

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

LUCAS AZEVEDO DE MENEZES

Investigação do Potencial Antitumoral de *Ismene
amancaes* e de Alcaloides da Família Amaryllidaceae

Campo Grande
2025

LUCAS AZEVEDO DE MENEZES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Professora. Dr^a. Thalita Bachelli Riul

**Investigação do Potencial Antitumoral de *Ismene
amancaes* e de Alcaloides da Família Amaryllidaceae**

**Campo Grande
2025**

SUMÁRIO

1. Introdução	6
2. Fundamentação Teórica.....	7
2.1. Câncer e leucemias.....	7
2.2 Tratamentos convencionais e produtos naturais	8
2.3 Atividade biológica de plantas e alcaloides da Família Amaryllidaceae	9
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. Metodologia.....	13
4.1. Material vegetal e preparação dos extratos.....	13
4.2 Atividade antitumoral em linhagens celulares	13
4.3 Citotoxicidade em linhagem de fibroblastos	14
4.4 Análise dos resultados	15
5. Resultados e Discussão	15
6. Conclusão	24
Objetivos	12
Referências bibliográficas	25

RESUMO

O câncer figura entre as principais causas de morte mundial, sendo um desafio crítico de saúde pública. Em 2020, registraram-se globalmente mais de 470 mil novos casos de leucemia, resultando em cerca de 310 mil óbitos. Os tratamentos convencionais atuais, embora essenciais, frequentemente ocasionam fortes efeitos colaterais, como náuseas, indisposição e toxicidade sistêmica. Nesse sentido, a biodiversidade, incluindo a flora sul-americana, representa uma fonte inesgotável de moléculas com potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos mais seguros. Este estudo investigou o potencial anticâncer *in vitro* de extratos de *Ismene amancaes* (Amaryllidaceae) e dos alcaloides isolados Haemantidina e Crinamina nas linhagens tumorais KG1 (Leucemia Mieloide Aguda - LMA), K562 (Leucemia Mieloide Crônica) e B16F10 (Melanoma), utilizando fibroblastos (NIH/3T3) para avaliação da seletividade. Os resultados demonstraram que o extrato do bulbo apresentou atividade promissora contra a linhagem KG1 ($CI_{50} = 17,78 \mu\text{g/mL}$) e um Índice de Seletividade (IS) de 6,69. Entre os alcaloides isolados, a Crinamina destacou-se com uma CI_{50} de $3,48 \mu\text{M}$ e um IS superior a 287 na linhagem KG1, revelando uma seletividade significativamente maior que a do fármaco padrão Doxorrubicina ($CI_{50} = 1,99 \mu\text{M}$; IS = 2,35). O estudo evidencia que alcaloides da família Amaryllidaceae, especialmente a Crinamina, são candidatos promissores para novas estratégias terapêuticas oncológicas, combinando boa potência com baixa toxicidade para células normais.

Palavras-chave: alcaloides, Amaryllidaceae, câncer.

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of mortality worldwide, posing a significant public health challenge. In 2020, more than 470,000 new cases of leukemia were reported globally, resulting in approximately 310,000 deaths. Although conventional treatments are essential, they frequently induce severe adverse effects, including nausea, malaise, and systemic toxicity. In this context, biodiversity, particularly the South American flora, constitutes an abundant source of bioactive molecules with potential for the development of safer therapeutic agents. This study investigated the in vitro anticancer activity of extracts from *Ismene amancaes* (Amaryllidaceae) and the isolated alkaloids haemanthidine and crinamine in the tumor cell lines KG1 (Acute Myeloid Leukemia AML), K562 (Chronic Myeloid Leukemia), and B16F10 (Melanoma). Fibroblasts (NIH/3T3) were used to assess selectivity. The bulb extract exhibited significant activity against the KG1 cell line ($IC_{50} = 17.78 \mu\text{g/mL}$) with a Selectivity Index (SI) of 6.69. Among the isolated alkaloids, crinamine showed the most potent and selective effect, presenting an IC_{50} of $3.48 \mu\text{M}$ and an SI greater than 287, substantially surpassing the standard chemotherapeutic agent doxorubicin ($IC_{50} = 1.99 \mu\text{M}$; SI = 2.35). Overall, the findings indicate that Amaryllidaceae alkaloids, particularly crinamine, are promising candidates for novel oncological therapeutic strategies, combining high potency with markedly reduced toxicity toward normal cells.

Keywords: alkaloids, Amaryllidaceae, cancer.

1. Introdução

O câncer consolidou-se como um dos maiores desafios de saúde pública da atualidade, figurando como a segunda principal causa de morte em escala global, logo após as doenças cardiovasculares (Naeem et al., 2022). A incidência da doença continua a crescer, impulsionada pelo envelhecimento populacional e fatores ambientais, gerando uma demanda urgente por novas terapias que superem as limitações de eficácia e toxicidade dos tratamentos atuais. Responsável por cerca de 9,6 milhões de óbitos em 2018, ou seja, 1 a cada 6 mortes no mundo (WHO, 2024).

Os tipos mais comuns de câncer entre os homens incluem pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto entre as mulheres são mama, colorretal, pulmão, colo do útero e tireoide. O câncer causa desgaste físico, emocional e financeiro em indivíduos, famílias, comunidades e sobrecarrega sistemas de saúde, especialmente em países de baixa e média renda, onde muitos pacientes não têm acesso a diagnóstico e tratamento de qualidade em tempo hábil (WHO, 2024).

Cientistas têm dedicado muitos esforços na busca por novos medicamentos para o tratamento e prevenção de cânceres (Lim et al., 2019). Aproximadamente metade dos medicamentos anticancerígenos baseados em pequenas moléculas que receberam aprovação originaram-se direta ou indiretamente de fontes naturais (Newman e Cragg, 2020).

Alcaloides são metabólitos, geralmente encontrados em plantas, que apresentam alta diversidade estrutural e potencial biológico, incluindo potente atividade anticancerígena contra vários tipos de câncer (Feher e Schmidt, 2003; Mohan et al., 2012).



Figura 1: Fotografia da flor de amancaes, flor típica das Lomas de Lima, capital do Peru, cujo nome científico é *Ismene amancaes* da Família Amaryllidaceae. (Mayta, 2010)

A família Amaryllidaceae, especificamente a subfamília Amaryllidoideae, apresenta um grupo exclusivo e em constante expansão de alcaloides isoquinolínicos, conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae, que possuem um amplo espectro de atividades biológicas. Membros desta subfamília são encontrados em todos os continentes, mas predominantemente em três locais geográficos distintos, incluindo América do Sul, África do Sul e o Mediterrâneo.

Os alcaloides de Amaryllidaceae têm atraído muito interesse devido à sua ampla gama de atividades biológicas. Por exemplo, já foram relatadas atividades de inibição de acetilcolinesterase, analgésica, antifúngica e antimalárica para esses alcaloides (Lin et al., 2025). Conhecendo a ampla gama de estruturas e a necessidade da busca de novos compostos com atividade antineoplásica, o presente estudo teve por objetivo analisar o efeito do extrato da planta *Ismene amancaes*, pertencente à família Amaryllidaceae, bem como dos alcaloides Haemantidina e Crinamina em diferentes linhagens celulares tumorais (Martins de Paiva et al., 2024).

2. Fundamentação Teórica

2.1. Câncer e leucemias

O câncer representa um dos maiores desafios para a saúde pública mundial, figurando entre as principais causas de morte e impactando milhões de pessoas todos os anos. Em 2020, registraram-se mais de 470 mil novos casos e cerca de 310 mil mortes por leucemia no mundo, reforçando seu impacto global. O tratamento envolve, em geral, quimioterapia, radioterapia, terapias alvo e transplante de células-tronco hematopoéticas, definidos com base no subtipo, em características citogenéticas e no perfil clínico do paciente. No entanto, apesar dos avanços, essas abordagens permanecem limitadas por efeitos adversos significativos incluindo toxicidades cardíacas, neurológicas, gastrointestinais, infecciosas, ósseas e pelo desenvolvimento frequente de resistência aos quimioterápicos e baixa seletividade dos medicamentos pelas células cancerígenas (Cotoraci et al., 2021).

Nesse sentido, entre os diversos tipos de câncer, existem aqueles que se destacam pela complexidade do tratamento, como as leucemias, que constituem um grupo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela proliferação anormal e clonal de células precursoras da medula óssea, resultando em acúmulo de células imaturas que comprometem a hematopoiese normal e podem infiltrar diversos tecidos e órgãos.

Esses cânceres são tradicionalmente classificados de acordo com a linhagem celular e a velocidade de progressão em quatro subtipos principais: leucemias mieloide aguda (LMA) e crônica (LMC), e leucemias linfoblástica aguda (LLA) e linfocítica crônica (LLC) (Sun et al., 2024). A LLA é particularmente comum na infância, com pico de incidência entre dois e cinco anos, enquanto os demais subtipos ocorrem predominantemente em adultos. A LMA é considerada uma das forma mais agressivas de leucemia, que se dá pela agudização da doença, que configura pouco tempo de resposta para seu tratamento. Fatores ambientais e comportamentais, como exposição materna pré-natal a pesticidas, reforma domiciliar e tabagismo parental, têm sido associados ao aumento do risco de leucemias infantis (Sun et al., 2024).

Nesse contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas, capazes de ampliar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Cotoraci et al., 2021).

2.2 Tratamentos convencionais e produtos naturais

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e na fisiopatologia das leucemias terem impulsionado o desenvolvimento de terapias-alvo mais específicas, os tratamentos atualmente disponíveis ainda apresentam limitações importantes. Mesmo os novos agentes aprovados nos últimos anos, quando utilizados isoladamente, têm eficácia restrita, sendo muitas vezes necessários em combinação com esquemas quimioterápicos convencionais, como ocorre na leucemia mieloide aguda. No entanto, essas abordagens combinadas intensificam a toxicidade, resultando em efeitos adversos agudos, como náuseas, vômitos, diarreia, mucosite, infecções, rash cutâneo, queda de cabelo e mielossupressão; e em sequelas de longo prazo, incluindo disfunção de órgãos, neuropatia, comprometimento cognitivo e fadiga persistente (Cotoraci et al., 2021).

Além disso, o uso contínuo desses fármacos favorece o surgimento de resistência tumoral, reduzindo a eficácia terapêutica. Diversos quimioterápicos clássicos apresentam toxicidades graves bem caracterizadas, como a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, a ototoxicidade causada pela cisplatina e os efeitos neurocognitivos associados ao 5-fluorouracil. A natureza pouco seletiva da quimioterapia, que danifica tanto células neoplásicas quanto células saudáveis,

contribui para esses efeitos colaterais intensos, prejudicando a adesão ao tratamento e a qualidade de vida dos pacientes. Embora terapias mais modernas, como inibidores de tirosina-quinase ou agentes antiangiogênicos, representem avanços importantes, o câncer permanece uma doença dinâmica, cujas células podem rapidamente adaptar-se às pressões terapêuticas. Diante dessas limitações, torna-se evidente a necessidade de novas estratégias terapêuticas mais específicas, menos tóxicas e capazes de superar mecanismos de resistência, incluindo a busca por compostos bioativos de origem natural (Naeem et al., 2022).

As plantas medicinais têm sido utilizadas ao longo da história no tratamento de diversas enfermidades, incluindo diferentes tipos de câncer, e continuam sendo uma das fontes mais promissoras de novas moléculas bioativas. A ampla diversidade química encontrada em metabólitos naturais torna esses compostos particularmente valiosos na busca por agentes antileucêmicos mais seguros e eficazes (Cotoraci et al., 2021; Naeem et al., 2022). Muitos extratos e substâncias isoladas de plantas demonstram efeitos citotóxico sobre células leucêmicas, modulando simultaneamente múltiplas vias envolvidas na tumorigênese, como proliferação celular, apoptose, angiogênese, migração e metástase (Sun et al., 2024; Naeem et al., 2022). Isso permite que produtos naturais atuem de maneira multifacetada, superando, em alguns casos, mecanismos de resistência que limitam a eficácia da quimioterapia convencional. Além disso, sua menor toxicidade, ampla disponibilidade e baixo custo reforçam o potencial desses compostos como alternativas viáveis e ambientalmente sustentáveis aos fármacos sintéticos (Guo et al., 2022; Naeem et al., 2022). A relevância terapêutica dos produtos naturais já se reflete em fármacos amplamente utilizados na prática clínica: alcaloides da vinca, como vincristina e vimblastina, são essenciais no tratamento de linfomas e leucemias agudas, enquanto derivados semissintéticos como etoposídeo e teniposídeo compõem esquemas terapêuticos para diversas neoplasias hematológicas. Esses exemplos ilustram a importância contínua das plantas como fonte de agentes antitumorais e sustentam o interesse em explorar novos compostos naturais capazes de ampliar as opções terapêuticas contra o câncer (Cotoraci et al., 2021).

2.3 Atividade biológica de plantas e alcaloides da Família Amaryllidaceae

As plantas da família Amaryllidaceae constituem uma fonte particularmente rica

de compostos bioativos, destacando-se por produzirem um grupo exclusivo de alcaloides com amplo espectro farmacológico. Muitos alcaloides descritos em Amaryllidaceae, todos derivados biossinteticamente do precursor norbeladina, exibem atividades que incluem efeitos antiparasitários, antifúngicos, antivirais, antibacterianos, anticolinesterásicos e marcante ação citotóxica e antiproliferativa (Lin et al., 2025). A relevância medicinal dessa família é reconhecida desde a antiguidade, com espécies como *Lycoris radiata*, *Hymenocallis littoralis*, *Amaryllis belladonna* e *Narcissus poeticus* sendo tradicionalmente empregadas no tratamento de tumores por diversas culturas ao redor do mundo (Nair et al., 2016). O interesse contemporâneo nesses metabólitos cresceu à medida que estudos químico-biológicos passaram a demonstrar que muitos de seus alcaloides, como crinina, licorina, narciprimina e fenantridonas como pancratistatina e narcislasina, apresentam citotoxicidade seletiva contra células tumorais, promovendo inibição da proliferação e indução de apoptose. Assim, as Amaryllidaceae configuram-se como um reservatório promissor de moléculas com potencial para originar novos candidatos terapêuticos contra diferentes tipos de câncer, reforçando o papel dos produtos naturais na descoberta de fármacos anticâncer inovadores (Martins de Paiva et al., 2024).

Os alcaloides da subfamília Amaryllidoideae da família Amaryllidaceae são reconhecidos por sua importância química e farmacológica. Esta subfamília abrange mais de 800 espécies de plantas perenes distribuídas pelos trópicos e subtropicais, sendo que os alcaloides são um traço quimiotaxonômico distintivo. Desde o primeiro isolamento da licorina de *Narcissus pseudonarcissus* em 1877, mais de 600 alcaloides foram identificados nesta família de plantas até o final de 2018, com a maioria sendo bases monoméricas terciárias, mas também incluindo N-óxidos e alcaloides diméricos (Lin et al., 2025).

Esses compostos despertaram grande interesse de pesquisa devido à sua ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades anticâncer, citostáticas, antivirais e antifúngicas (Lin et al., 2025).

Com o avanço das técnicas analíticas, novos tipos de esqueletos de alcaloides foram identificados, destacando a diversidade estrutural desses compostos. Até o final de 2023, a biossíntese e as potenciais aplicações antivirais desses alcaloides foram amplamente revisadas, enfatizando a importância de estudos sintéticos e enantiosseletivos para justificar conclusões biossintéticas e explorar seu potencial

terapêutico (Lin et al., 2025).

A subfamília Amaryllidoideae destaca-se pela sua riqueza em alcaloides, compostos que têm atraído interesse devido às suas diversas atividades biológicas e farmacológicas. Esses alcaloides, incluindo a Haemantidina e a Crinamina, possuem um notável potencial anticancerígeno (Lin et al., 2025; Nair et al., 2016).

A Haemantidina tem mostrado uma citotoxicidade seletiva significativa contra células cancerígenas. Estudos demonstram que a Haemantidina pode induzir apoptose em várias linhas celulares de câncer, enquanto preserva a viabilidade das células normais. A indução de morte celular por apoptose é uma estratégia terapêutica vantajosa, pois ativa vias programadas de eliminação celular, como a ativação de caspases e a regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas (ex: Bcl-2), contornando mecanismos de resistência tumoral sem desencadear processos inflamatórios deletérios (MARTINS DE PAIVA et al., 2024). Além disso, a grande vantagem descrita para os alcaloides de Amaryllidaceae é a capacidade de induzir essa apoptose de maneira seletiva, afetando preferencialmente as células cancerígenas enquanto poupam as células normais, o que constitui um diferencial crítico para o desenvolvimento de fármacos com menor toxicidade sistêmica (Nair; Bastida; Van Staden, 2016).

A Crinamina, outro alcaloide relevante da Amaryllidaceae, também apresenta uma forte atividade anticancerígena. Pesquisas recentes indicam que a Crinamina é eficaz na indução de apoptose e na inibição da proliferação celular. Esse composto atua principalmente alterando o potencial da membrana mitocondrial, um mecanismo crucial para a apoptose celular. Essa capacidade de direcionar mecanismos celulares específicos torna os alcaloides de Amaryllidaceae candidatos promissores para novas terapias anticancerígenas (Martins de Paiva et al., 2024; Nair et al., 2016).

Além disso, os alcaloides de Amaryllidaceae demonstram atividade inibitória significativa contra a enzima acetilcolinesterase (AChE), o que é relevante para o tratamento de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer. A galantamina, por exemplo, é um alcaloide da Amaryllidaceae que já é comercializado para o tratamento da doença de Alzheimer, evidenciando o potencial terapêutico diversificado desses compostos (Lin et al., 2025).

A pesquisa focada na viabilidade dos alcaloides Haemantidina e Crinamina,

bem como dos extratos de *Ismene amancaes*, justifica-se pela necessidade urgente de novos tratamentos eficazes e acessíveis contra o câncer. Apesar dos avanços na medicina, muitos pacientes, especialmente em países de baixa e média renda, ainda enfrentam dificuldades significativas no acesso a diagnósticos e terapias adequadas. Portanto, explorar compostos naturais com potencial antineoplásico é crucial para diversificar e melhorar as opções terapêuticas disponíveis (Naeem et al., 2022; Guo et al., 2022).

A investigação de alcaloides da família Amaryllidaceae, conhecidos por sua diversidade estrutural e ampla gama de atividades biológicas, responde a uma lacuna existente na literatura científica sobre novos agentes anticancerígenos naturais. A pesquisa pode levar à descoberta de novos medicamentos baseados em pequenas moléculas, ampliando as possibilidades de tratamento e fornecendo uma base sólida para estudos futuros que busquem entender e otimizar as propriedades anticancerígenas desses compostos.

Por fim, a realização desta pesquisa fortalece a posição da instituição como um centro inovador em pesquisa farmacêutica, capaz de contribuir significativamente para o avanço da ciência e da saúde pública. Os resultados podem atrair colaborações e financiamentos, promovendo o desenvolvimento de novos tratamentos que beneficiem tanto a comunidade científica quanto a sociedade em geral, ao proporcionar alternativas terapêuticas mais eficazes e acessíveis para o combate ao câncer.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar a atividade anticancerígena de extratos da planta *Ismene amancaes* e de dois alcaloides de *Amaryllidaceae* em linhagens de células tumorais e não tumorais.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial anticancerígeno do extrato do bulbo e das flores de *Ismene amancaes* sobre as linhagens de células KG1 (leucemia mieloide aguda - LMA), K562 (leucemia mieloide crônica) e B16F10 (melanoma);

- Avaliar o potencial anticancerígeno dos alcaloides haemantidina e crinamina sobre as linhagens de células KG1 (leucemia mieloide aguda - LMA), K562 (leucemia mieloide crônica) e B16F10 (melanoma);
- Avaliar a citotoxicidade das amostras em linhagens de células não-cancerosas (NIH/3T3, linhagem de fibroblastos de camundongos);
- Avaliar a seletividade das amostras através do cálculo de CI_{50} , CC_{50} e do índice de seletividade.

4. Metodologia

4.1. Material vegetal e preparação dos extratos

Os extratos brutos (EB) do bulbo e das flores da planta *Ismene amancaes* e as amostras dos alcaloides foram preparados e gentilmente cedidos pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo. As amostras dos alcaloides haemantidina e crinamina foram obtidas por extração ácido-base, isoladas e purificadas por diferentes ferramentas cromatográficas. Os alcaloides foram identificados por métodos cromatográficos e espectroscópicos, conforme descrito em trabalhos anteriores (Tallini et al., 2024). As amostras de extratos foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich, USA) estéril na concentração de 100 mg/mL e armazenadas em geladeira (4°C) até o uso nos experimentos de viabilidade.

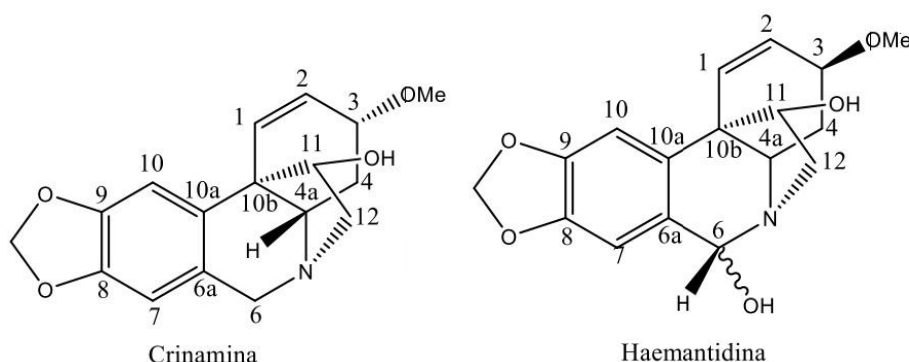


Figura 2 – Estruturas químicas dos alcaloides Haemantidina (A) e Crinamina (B).

4.2 Atividade antitumoral em linhagens celulares

Células das linhagens KG1 (leucemia mieloide aguda), K562 (leucemia mieloide crônica) e B16F10 (melanoma) foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich/EUA), contendo soro bovino fetal a 10% (Cultilab/Brasil), 10 UI/mL de

penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Sigma-Aldrich/EUA). O monitoramento da confluência e da morfologia celular foi realizado diariamente, e as células foram submetidas a repiques periódicos para manutenção da fase exponencial de crescimento antes dos ensaios de citotoxicidade (Cotoraci et al., 2021; Nair; Bastida; van staden, 2016). Para cada linhagem as células foram distribuídas (1x10⁴ células por poço) em placas de 96 poços, contendo os extratos ou os alcaloides nas concentrações de 1000 a 1,56 µg/mL. As placas são incubadas por 48 horas a 37°C, e após esse período a avaliação da viabilidade foi feita por espectrofotometria pelo método da resazurina (Sigma-Aldrich/EUA) em cada poço. O ensaio de viabilidade celular *in vitro* utilizando resazurina foi selecionado pela sua sensibilidade e reprodutibilidade na avaliação da atividade citotóxica de compostos. A resazurina é um indicador metabólico que é reduzido a resorufina fluorescente em células viáveis, permitindo a quantificação precisa da viabilidade celular (Rampersad, 2012). A porcentagem de viabilidade para cada concentração de extrato foi calculada em relação ao controle de vida (CV) somente com meio. O controle positivo de morte foi feito com doxorrubicina (0,078 a 5 µM).

4.3 Citotoxicidade em linhagem de fibroblastos

Células da linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de camundongo) em meio RPMI devidamente suplementado foram distribuídas em placas (1x10⁴ células por poço) em placas de 96 poços nas condições padronizadas, contendo os extratos e os alcaloides nas concentrações de 1000 a 15,6 µg/mL. As placas são incubadas por 48 horas a 37°C, e após esse período a avaliação da viabilidade foi feita por espectrofotometria pelo método da resazurina (Sigma-Aldrich/EUA) em cada poço. A porcentagem de viabilidade para cada concentração de extrato foi calculada em relação ao controle de vida (CV) somente com meio. O controle positivo de morte foi feito com doxorrubicina (0,078 a 5 µM).

4.4 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata. Quando necessário comparar variâncias, foram utilizados teste de ANOVA e pós-teste de Tukey, com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0. O nível de significância foi de 5%. Para cálculo da CI_{50} e CC_{50} foi feita uma regressão não linear dos resultados obtidos, e o índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão de CC_{50} por CI_{50} . A análise estatística foi realizada para validar os resultados experimentais. O uso do teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, permitiu a comparação das médias entre múltiplos grupos, garantindo que as diferenças observadas fossem estatisticamente significativas (Motulsky, 2018). A regressão não linear foi utilizada para obter os valores de IC_{50} , fornecendo uma medida quantitativa da eficácia dos compostos, prática padrão em estudos farmacológicos (Seber e Wild, 2003).

5. Resultados e Discussão

Para avaliar a atividade anticancerígena dos extratos e alcaloides, foram utilizadas diversas linhagens celulares tumorais KG1 (leucemia mieloide aguda - LMA) e K562 (leucemia mieloide crônica) (Cotoraci et al., 2021), além de B16F10 (melanoma) (Nair et al., 2016). A inclusão de uma linhagem celular não-cancerosa, NIH/3T3 (fibroblastos de camundongos), permite a avaliação da seletividade dos compostos testados, assegurando que os efeitos observados são específicos para células cancerígenas e não causam danos significativos às células normais (Nair et al., 2016). Essas linhagens são amplamente utilizadas em pesquisas anticancerígenas devido à sua relevância clínica e facilidade de cultivo.

A viabilidade das células foi avaliada por espectrofotometria pelo método da resazurina, e os resultados estão na Figura 3.

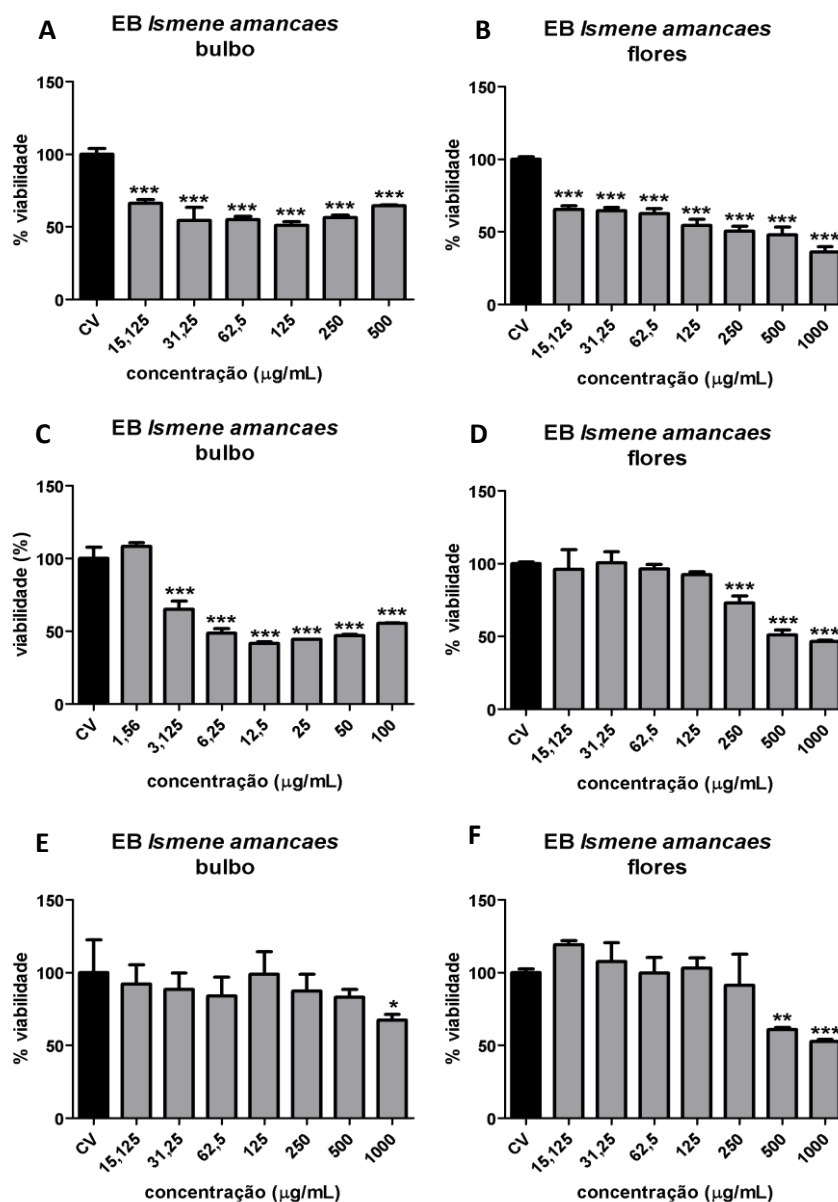


Figura 3: Atividade antitumoral dos extratos de *Ismene amancaes*. Diferentes extratos da planta foram incubados com linhagens de células tumorais por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A e B – K562; C e D – KG1; E e F – B16F10. *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Podemos observar que tanto o extrato bruto (EB) do bulbo como o EB das folhas reduziram a viabilidade das células tumorais em algumas concentrações testadas em relação ao controle de viabilidade (CV, apenas células com meio de cultura). No entanto, essa redução da viabilidade foi mais evidente para o EB do bulbo de *I. amancaes* na linhagem KG1 (Figura 1C) e para o EB das flores na linhagem K562 (Figura 1B).

Os extratos de *Ismene amancaes* também foram avaliados quanto à citotoxicidade na linhagem celular NIH/3T3, linhagem celular de fibroblastos de

camundongo. As células foram incubadas com diferentes concentrações dos extratos (de 15,625 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI devidamente suplementado por 48 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após esse período, a viabilidade das células também foi avaliada pelo método da resazurina, e os resultados estão ilustrados na Figura 4. Observamos que os extratos foram citotóxicos de forma dose dependente para as células NIH/3T3.

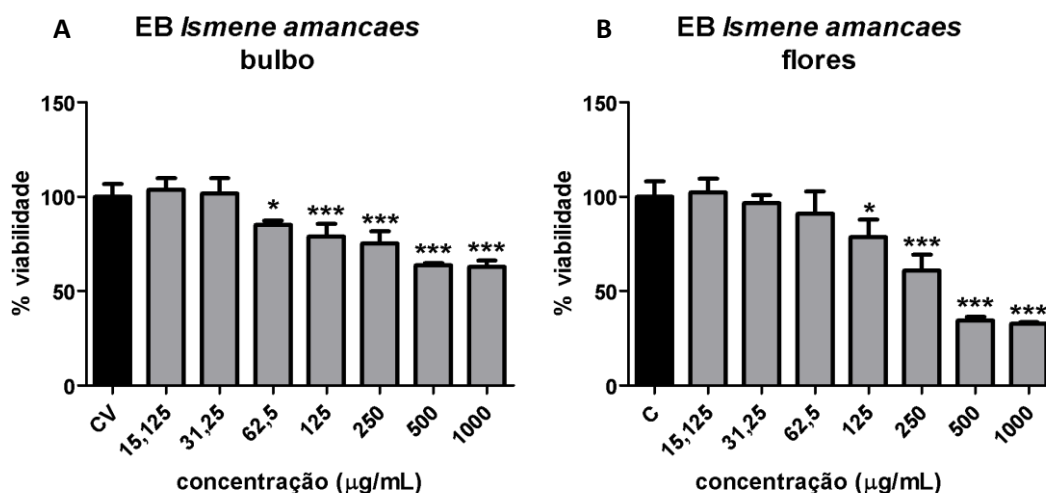


Figura 4: Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Ismene amancaes*. Extrato bruto (EB) do bulbo e das flores foram incubados com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – extrato bruto (EB) do bulbo e B – EB das flores. *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

As células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos e alcaloides, variando de 1000 a 15,625 μM , para determinar a concentração inibitória 50% (IC_{50}). Este parâmetro é crucial para comparar a potência dos compostos testados (Raj et al., 2011).

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos de atividade antitumoral e citotoxicidade, foi feita uma regressão não linear dos resultados obtidos para o cálculo das concentrações inibitórias de 50% das células e concentrações citotóxicas de 50% das células (CI_{50} e CC_{50} , respectivamente). Além disso, o índice de seletividade de cada amostra foi calculado a partir dos resultados obtidos para CI_{50} e CC_{50} . Todos esses resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade das amostras de *Ismene amancaes*

Amostra	CI_{50} K562 ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de seletividade (IS)
<i>EB I. amancaes bulbo</i>	316,23	119,00	0,38
<i>EB I. amancaes flores</i>	100,00	166,40	1,66
Doxorrubicina*	3,72	4,67	1,26

Amostra	CI_{50} KG1 ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de seletividade (IS)
<i>EB I. amancaes bulbo</i>	17,78	119,00	6,69
<i>EB I. amancaes flores</i>	222,70	166,40	0,75
Doxorrubicina*	1,99	4,67	2,35

Amostra	CI_{50} B16F10 ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de seletividade (IS)
<i>EB I. amancaes bulbo</i>	125,89	119,00	0,95
<i>EB I. amancaes flores</i>	>1000	166,40	0,17
Doxorrubicina*	2,15	4,67	2,2

CI_{50} : concentração inibitória de 50% nas linhagens células; CC_{50} : concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC_{50} e CI_{50} . *Para doxorrubicina, os valores estão em μM .

Ao analisar os resultados das Figuras 1 e 2 e da Tabela 1, constatamos que as amostras de *Ismene amancaes* reduziram de forma significativa e dose dependente a viabilidade de células em algumas linhagens tumorais nas condições testadas. No entanto, essa redução ficou mais evidente para o EB do bulbo de *I. amancaes* na linhagem KG1, com a menor CI_{50} obtida, de 17,78 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando a citotoxicidade das amostras frente às células NIH/3T3, ambas as amostras apresentaram citotoxicidade dose-dependente, com CC_{50} variando de 119,00 a 166,40 $\mu\text{g/mL}$ para o EB do bulbo e o EB das flores, respectivamente. Já o índice de seletividade (IS) de cada extrato foi obtido pela razão da CC_{50} pela CI_{50} de cada amostra para cada linhagem celular tumoral e encontra-se na Tabela 1. Quanto maior o IS, maior a seletividade de uma amostra em reduzir a viabilidade da célula tumoral do que das células de mamíferos não-tumorais testadas. Dessa forma, considerando os resultados obtidos para as amostras, o maior IS obtido foi para o EB dos bulbos de *I. amancaes* na linhagem KG1, cujo valor foi de 6,69.

A maior parte dos relatos na literatura sobre a atividade *in vitro* anticâncer ou antileucêmica de plantas da família Amaryllidaceae usa alcaloides isolados, são

poucos os relatos de estudos com extratos das plantas. Um artigo de Napo e colaboradores (2020) investigou a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos de plantas da família Amaryllidaceae. As três plantas testadas pelos autores, *Crinum bulbispermum*, *Boophone disticha* e *Amaryllis belladonna*, são tradicionalmente utilizadas no tratamento de leucemias, embora com poucos dados científicos que comprovem essa prática. Extratos obtidos de raízes, bulbos e folhas mostraram a presença predominante de terpenoides e flavonoides, enquanto os alcaloides e fitoesteróis foram detectados apenas nos bulbos. De modo geral, os extratos mais polares apresentaram maior atividade biológica: os extratos aquosos de bulbos de *C. bulbispermum* e *B. disticha* inibiram acima de 70% o crescimento celular a 10 µg/mL, e o extrato metanólico de raízes de *A. belladonna* mostrou inibição completa a 50 µg/mL (Napo et al., 2020). Os resultados conferem respaldo científico ao uso tradicional dessas plantas no tratamento de leucemias.

É interessante observar também os resultados obtidos para a doxorrubicina, fármaco bastante usado para o tratamento de diferentes tumores (Bisht et al., 2025): a CI_{50} para as três linhagens tumorais foi bem baixa, variando de 1,99 µM (para B16F10) e 3,72 µM (para K562), o que é um resultado esperado para um fármaco antitumoral de referência. No entanto, observamos que a doxorrubicina também é bastante citotóxica para os fibroblastos da linhagem NIH/3T3, cuja CC_{50} obtida nas condições testadas foi de 4,67 µM. Isso resulta em baixos índices de seletividade obtidos para este fármaco (1,26 a 2,35). A doxorrubicina, uma das principais representantes das antraciclinas, permanece como um dos pilares do tratamento oncológico por sua ampla atividade contra tumores sólidos e hematológicos. Apesar disso, seu uso é frequentemente limitado por características farmacológicas desfavoráveis, como baixa biodisponibilidade e rápida eliminação, que acabam exigindo doses mais altas (Bisht et al., 2025). Esses fatores, somados ao surgimento de resistência tumoral, reduzem sua eficácia ao longo do tratamento. Além disso, a doxorrubicina está associada a efeitos tóxicos importantes — especialmente cardiotoxicidade, além de nefrotoxicidade e mielossupressão — que dificultam seu emprego prolongado. Diante dessas limitações, cresce o interesse no desenvolvimento de derivados e formulações que preservem sua ação antitumoral, mas com menor toxicidade e melhor desempenho terapêutico (Peter et al., 2022). Sua potência e seus efeitos tóxicos podem explicar a baixa seletividade observada neste

experimento *in vitro*.

Os alcaloides haemantidina e crinamina, comumente descritos em plantas da família Amaryllidaceae (Nair et al., 2016) também foram testados quanto a sua atividade antitumoral frente às mesmas linhagens celulares, e os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 5.

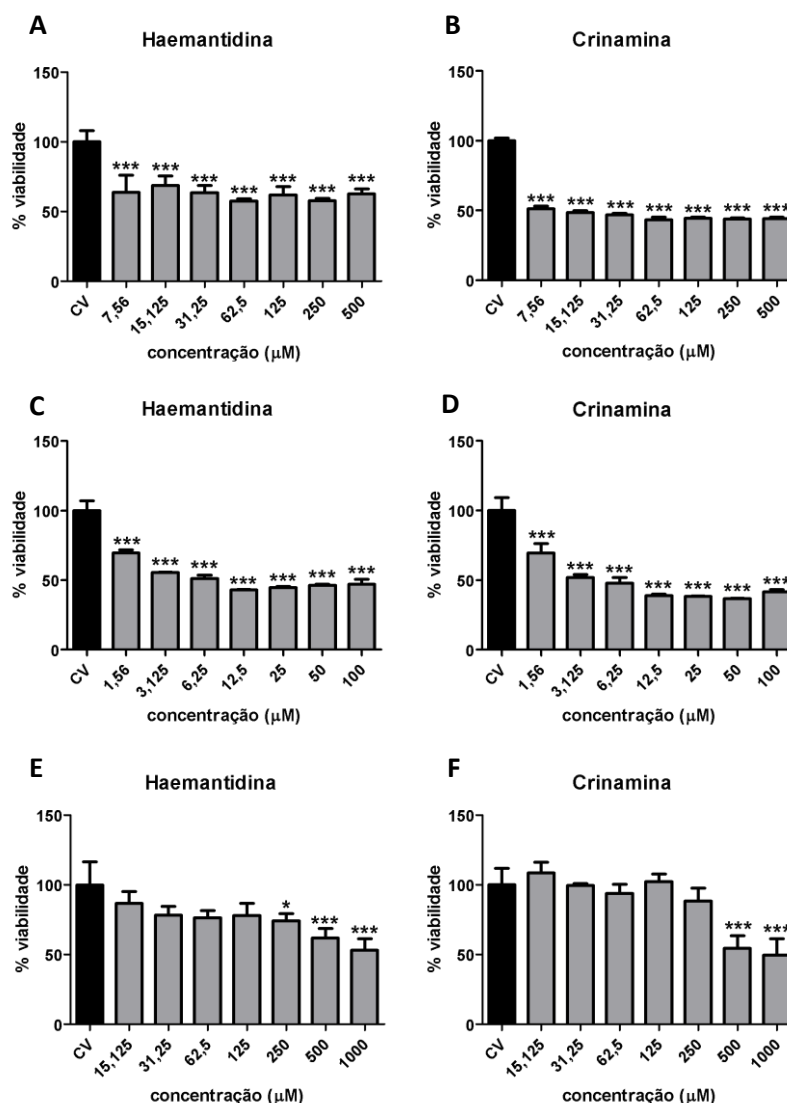


Figura 5: Atividade antitumoral de alcaloides presentes em Amaryllidaceae. Os alcaloides haemantidina e crinamina foram incubados com linhagens de células tumorais por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A e B – K562; C e D – KG1; E e F – B16F10. *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Detectamos uma redução da viabilidade não dose-dependente para ambas as amostras para as células K562 (Figura 3A e B) e KG1 (Figura 3C e D). A inibição da viabilidade para células B16F10 não parece muito evidente (Figura 3E e F).

A citotoxicidade dos dois alcaloides também foi testada em células NIH/3T3,

cujos resultados encontram-se na Figura 6.

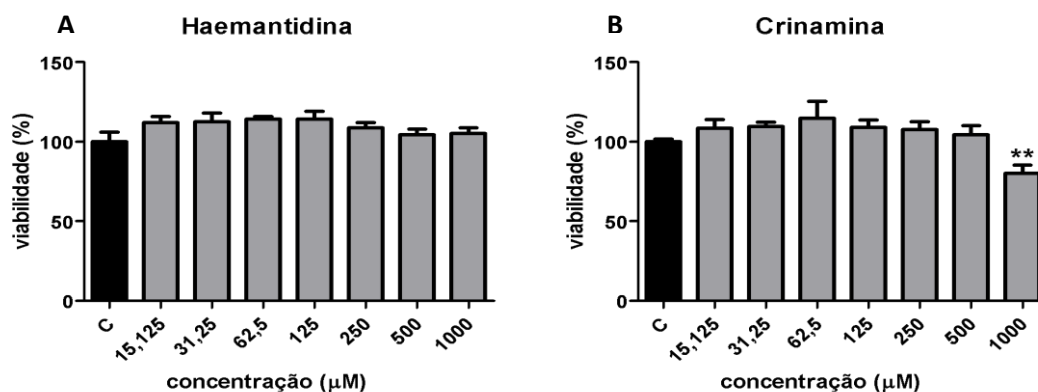


Figura 6: Avaliação da citotoxicidade de alcaloides presentes em Amaryllidaceae. Diferentes alcaloides foram incubados com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – extrato bruto (EB) do bulbo e B – EB das flores. *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Podemos observar que os alcaloides haemantidina e crinamina foram pouco tóxicos para as células NIH/3T3: apenas a crinamina reduziu a viabilidade das células nestas condições e somente na maior concentração testada (1000 μM). De forma a interpretar melhor os resultados obtidos, foram calculadas as CI_{50} , CC_{50} e IS para ambos os alcaloides em todas as linhagens testadas, e os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade de alcaloides presentes em Amaryllidaceae

Alcalóide	CI_{50} K562 (μM)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (μM)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	630,95	>1000	>1,58
Crinamina	12,59	>1000	>79,43
Doxorrubicina	3,72	4,67	1,25

Alcalóide	CI_{50} KG1 (μM)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (μM)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	6,80	>1000	>147,06
Crinamina	3,48	>1000	>287,35
Doxorrubicina	1,99	4,67	2,35

Alcalóide	CI_{50} B16F10 (μM)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (μM)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	1479,11	>1000	>0,68
Crinamina	1333,52	>1000	>0,75
Doxorrubicina	2,15	4,67	2,17

CI_{50} : concentração inibitória de 50% nas linhagens células; CC_{50} : concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC_{50} e CI_{50} .

De acordo com os valores de CI_{50} obtidos, afirmamos que ambos os alcaloides foram mais ativos contra a linhagem KG1, cujos valores de CI_{50} foram 6,80 e 3,48 μM para haemantidina e crinamina, respectivamente. Crinamina também apresentou boa atividade na redução de viabilidade de células da linhagem K562, com uma CI_{50} de 12,59 μM . Já para a linhagem B16F10, ambos os alcaloides foram inativos.

Em relação à citotoxicidade para células da linhagem NIH/3T3, ambos os alcaloides apresentaram CC_{50} estimada acima de 1000 μM , uma vez que com os resultados obtidos nas condições testadas, não foi possível obter um valor exato de CC_{50} . Dessa forma, para estimar os valores de IS para os alcaloides nas diferentes linhagens celulares, usamos o valor de 1000 μM , que foi a maior concentração testada. Assim, os melhores IS obtidos foram para crinamina (287,35) e haemantidina (147,06) em relação à linhagem KG1. Ainda, o IS da crinamina para a linhagem K562 foi de 79,43, também considerado um bom resultado.

A extração ácido-base foi escolhida como método principal para a obtenção de alcaloides da planta *Ismene amancaes*. Essa técnica é amplamente reconhecida por sua eficácia na separação de compostos alcalóidicos a partir de matrizes vegetais complexas, permitindo a obtenção de alcaloides com alta pureza e atividade biológica comprovada (Lin et al., 2025). Técnicas cromatográficas avançadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia em camada delgada (TLC), foram empregadas para purificação e identificação dos alcaloides devido à sua alta precisão e capacidade de resolução (Lin et al., 2025).

Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na pesquisa e no desenvolvimento de fármacos antitumorais, sendo responsáveis por cerca de 50% dos medicamentos utilizados atualmente na terapêutica do câncer nas últimas décadas (Naeem et al., 2022). Muitos compostos isolados de plantas, organismos marinhos e microrganismos apresentam atividade antitumoral comprovada, servindo como base para a síntese de fármacos ou inspirando novas estratégias terapêuticas. Substâncias de origem natural — provenientes, por exemplo, de plantas e organismos aquáticos — que apresentam atividade antitumoral pertencem a uma ampla variedade de classes químicas. Entre elas destacam-se alcaloides, diterpenos, diterpenoquinonas, compostos derivados de purinas, sesquiterpenos lactônicos, peptídeos, depsipeptídeos cíclicos, proteínas e poliéteres macrocíclicos, entre outros (Lichota et al., 2018). Exemplos notáveis incluem o paclitaxel, derivado da casca da árvore *Taxus*

brevifolia, e os alcaloides da vinca, que são amplamente utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer (Guo et al., 2022). Além disso, pesquisas com produtos naturais têm demonstrado potencial para superar limitações dos fármacos convencionais, como resistência e toxicidade, abrindo caminho para novas abordagens no combate ao câncer.

Em relação à atividade antileucêmica, diversos compostos de origem vegetal e amplamente distribuídos no reino das plantas já tiveram essa propriedade descrita: a luteolina, por exemplo, é uma flavona presente em diversas plantas utilizadas na alimentação humana; a quercetina também ocorre em uma grande variedade de frutas e vegetais; a apigenina é encontrada em espécies dos gêneros *Artemisia*, *Achillea*, *Matricaria* e *Tanacetum*; o epigallocatequina-galato (EGCG) constitui o principal componente do chá-verde; a curcumina é um composto fenólico oriundo dos rizomas de *Curcuma longa* L.; a timoquinona é um monoterpene isolado das sementes de *Nigella sativa*, também abundante em *Monarda fistulosa* (bergamota-selvagem); a emodina, por sua vez, é uma antraquinona natural extraída de plantas como *Rheum officinale* e *Polygonum cuspidatum*; e o partenolideo é uma sesquiterpenolactona obtida das folhas da planta medicinal *Tanacetum parthenium*. A ampla diversidade desses metabólitos naturais com atividade antileucêmica oferece uma base importante para o avanço de pesquisas pré-clínicas e clínicas, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra a leucemia (Cotoraci et al., 2021).

As plantas da família Amaryllidaceae já forneceram mais de 636 alcaloides descritos, abrangendo tanto compostos estruturalmente caracterizados quanto aqueles identificados de forma preliminar. Em uma revisão recente, Lin e colaboradores (2025) organizaram nove grupos estruturais principais — incluindo crinina e haemanthamina — que compartilham um sistema unificado de numeração de esqueletos. Essa classificação é fundamental para o presente estudo, pois os alcaloides isolados testados aqui, Crinamina e Haemantidina, pertencem justamente a esses grupos estruturais (tipo crinano/haemanthamina), historicamente reconhecidos por abrigarem os compostos com maior potencial citotóxico da família.

A relevância desse perfil químico é corroborada por Trujillo e colaboradores (2023), que analisaram frações de alcaloides de Amaryllidaceae em linhagens tumorais. Além de observarem redução significativa da viabilidade celular (cerca de

48%) na linhagem gástrica AGS, a análise por molecular docking apontou interações relevantes com proteínas associadas à sobrevivência tumoral, como Mcl-1, Bcl-xL e HK2. Esses achados mecanísticos fornecem uma base molecular plausível para os resultados obtidos em nossa pesquisa: a potente atividade inibitória da Crinamina ($IC_{50} = 3,48\mu M$) e da Haemantidina sobre a linhagem leucêmica KG1 pode ser explicada pela capacidade desses esqueletos alcaloídicos de interagir com alvos de sobrevivência (como Mcl-1), induzindo a apoptose seletiva que observamos (IS > 287).

6. Conclusão

Em conclusão, o extrato do bulbo da planta *Ismene amancaes* bem como os alcaloides haemantidina e crinamina representam uma promissora área de pesquisa no combate ao câncer. Esses compostos não apenas exibem uma atividade anticancerígena *in vitro*, mas também demonstram seletividade na redução da proliferação células cancerígenas, oferecendo uma alternativa potencialmente menos tóxica e mais eficaz para a pesquisa de novos tratamentos contra leucemias.

Referências bibliográficas

- Bisht, A., Avinash, D., Sahu, K.K. et al. A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 15, 102–133 (2025). <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01648-0>
- Cedron, J.C.; Ravelo, Á.G.; León, L.G.; Padrón, J.M.; Estévez-Braun, A. (2015). Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules*, 20, 13854-13863. <https://doi.org/10.3390/molecules200813854>
- COTORACI, C. et al. The Anti-Leukemic Activity of Natural Compounds. *Molecules*, Basel, v. 26, n. 9, art. 2709, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26092709>
- Feher, M., Schmidt, J.M. (2003). Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43, 218–227. <https://doi.org/10.1021/ci0200467>
- GUO, M. et al. Research Advances on Anti-Cancer Natural Products. *Frontiers in Oncology*, Lausanne, v. 12, art. 866154, maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.866154>
- Havelek, R., Seifrtova, M., Kralovec, K., Bruckova, L., Cahlikova, L., Dalecka, M., Vavrova, J., Rezacova, M., Opletal, L., Bilkova, Z. (2014). The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, 21(4), 479-490. doi: 10.1016/j.phymed.2013.09.005
- Jayawardena, T.U., Merindol, N., Liyanage, N.S., Desgagné-Penix, I. (2024). Unveiling Amaryllidaceae alkaloids: from biosynthesis to antiviral potential—a review. *Natural Product Reports*. doi: 10.1039/d3np00044c
- Korlyukov, A.A., Stash, A.I., Romanenko, A.R., Trzybinski, D., Wozniak, K., Vologzhanina, A.V. (2023). Ligand-receptor interactions of Lamivudine: a view from charge density study and QM/MM calculations. *Biomedicines*, 11(3), 743. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030743>
- Kumar, S., et al. (2021). Recent advances in cancer therapeutics. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(3), 567-578.
- Lee, H.J., et al. (2022). Cellular selectivity of new anticancer drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 89(4), 665-677.
- LICHOTA, A.; GWOZDZINSKI, K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 19, n. 11, art. 3535, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19113535>. Acesso em: 23 nov. 2025.
- Lim, C.P., Yan, M.F., Asmawi, M.Z., Chin, V.K., Khairruddin, N.H., Yong, Y.K., Hassan, H., Basir, R. (2019). Cytostatic and antiproliferative activities of F5 fraction of *Crinum*

amabile leaf chloroform extract showed its potential as cancer chemotherapeutic agent. Evid-Based. Compl. Alt., 7521504. <https://doi.org/10.1155/2019/7521504>

LIN, G. D.; VISHWAKARMA, P.; SMITH, P. N.; LI, R. W. The Occurrence and Bioactivities of Amaryllidaceae Alkaloids from Plants: A Taxonomy-Guided Genera-Wide Review. Plants, Basel, v. 14, n. 13, art. 1935, jun. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants14131935>.

MARTINS DE PAIVA, M. J. et al. Antitumor evaluation of amaryllidaceae alkaloids on cancer cell lines: A literature review. Electronic Journal of General Medicine, [s. l.], v. 21, n. 1, art. em562, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.29333/ejgm/14040>.

Mohan, K., Jeyachandran, R., Deepa, S. (2012). Alkaloids as anticancer agents. Annals of Phytomedicine: Int. J., 1(1), 46-53.

NAEEM, A. et al. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. Molecules, Basel, v. 27, n. 23, art. 8367, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>

NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; VAN STADEN, J. In vivo Cytotoxicity Studies of Amaryllidaceae Alkaloids. Natural Product Communications, v. 11, n. 1, p. 121-132, 2016.

NAPO, K. V. et al. In vitro antiproliferative activity of Amaryllidaceae species against the K562 human leukaemia cell line. South African Journal of Botany, v. 135, p. 429–436, dez. 2020.

Newman, D.J., Cragg, G.M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. J. Nat. Prod., 83, 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.inatprod.9b01285>

Organização Mundial da Saúde (OMS). Câncer. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 Acesso em: 08/07/2024.

Peter, S.; Alven, S.; Maseko, R.B.; Aderibigbe, B.A. Doxorubicin-Based Hybrid Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review. Molecules 2022, 27, 4478. <https://doi.org/10.3390/molecules27144478>

Raj, L., et al. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. Nature, 475(7355), 231-234.

Rampersad, S.N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors, 12(9), 12347-12360.

Seber, G.A.F., & Wild, C.J. (2003). Nonlinear Regression. Wiley Series in Probability and Statistics.

Singh, A., Desgagné-Penix, I. (2014). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. Plant Sci. Today, 1(3), 114-120. Disponível em: <https://horizonepublishing.com/journals/index.php/PST/article/view/41>

SOTO-VÁSQUEZ, M. R. et al. Alkaloid Composition and Biological Activities of the Amaryllidaceae Species *Ismene amancaes* (Ker Gawl.) Herb. Plants, Basel, v. 11, n. 15, art. 1906, jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11151906>.

SUN, Z. G. et al. Recent Advances in Natural Products with Anti-Leukemia and Anti-Lymphoma Activities. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Sharjah, v. 24, n. 6, p. 664-671, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0113895575258798230927061557>

Tallini, L.R., et al. (2024). Methodologies for alkaloid extraction and identification in plant tissues. Journal of Natural Products Research, 38(2), 345-360.

TRUJILLO, H. et al. Chemical profile and biological properties of alkaloid-containing fractions from different Amaryllidaceae species. Plants, Basel, v. 12, n. 21, art. 3708, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12213708>.