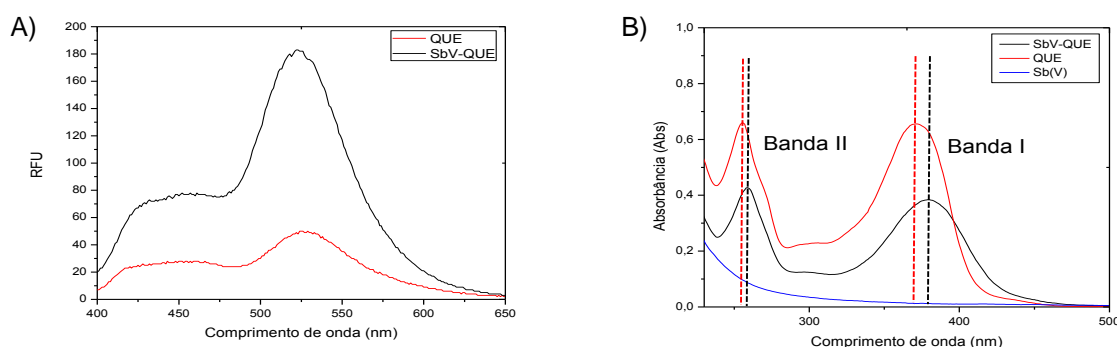
## Resultados e Discussão:

### COMPLEXO ANTIMÔNIO - QUERCETINA SOLUÇÃO (SbV-QUE SOL)

Após mistura da solução aquosa de hexahidroxiantimoniato-V de potássio, fonte de SbV, e metanólica de quercetina anidra, foi observada mudança instantânea de coloração para amarelo alaranjado com o pH do meio em aproximadamente 7, encontrando-se, portanto, a quercetina em sua forma neutra. Por meio da análise por fluorímetro, observou-se que a quercetina apresenta baixa fluorescência (Figura 1-A), que aumenta significativamente quando há formação do complexo, assim como no estudo de Viswanathan, Sriram e Yogeeswaran (2000), que, além desta característica, também notaram mudança de coloração.

Através da técnica de UV-Vis (Figura 1-B), observou-se desvio batocrômico de 371 (quercetina livre) para 379 nm no complexo SbV-QUE SOL, assim como descrito por Tong et al. (2016), onde as bandas da quercetina foram deslocadas de 255 para 259nm (banda II) e de 375 para 391nm (banda I). Isso acontece devido à extensão do sistema conjugado quando ocorre a complexação (SANNA et al. 2015). Este resultado, somado ao da fluorimetria ratifica a formação do complexo.

Figura 1: A) Fluorescência do complexo SbV-QUE em relação à quercetina; B) Espectros no UV-Vis do complexo SbV-QUE, quercetina (QUE) e antimônio (SbV).



### COMPLEXO ANTIMÔNIO – QUERCETINA EM PÓ (SbV-QUE PÓ)

Não havendo em literatura estudos sobre o efeito da secagem deste complexo, tornou-se imprescindível analisar sua estabilidade e viabilidade de seu uso. Os difratogramas mostraram diferença de cristalinidade entre os precursores e produtos. A quercetina apresentou picos bem demarcados e intensos, bem como o antimônio, porém com menor intensidade. O complexo SbV-QUE pó, secos através das três técnicas, apresentou difratograma característico de materiais amorfos, sugerindo a formação de um novo produto. Através dos resultados de EDX, foi observada a presença de antimônio no complexo, independentemente do método de secagem.

A partir das análises por FT-IV, foi visto que a quercetina apresentou suas bandas principais, como em 3350  $\text{cm}^{-1}$  relativa à deformação da ligação -OH e às pontes de hidrogênio intramoleculares de grupos hidroxila livres e intermoleculares; estiramento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  em 1660  $\text{cm}^{-1}$  referente à carbonila; e a banda em 1318  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao fenol (SIMÕES et al., 2013). O antimônio pentavalente apresentou bandas na região em que compreende de 3600 a 2250  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a -OH que representa água adsorvida e, além dessas, as bandas 766 e 604  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às ligações Sb-O, considerando-se a representações de ligações metal-O (DUOMO et al., 1997).

Nos complexos SbV-QUE ROTA e SD, houve aparecimento de bandas que se apresentam somente no SbV, na região espectral entre 700 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , que confirmam, não só a presença de antimônio na estrutura molecular, mas a formação do complexo, conforme foi descrito por Ravichandran, Rajendran e Devapirian (2014) para o Cd-O no complexo cádmio-quercetina. Já para o SbV-QUE LIO esta banda não se mostrou clara, provavelmente devido à técnica de FTIV não evidenciar bem bandas no início do espectro, correspondentes a substâncias inorgânicas, como o Sb.

Ainda, foi observado nos produtos bandas características exclusivamente da quercetina, na região entre 1300 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , independente da técnica de secagem. De acordo com Pralhad e Rajendracumar (2004), a banda em torno de 1664  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao alongamento carbonilo – cetônico do anel aromático. Neste caso, a banda em 1660  $\text{cm}^{-1}$ , encontrada na quercetina pura em estudo, sofreu deslocamentos, indicando a formação de um novo composto. Tal deslocamento, além de sugerir a formação do complexo, indica ainda onde estão localizados os possíveis sítios de ligação da complexação, ou seja, na carbonila localizada na posição 4 e com algum envolvimento da hidroxila localizada em C-3, sugerindo a chamada quelação cetona-enólica nos complexos formados.

Além destas, foi notado que nos complexos secos o aparecimento de uma nova banda na região de 1490  $\text{cm}^{-1}$ , a qual representa estiramento de ligação C=C características do anel aromático e indica acentuação e deslocamento da pequena banda observada na quercetina (LUNA et al., 2016). Segundo Ficarra et al. (2002), mudanças nas características das bandas dos precursores indicam a existência de um novo composto com bandas espectroscópicas diferentes.

A análise termogravimétrica permitiu observar as características de decomposição da quercetina livre, a qual possui três perdas de massa, a primeira entre 30 e 100°C, a segunda tendo início em 100°C e término em 355°C e outra iniciando em 355°C e tendo término em 798°C. A primeira, com perda de 10% de massa, relacionada à desidratação, a segunda perda é brusca e corresponde a aproximadamente 55% do peso e este indica a decomposição do anel central da estrutura da quercetina, ou a perda de um dos dois anéis dihidroxilados da mesma, compatível com a transição sólido/liquido e a terceira perda é de 35%, estando ligada à degradação do anel central da estrutura (BERLIER et al., 2013). Já para o SbV, foram observadas quatro perdas de massa: a primeira entre 30 e 100°C, correspondente à desidratação; a segunda com início a 119°C e término em 258°C, com perda de 7,21%; a terceira iniciou-se entre 258 e 478°C, com perda de 5,73%, a última com perda de massa de 2,4%, iniciando em 478°C e com fim em 673°C. A perda de massa do composto indica degradação das hidroxilas estruturais.

Com a análise do complexo, foi visto que houve o mesmo perfil termogravimétrico independente da técnica de secagem. Foram observadas quatro degradações, com a primeira tendo início em 30°C e finalizando em 100°C, com perda de 10% de massa e indicando a saída da água adsorvida. A segunda foi de 100°C a 338°C, podendo corresponder à desidratação e início da decomposição estrutural, com perda de 15%. A terceira iniciou-se na faixa 338°C e finalizou-se por volta de 540°C, indicando a decomposição do complexo com perda de aproximadamente 29%. Por fim, há decomposição oxidativa da matéria orgânica, com perda de massa de 30%, que se iniciou em torno de 540°C e teve fim em cerca de 800°C. Com a complexação, a perda de matéria orgânica ocorreu em temperaturas maiores que para a quercetina, mudando perfil termogravimétrico do composto. A perda de massa foi de 84%, com resíduo provável de antimônio (TONG et al., 2016).

Por fim, a microscopia de fluorescência permitiu avaliar a morfologia superficial da quercetina e complexo SbV-QUE, além de confirmar a conservação da propriedade de fluorescência e maior intensidade desta no complexo.

## Conclusões:

Tendo em vista o exposto, pode-se inferir que complexo antimônio-quercetina em solução foi obtido com êxito, sendo elucidados pelas técnicas de fluorimetria e UV-Vis. As metodologias utilizadas indicaram a conservação do complexo pós-secagem, as características deste se mantiveram semelhantes independente da técnica utilizada, sendo possível observar, através do FTIV, o provável sítio de ligação. Assim, o conjunto de técnicas corroborou à formação do complexo, informação fundamental para o prosseguimento do trabalho, visando ao tratamento da leishmaniose.

## Referências bibliográficas

BERLIER, et al. Stabilization of quercetin flavonoid in MCM-41 mesoporous silica: positive effect of surface functionalization. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 393. p. 109-118, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. **Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis**. 1ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>. Acesso em: 7 de janeiro, 2018.

DUOMO, Z et al. Polymorph control of antimony white (Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) prepared by hydrometallurgy method. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**. v.7, n.4, p.118-122, 1997.

FICARRA, R. et al. Study of flavonoids/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray

investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 29, n. 6, p. 1005-1014, 2002.

LUNA, F. M. T. et al. Rapid assessment of total and polycyclic aromatic contents. ***Environ Monit Assess.*** v. 188, n. 4, p. 215, 2016.

MUZITANO, M.F. et al. Quercitrin: An Antileishmanial Flavonoid Glycoside From *Kalanchoe pinnata*. *Planta Med.*, v. 72, n. 1. p. 81–83, 2006.

NEVES, D. P. et al. ***Parasitologia Humana***. 13 Ed. Atheneu Rio, 2016.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***. v. 34, n. 2, p. 333-339, 2004.

RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. ***Food Chemistry***. v. 146, n. 0, p. 472-478, 2014.

ROJAS, C. et al. High sensitivity adsorptive stripping voltammetric method for antimony(III) determination in the presence of quercetin-5'-sulfonic acid. Substituent effect on sensitivity. ***Sensors and Actuators B: Chemical***. v. 185, n. 0, p. 560-567, 2013.

SANNA, D. et al. Behavior Of The Potential Antitumor VIVO Complexes Formed By Flavonoid Ligands. 2. Characterization Of Sulfonate Derivatives Of Quercetin And Morin, Interaction With The Bioligands Of The Plasma And Preliminary Biotransformation Studies. ***Journal of Inorganic Biochemistry***. v. 53, n. 15, p. 167-177, 2015.

SIMÕES, V. D. N. et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). ***Química Nova***. v. 36, p. 495-501, 2013.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal And Antileishmanial Activities Of Flavonoids And Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship Studies. ***Antimicrob. Agents Chemother.*** v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TONG, L. et al. Sb(III)–Quercetin Complex: Synthesis, Characterization And Antioxidant Activity. ***Life Sci J.*** v. 13, n. 7, p. 127-133, 2016.

VIEIRA, F. A. Estudos Sobre O Comportamento Do Antimoniato De Meglumina No Corpo Humano E Em Macacos Rhesus. ***Pontifícia Universidade Católica Do Rio De Janeiro - Puc-Rio***. Disponível em: <[https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/Busca\\_etds.php?strSecao=resultado&nrSeq=12257@1&msg=28#>](https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/Busca_etds.php?strSecao=resultado&nrSeq=12257@1&msg=28#>). Acesso em: 3 de março, 2017.

VILA-NOVA, N.S. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium loribundum*, native plants from Caatinga biome. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***. v. 32, n. 11, p. 1164-1168, 2012.

VISWANATHAN, P.; SRIRAM, V.; YOGEESWARAN, G. Sensitive spectrophotometric assay for 3-hydroxy-substituted flavonoids, based on their binding with molybdenum, antimony, or bismuth. ***J Agric Food Chem.*** v. 48, n. 7, p. 2802-6, 2000.