

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

ISABELA DE OLIVEIRA TAQUES

**Avaliação da atividade anti-*Leishmania* sp do extratos de
Ismene amancaes, Família Amaryllidaceae**

Campo Grande
2024

ISABELA DE OLIVEIRA TAQUES

**Avaliação da atividade anti-*Leishmania* sp do extratos de
Ismene amancaes, Família Amaryllidaceae**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito necessário para o título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

Campo Grande
2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe Claudia Maria de Oliveira Taques, por ser essa guerreira que me dedicou todo amor, cuidado, apoio, colo e puxões de orelha que me trouxeram até aqui, obrigada por sentar comigo para estudar as mais diversas matérias, mesmo sem entender nada, por cada auxílio em casa para que eu pudesse descansar, por cada conversa sobre o futuro, por todo zelo que teve por mim ao longo desses 6 anos de graduação, sem você eu jamais teria conquistado tudo isso.

Ao meu pai, Amarildo Taques, por ser um homem batalhador que me sustentou a cada dia para que eu pudesse seguir o meu sonho, serei eternamente grata por tudo papito.

Ao meu irmão Amarildo Taques Junior, meu conselheiro, meu amigo, meu maninho, que sempre me incentivou a continuar no caminho mesmo com todas as pedras pela frente, obrigada por todas as conversas que tivemos, você sempre trouxe paz pro meu coração. A minha cunhada, Kellyn Teixeira Marinho, que me abraçou desde o primeiro dia ao lado do Junior, sempre se mostrou aberta a me ouvir e a ter uma boa amizade comigo, obrigada por cada momento de apoio também.

Agradeço ao meu namorado, Gabriel Silvino de Oliveira Venâncio, por suportar todo o caos nesse final de trajetória, por me dar tanto apoio e forças, além de ser um exemplo de pesquisador para mim, espero que possamos seguir nossos caminhos nessa jornada acadêmica até o fim.

As minhas amigas farmacêuticas, Ágatha Moslaves e Mariana Coelho, por terem me dado suporte durante os anos de curso e me incentivarem a concluí-lo com êxito, a faculdade se tornou muito mais leve ao lado de vocês.

Aos meus colegas de turma, aos meus calouros e aos meus veteranos, que fizeram da faculdade um lugar divertido, mesmo que com algumas brigas pelo caminho.

Aos meus professores, por me darem todo o conhecimento necessário para seguir essa linda profissão, por serem exemplo de doutores tão capacitados e inteligentes em seus diversos ramos de conhecimento.

Em especial, aos professores Saulo Euclides Silva Filho e Davi Campos La Gatta, por serem excelentes professores que fazem a farmacologia ser tão linda e interessante, além de serem exemplo de como um professor deve ser, será uma honra dividir a profissão com vocês.

A minha orientadora, Thalita Bachelli Riul, que assim como eu adora fazer parte de tudo quanto é organização e abraça o mundo para dar conta de tudo. Obrigada por aceitar esse projeto e segurar minha mão nesse momento mais importante da graduação, você é com certeza meu maior exemplo de profissional, e espero um dia ser tão boa no que faço como você.

Aos meus amigos de fora da faculdade, Bruna Borges Rosa Pires e Mateus da Silva Goulart, por me darem suporte dentre tanto caos que o início da vida adulta é, obrigada por cada noite de choro e por cada momento de alegria, é sempre um prazer estar junto de vocês.

Por fim, agradeço a cada pessoa que já passou pela minha vida e ajudou a moldar meu caráter, seja ele pessoal ou profissional, espero orgulhar a todos vocês.

RESUMO

É notório que as Leishmanioses fazem parte do quadro de doenças negligenciadas, tendo milhares de casos novos anualmente, em diversas regiões do mundo. As Leishmanioses são causadas por diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania* sp. e são comumente divididas em dois tipos, baseando-se nos órgãos que atingem, sendo elas: Leishmaniose Visceral, que acomete as víceras, como o baço, fígado e medula óssea; e a Leishmaniose Tegumentar, que atinge a pele e as mucosas. Os medicamentos atualmente utilizados como primeira escolha para o tratamento, os antimoniais pentavalentes, causam diversos efeitos adversos no paciente (problemas graves no coração, fígado, rins, e pâncreas). Como segunda escolha, temos a anfotericina B e a pentamidina, também responsáveis por reações adversas. Além de possuírem tais efeitos deletérios, os medicamentos têm alto custo, administração parenteral, longa duração, e já é relatado o aparecimento de cepas de parasitas resistentes. Neste contexto, a pesquisa de novos fármacos com atividade antileishmania é imprescindível, e os produtos naturais oferecem uma fonte de moléculas com rica diversidade estrutural e os mais diferentes efeitos terapêuticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*Leishmania* sp. *in vitro* de extratos do bulbo e das flores de *Ismene amancaes*, planta da família Amaryllidaceae, e de alcalóides descritos nesta família, por ensaios colorimétricos de viabilidade. Observou-se que o extrato dos bulbos reduziu a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* de forma mais efetiva do que o extrato das flores, apresentando também melhor seletividade frente a linhagem de fibroblastos NIH/3T3. Também foi observada atividade antileishmania seletiva nos alcalóides haemantidina e crinamina. Dessa forma, o desenvolvimento deste projeto possibilitou a triagem de produtos naturais com atividade antileishmania, dos quais futuramente podem ser investigadas novas moléculas ativas contra este parasito.

Palavras-chaves: Doenças Negligenciadas; Leishmaniose; Produtos Naturais

ABSTRACT

It is well known that leishmaniasis is one of the most neglected diseases, with thousands of new cases occurring every year in different regions of the world. Leishmaniasis are caused by different species of the protozoan genus *Leishmania* sp. and are commonly classified into two types based on the organs they affect: Visceral leishmaniasis, which affects the viscera such as the spleen, liver and bone marrow; and Tegumentary leishmaniasis, which affects the skin and mucous membranes. The drugs currently used as the first choice for treatment, pentavalent antimonials, cause various adverse effects in the patient (serious problems with the heart, liver, kidneys and pancreas). As a second choice, we have amphotericin B and pentamidine, which also cause adverse reactions. In addition to these adverse effects, these drugs are expensive to administer parenterally, take a long time to work, and there have already been reports of the emergence of resistant strains of parasites. In this context, the search for new drugs with anti-leishmanial activity is essential, and natural products offer a source of molecules with rich structural diversity and the most diverse therapeutic effects. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-*Leishmania* activity of extracts from the bulb and flowers of *Ismene amancaes*, a plant of the Amaryllidaceae family, and alkaloids described in this family, using colorimetric viability assays. It was observed that the bulb extract reduced the viability of promastigote forms of *Leishmania amazonensis* more effectively than the flower extract and also showed better selectivity against the NIH/3T3 fibroblast strain. Selective anti-leishmanial activity was also observed in the alkaloids hemantidine and crinamine. Thus, the development of this project has allowed the screening of natural products with anti-leishmanial activity, from which new molecules active against this parasite can be investigated in the future.

Keywords: Neglected Diseases; Leishmaniasis; Natural Products

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. METODOLOGIA	12
3.1. Material vegetal e preparação dos extratos	12
3.2. Manutenção de <i>Leishmania amazonensis</i>	12
3.3. Atividade antipromastigota	13
3.4. Avaliação da citotoxicidade em células do hospedeiro	13
3.5. Análise dos resultados	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5. CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um crescente problema de saúde pública no Brasil e são consideradas como endemia de interesse prioritário, atingindo também grande parte do continente americano, asiático, europeu e africano. As leishmanioses afetam em torno de 12 milhões de pessoas e estão presentes em 88 países, principalmente em áreas tropicais e subtropicais. As regiões endêmicas revelam a importância desta doença negligenciada, apresentando um total de 350 milhões de pessoas vivendo nessas áreas e cerca de 2 milhões de novos casos por ano (COSTA et al, 2005; GRIMALDI e TESH, 2003).

Embora *Leishmania* tenha sido descoberta pela primeira vez na Índia, o parasita encontra-se em diversos outros países do mundo. Em 2018, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, 94% dos novos casos ocorreram em sete países: Brasil, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Etiópia e Sudão. A doença é endêmica em 88 países, dos quais 72 são categorizados como países em desenvolvimento. A Leishmaniose Visceral (LV) ocorre mais prevalentemente na Índia, Nepal, Sudão, Brasil e Bangladesh, enquanto 91% da Leishmaniose Cutânea (LC) está concentrada no Afeganistão, Irã, Síria, Brasil, Arábia Saudita e Peru. No caso da Leishmaniose Mucocutânea (LMC), 90% dos casos ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Peru e Brasil (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

O vetor que leva a transmissão são os insetos hematófagos, os flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, mas dependendo da região também pode possuir outros nomes como birigui, palhinha, asa branca, asa dura, tatuquira e cangalinha. O mosquito palha, pode apresentar coloração amarelada ou acinzentada, e seu tamanho pode ser de 2 a 3 mm. O ciclo de vida do parasita envolve duas formas principais: a promastigota e a amastigota. No interior do inseto vetor, o parasita se encontra na forma promastigota, flagelada e adaptada para viver no intestino do mosquito. Durante a picada, os promastigotas são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado, onde são fagocitados por macrófagos. Dentro dessas células, os parasitas se transformam em amastigotas, formas arredondadas e sem flagelo, que se multiplicam ativamente (MANN et al., 2021; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

A transmissão da leishmaniose é complexa e envolve diversos fatores, como a espécie de *Leishmania*, o vetor, o hospedeiro vertebrado e as condições ambientais. Animais domésticos, como cães, desempenham um papel importante como reservatórios da doença em muitas regiões. Além disso, a coinfeção com outros patógenos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), pode influenciar a progressão da leishmaniose. A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel crucial na evolução da doença. A produção de diferentes tipos de células T (TH1 e TH2) pode influenciar a forma como a infecção se manifesta. Indivíduos com uma resposta TH1 tendem a desenvolver lesões cutâneas localizadas, enquanto aqueles com uma resposta predominantemente TH2 podem apresentar formas mais disseminadas da doença, como a leishmaniose visceral (MANN et al., 2021).

As leishmanioses podem ser divididas em dois tipos, de acordo com os órgãos que acometem: Leishmaniose Tegumentar (LT), que acomete a pele e mucosas, tendo como principais sintomas a aparição de elevações na pele, conhecidas como pápulas, que vão aumentando conforme a evolução da doença, criando secreção purulenta e crostas; e a Leishmaniose Visceral (LV), que acomete as vísceras, principalmente baço, fígado e medula óssea, causando os sintomas de anemia, febre, palidez de mucosas, inchaço no abdômen e perda de peso. Atualmente, são conhecidas aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem, sendo que *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são os principais agentes causadores de LT no Brasil. No Estado de Mato Grosso do Sul, a LT é considerada endêmica (BRASIL, 2017), com notificação de 145 casos de 2006 a 2015, sendo 138 apenas em 2015 (DORVAL et al., 2006; CASTRO et al., 2016).

O diagnóstico das leishmanioses é realizado por meio de uma combinação de métodos clínicos, parasitológicos e imunológicos. O diagnóstico clínico é baseado na presença de lesões cutâneas características, como úlceras ou nódulos. O diagnóstico parasitológico envolve a identificação do parasita em lesões de pele ou outros tecidos por meio de microscopia ou cultura. O diagnóstico imunológico se baseia na detecção de anticorpos ou respostas imunes mediadas por células contra o parasita. Testes diagnósticos específicos incluem exame direto de esfregaço, biópsia, cultura e testes sorológicos. O diagnóstico precoce e preciso é crucial para o tratamento eficaz e a prevenção

da progressão da doença (BRASIL, 2017).

O tratamento atual da leishmaniose é baseado em compostos de antimônio pentavalente, que incluem o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam® - não usado no Brasil). Os antimoniais pentavalentes (SbV) são os medicamentos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose há quase sete décadas. O SbV funciona como um pró-fármaco que é reduzido dentro do organismo para a forma ativa SbIII, um íon metálico com alta afinidade por ligantes contendo nitrogênio e enxofre. Os mecanismos antileishmaniais do SbIII provavelmente estão relacionados à sua interação com biomoléculas contendo enxofre, incluindo tiois, peptídeos, proteínas e enzimas. Embora eficazes, o uso desses compostos é muitas vezes limitado pela necessidade de administração parenteral diária, toxicidade grave e efeitos colaterais, além de falhas no tratamento. Estes compostos são amplamente prescritos apesar de seus efeitos adversos graves no coração, rim, pâncreas e fígado, além de possuírem alto custo, dificuldade de administração e desenvolvimento de resistência parasitária (ROATT et al., 2020).

Como segunda escolha são utilizadas anfotericina B (BANDHARI et al, 2014; STOCKDALE et al, 2013; RATH et al, 2003). A Anfotericina B desoxicolato (AmB-D) é um antifúngico de amplo espectro ativo contra o protozoário *Leishmania*. Após a perda de eficácia dos antimoniais na Índia, a AmB-D tornou-se o medicamento de primeira linha para a leishmaniose visceral (LV). Este fármaco se liga ao ergosterol, um componente da membrana celular do parasita, formando poros que levam à morte celular. No entanto, a AmB-D apresenta efeitos colaterais significativos, incluindo nefrotoxicidade, febre e arritmias cardíacas. Para minimizar esses efeitos adversos, foram desenvolvidas formulações lipídicas da anfotericina B, como a anfotericina B lipossomal (AmB-L). A AmB-L é mais segura e eficaz, porém, seu alto custo limita seu uso em muitos países. Embora a AmB-D e a AmB-L sejam eficazes contra a leishmaniose cutânea, seu uso é geralmente reservado para casos graves ou resistentes a outros tratamentos devido aos riscos de toxicidade. É prioridade que se tenha o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas que possam contar com melhor custo-benefício e comodidade para o paciente (ROATT et al., 2020).

A pentamidina, a paromomicina e a miltefosina, embora sejam alternativas

aos antimoniais pentavalentes no tratamento da leishmaniose, apresentam limitações significativas. A pentamidina, por exemplo, causa efeitos colaterais graves como hipotensão e nefrotoxicidade, além de ter eficácia variável. A paromomicina, por sua vez, pode causar nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade, além de haver relatos de resistência parasitária. A miltefosina, apesar de eficaz, causa efeitos colaterais gastrointestinais severos e é um medicamento caro. Assim, a escolha do tratamento ideal para a leishmaniose é complexa e deve levar em consideração diversos fatores, como o tipo de leishmaniose, a gravidade da doença, a presença de comorbidades e a tolerância individual a cada medicamento. A pesquisa contínua na área busca identificar novas drogas com maior eficácia e menor toxicidade (BANDHARI et al, 2014; ROATT et al., 2020; STOCKDALE et al, 2013).

Muitas plantas têm sido estudadas como possíveis fontes de novos medicamentos, e os produtos naturais ainda são um excelente ponto de partida para essas pesquisas pela indústria farmacêutica, como apontado por Harvey e colaboradores (2015) em um artigo científico publicado em Nature Reviews Drug Discovery. Os fitocompostos bioativos derivados de plantas, como extratos brutos, óleos essenciais e outros compostos são uma ótima fonte na descoberta e produção de novos medicamentos com ação antileishmania (ORYAN, 2015). No Brasil, grande parte das pesquisas fitoquímicas e farmacológicas visam comprovar conhecimento popular sobre plantas medicinais, e a partir disso é feito o estudo e o isolamento de substâncias ativas, possibilitando a identificação e posteriormente a descobertas de novos fármacos (SOUZA, 2013).

A família Amaryllidaceae está presente em abundância na América Latina, devido a suas regiões tropicais e subtropicais, aparece fortemente em países como Peru, Chile e Brasil. A família Amaryllidaceae é amplamente reconhecida por sua riqueza química, especialmente pelos alcaloides isoquinolínicos exclusivos, que possuem diversas propriedades farmacológicas. Uma planta de destaque dessa família é a *Ismene amancaes*, planta bulbosa que tende a crescer em regiões de altitude, cuja relevância se estende ao combate a doenças parasitárias, como a leishmaniose. (SUNI, M.L., et al 2011.)

Um estudo recente investigou o potencial bioativo da planta *Ismene amancaes*, uma espécie endêmica do Peru (SOTO-VÁSQUEZ et al., 2022). A pesquisa se concentrou em sua atividade contra o parasita da malária,

Plasmodium falciparum, e sua capacidade de inibir as enzimas colinesterases, relacionadas à doença de Alzheimer. Os resultados indicaram que o extrato bruto de bulbos de *I. amancaes* apresentou significativa atividade antiplasmodial. Além disso, o extrato mostrou potencial inibitório das enzimas AChE e BuChE, envolvidas na degradação do neurotransmissor acetilcolina, que desempenha um papel crucial na memória e cognição (SOTO-VÁSQUEZ, et al., 2022). A presença de alcaloides no extrato de *I. amancaes* é considerada um fator importante para suas atividades biológicas. Esses compostos naturais têm sido objeto de estudo devido ao seu potencial terapêutico em diversas doenças (EVIDENTE, 2023).

Os resultados destes estudos sugerem que a *Ismene amancaes* pode ser uma fonte promissora de novos compostos bioativos com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos contra a malária e a doença de Alzheimer. No entanto, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos de ação dos compostos ativos e para avaliar sua segurança e eficácia em modelos animais e humanos.

Considerando a necessidade da busca de novos ativos antileishmania e os relatos da literatura a respeito das atividades biológicas de plantas da família Amaryllidaceae, incluindo *Ismene amancaes*, este trabalho teve como objetivo investigar a possível atividade dos extratos de *I. amancaes* contra este parasito.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*Leishmania* sp de extratos brutos do bulbo e flor da planta *Ismene amancaes* e de alcalóides presentes em plantas da Família Amaryllidaceae, por ensaios colorimétricos de viabilidade com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade de diferentes concentrações de extrato do bulbo e das flores de *Ismene amancaes* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* por ensaio colorimétrico de viabilidade;

- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos de sobre células de linhagem de camundongo (fibroblastos murinos NIH/3T3).
- Obter as concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) dos extratos nas diferentes células, bem como seu índice de seletividade.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal e preparação dos extratos

Os extratos brutos dos bulbos (IAB) e das flores (IAF) da planta *Ismene amancaes* foram preparados e gentilmente cedidos pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo. Brevemente, os bulbos e as flores frescos foram secos em estufa para facilitar a trituração. O material triturado foi então submetido a três ciclos de maceração utilizando metanol como solvente. O metanol, por sua polaridade, é capaz de extrair uma ampla variedade de compostos, incluindo os alcaloides de interesse. Após cada ciclo, o extrato líquido foi filtrado para separar o material sólido. Em seguida, o solvente foi evaporado a vácuo, resultando em um extrato bruto seco, pronto para análises químicas e testes biológicos (FEU, 2024). Os alcaloides haemantidina, crinamina e derivado de haemantidina foram obtidos por extração ácido-base, isolados e purificados 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 e dos alcaloides 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.

3.2. Manutenção de *Leishmania amazonensis*

Nos experimentos foi utilizada a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/1967/PH8). Formas promastigotas dos parasitos foram cultivadas com repiques semanais em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich/EUA), contendo soro bovino fetal a 20% (Cultilab/Brasil), 10 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich/EUA) em tubos de cultura estéreis a 26°C. Formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase

logarítmica de crescimento foram utilizadas para os experimentos *in vitro*.

3.3. Atividade antipromastigota

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/1967/PH8) em meio Schneider devidamente suplementado foram distribuídos em placas de 96 poços (1×10^5 células por poço) nas condições padronizadas, contendo os extratos nas concentrações de 1000 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$. Já os alcaloides haemantidina, seu derivado e a crinamina foram testados nas concentrações de 1000 a 1,56 μM . As placas são incubadas por 48 horas a 26°C, e após esse período, 5 μL de uma solução de resazurina (Sigma-Aldrich/EUA) a 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram adicionados a cada poço, seguido de mais 4 horas de incubação a 26°C. A avaliação da viabilidade celular foi feita por espectrofotometria após leitura das absorbâncias de cada poço em 570 e 600 nm. A porcentagem de viabilidade para cada concentração de extrato foi calculada em relação ao controle de vida (CV) contendo somente com meio. O controle positivo de morte foi feito com anfotericina B (ANFB), de 2 a 0,03 μM .

3.4. Avaliação da citotoxicidade em células do hospedeiro

Células da linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de camundongo) cultivadas em em meio RPMI (Sigma-Aldrich/EUA), contendo soro bovino fetal a 10% (Cultilab/Brasil), 10 UI/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich/EUA) foram distribuídas (1×10^4 células por poço) em placas de 96 poços, e incubadas até o dia seguinte a 37°C e 5% de CO_2 para aderência. No dia seguinte, o meio dos poços foi substituído por meio contendo os extratos ou os alcaloides nas concentrações de 1000 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$. As placas são incubadas por 48 horas a a 37°C e 5% de CO_2 , e após esse período a avaliação da viabilidade foi feita por espectrofotometria pelo método da resazurina (Sigma-Aldrich/EUA). A porcentagem de viabilidade para cada concentração de extrato foi calculada em relação ao controle de vida (CV) somente com meio. O controle de morte celular com anfotericina B (ANFB) de 100 a 1,56 μM também foi feito.

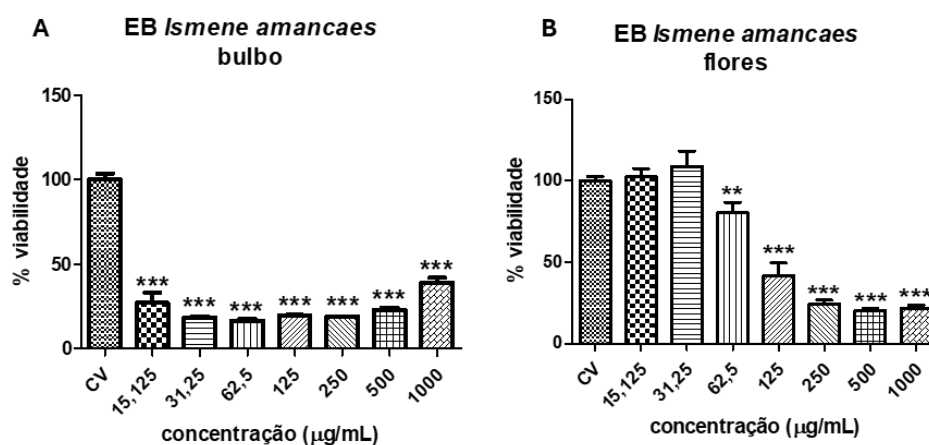
3.5. Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. Quando necessário comparar variâncias, foi utilizado 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 CI50 e CC50 foi feita uma regressão não linear dos resultados obtidos, e o índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão de CC50 por CI50.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade antileishmania dos diferentes extratos de *Ismene amancaes*, as amostras foram diluídas em meio Schneider devidamente suplementado, com concentrações variando de 15,625 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, e incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas a 26°C. Após esse período, a viabilidade das células foi avaliada por espectrofotometria pelo método da resazurina, e os resultados estão na Figura 1.

Figura 1: Atividade antileishmania dos extratos de *Ismene amancaes*.



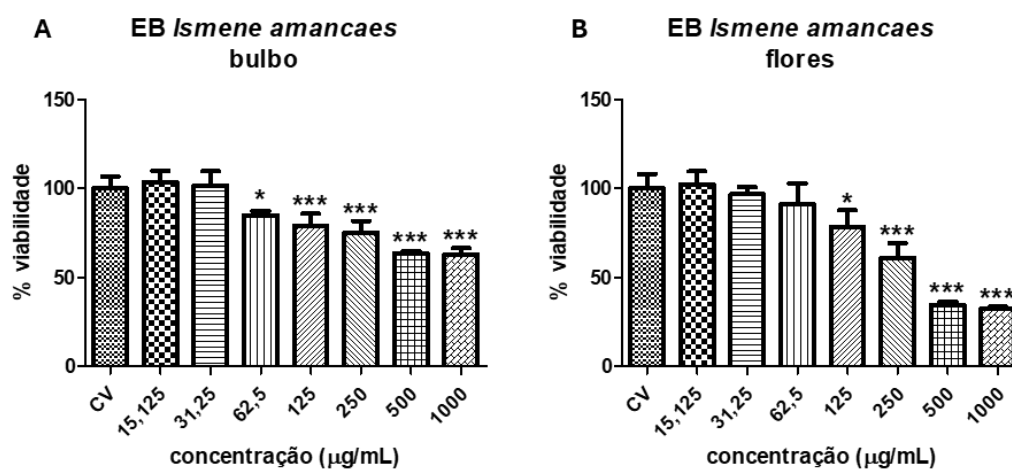
Diferentes extratos da planta foram incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – extrato bruto (EB) dos bulbos e B – EB das flores. ** e *** significam $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Podemos observar que tanto o extrato bruto (EB) do bulbo como das flores de *I. amancaes* reduziram a viabilidade das formas promastigotas nas concentrações testadas em relação ao controle de viabilidade (CV, apenas

parasitos com meio de cultura). No entanto, essa redução da viabilidade foi mais evidente para a amostra do EB do bulbo. O EB das flores também reduziu a viabilidade dos parasitos nas condições testadas, porém em menor grau.

Os extratos de *I. 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 µg/mL) em meio RPMI devidamente suplementado por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, a viabilidade das células também foi avaliada pelo método da resazurina, e os resultados estão ilustrados na Figura 2. Podemos observar que ambos os extratos foram citotóxicos de forma dose dependente para as células NIH/3T3, porém em menor grau do que o observado para os parasitos.

Figura 2: Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Ismene amancaes*.



Extrato bruto (EB) do bulbo e EB 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 $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos de atividade antileishmania 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 (CI50 e CC50, respectivamente). Além disso, o índice de seletividade de cada amostra foi calculado a partir dos resultados obtidos para CI50 e CC50. 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} promastigotas <i>L. amazonensis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de seletividade (IS)
EB <i>I. amancaes</i> bulbo	1,02	119,00	116,67
EB <i>I. amancaes</i> flores	97,30	166,40	1,71
ANFB	0,04	39,31	982,8

CI_{50} : concentração inibitória de 50% nas células promastigotas; CC_{50} : concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC_{50} e CI_{50} ; ANFB: anfotericina B (em μM).

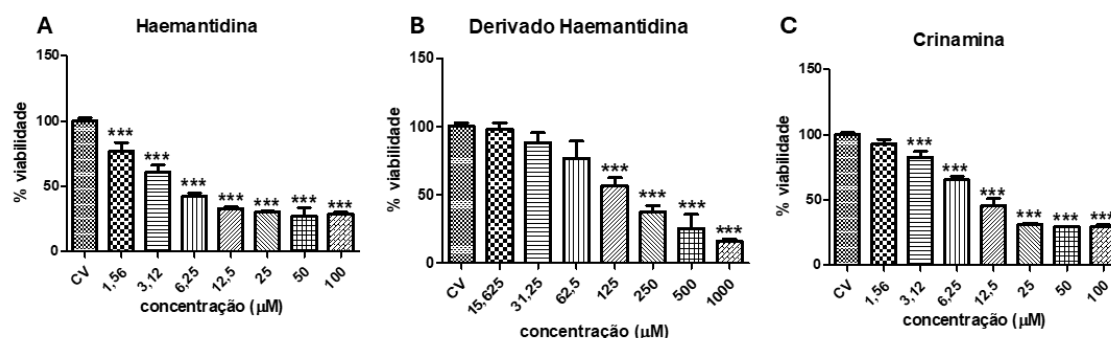
Observando os resultados das Figuras 1 e 2 e da Tabela 1, podemos notar que as amostras de *I. amancaes* reduziram de forma significativa e dose dependente a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* nas condições testadas. No entanto, para o EB dos bulbos, a CI_{50} obtida foi cerca de 95 vezes menor em relação à CI_{50} do EB das flores (1,02 e 97,30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Ou seja, EB dos bulbos apresentou maior atividade antileishmania em relação a EB das flores.

Considerando a citotoxicidade das amostras frente às células NIH/3T3, ambas amostras apresentaram citotoxicidade dose-dependente, sendo que EB das flores apresentou CC_{50} cerca de 1,4 vezes maior que EB dos bulbos (166,40 e 119,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Isso significa que o EB das flores foi ligeiramente mais tóxico para os fibroblastos do que EB dos bulbos. Já o índice de seletividade (IS) de cada extrato foi obtido pela razão da CC_{50} pela CI_{50} de cada amostra, e encontra-se na Tabela 1. Quanto maior o IS, maior a seletividade de uma amostra em reduzir a viabilidade da célula dos parasitos do que das células de mamíferos testadas. Dessa forma, a amostra EB dos bulbos foi a que apresentou maior seletividade em relação a EB das flores (IS 116,67 e 1,71, respectivamente). É interessante observar também os resultados obtidos para a anfotericina B, fármaco de segunda escolha para o tratamento de leishmanioses: apesar de bastante tóxica para as células da linhagem NIH/3T3 (CC_{50} de 39,31 μM), esta é bastante ativa contra o parasito (CI_{50} de 0,04 μM), o que se reflete num IS de 982,8. Esse resultado pode variar bastante de acordo com as cepas de *Leishmania*, as linhagens celulares e as condições usada em cada experimento. Apesar de se tratar de um experimento *in vitro*, os efeitos tóxicos da anfotericina B para os pacientes são bem conhecidos (MAGRI, 2023).

A atividade antileishmania de alguns alcalóides encontrados em plantas

da família Amaryllidaceae também foi testada. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas por 48 horas com diferentes concentrações dos alcalóides haemantidina, um derivado da haemantidina e a crinamina, e os resultados encontram-se na Figura 3.

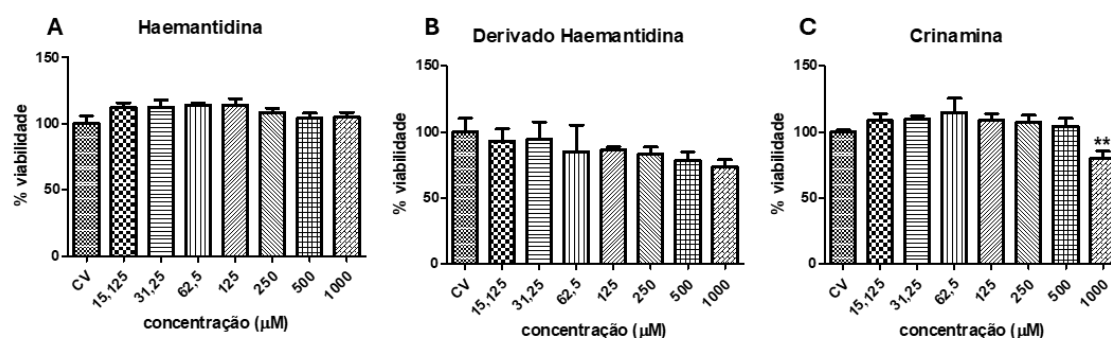
Figura 3: Atividade antileishmania de alcalóides da Família Amaryllidaceae.



Diferentes concentrações dos alcalóides foram incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – haemantidina, B – seu derivado e C - crinamina. *** significam p<0,01 e p<0,001, respectivamente. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

A citotoxicidade dos alcalóides em células NIH/3T3 também foi analisada por 48 horas, nas mesmas condições que os extratos de *I. amancaes*, e os resultados encontram-se na Figura 4.

Figura 4: Avaliação da citotoxicidade dos alcalóides da Família Amaryllidaceae.



Diferentes concentrações dos alcalóides foram incubados com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – haemantidina, B – seu derivado e C - crinamina. ** significa p<0,01 (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

As CI_{50} e CC_{50} dos alcalóides também foi calculada, assim como os respectivos índices de seletividade (IS):

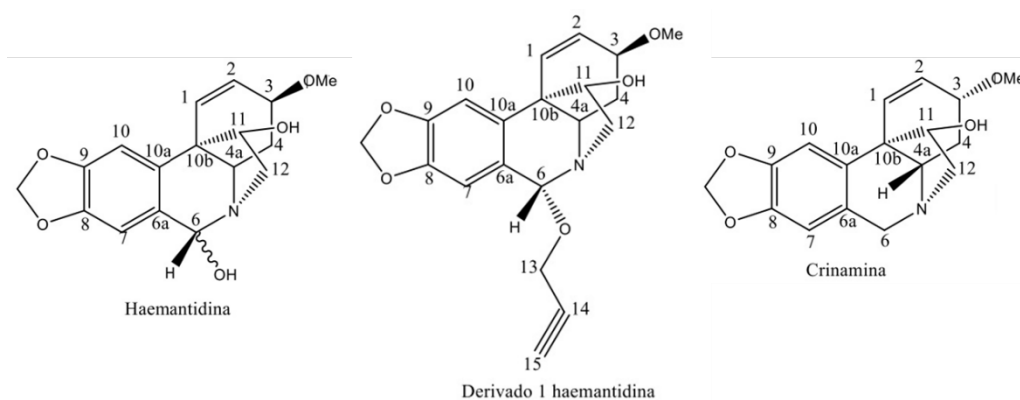
Tabela 2: Resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade das amostras de alcalóides da Família Amaryllidaceae

Alcalóide	CI_{50} promastigotas L. amazonensis ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	3,08	>1000	>263,16
Derivado Haemantidina	118,4	>1000	>8,45
Crinamina	5,81	>1000	>172,12
ANFB	0,04	39,31	982,8

CI_{50} : concentração inibitória de 50% nas células promastigotas; CC_{50} : concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC_{50} e CI_{50} ; ANFB: anfotericina B (em μM).

As estruturas químicas dos alcalóides haemantidina, seu derivado e a crinamina encontram-se na Figura 5.

Figura 5: Alcalóides presentes na família Amaryllidaceae utilizados neste estudo



É interessante notar que tanto haemantidina como crinamina tiveram boa atividade antileishmania e bom índice de seletividade, conforme os resultados da Tabela 2. Porém o alcaloide derivado de haemantidina, com a cadeia de 3 carbonos (carbonos 13, 14 e 15) diminuiu consideravelmente a atividade contra *Leishmania*, aumentando mais de 20 vezes a CI_{50} deste composto em relação aos demais alcalóides.

Um estudo recente investigou o perfil químico e o potencial biológico da planta *Ismene amancaes*, utilizando análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), foram identificados 13 compostos alcalóides no extrato de bulbos da planta, sendo dois deles desconhecidos (SOTO-VÁSQUEZ et al., 2022). Um dos alcalóides identificados foi a licoramina, um composto estruturalmente relacionado à galantamina, uma droga utilizada no tratamento da doença de Alzheimer. Além disso, o extrato de *I. amancaes*

apresentou atividade antiparasitária contra o *Plasmodium falciparum*, o parasita causador da malária. Os resultados deste estudo sugerem que a *Ismene amancaes* é uma fonte potencial de novos compostos bioativos com propriedades antiparasitárias e anticolinesterásicas. No entanto, são necessários estudos adicionais para investigar o mecanismo de ação desses compostos e para avaliar sua segurança e eficácia em modelos animais e humanos.

Já outro estudo recente revisou as atividades biológicas dos alcaloides presentes na família Amaryllidaceae, que representa uma fonte inestimável de compostos bioativos, especialmente alcaloides, com um amplo espectro de atividades farmacológicas. (EVIDENTE, 2023). Diversas espécies nativas da América do Sul, como *Habranthus*, *Phycella*, *Rhodophiala*, *Zephyranthes*, *Caliphruria*, *Hippeastrum*, *Rhodolirium*, *Crinum*, *Amaryllis*, *Pyrolirion* e *Ismene*, têm sido objeto de estudos fitoquímicos devido ao seu potencial terapêutico. As espécies de Amaryllidaceae investigadas revelaram um perfil químico rico em alcaloides como licorina, galantamina, haemantamina, vittatina, tazettina, pancratina, montanina e outros. Esses compostos demonstram uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo antiparasitária, neuroprotetora, antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana (EVIDENTE, 2023).

Apesar do grande potencial, a exploração das Amaryllidaceae ainda enfrenta desafios, como a complexidade da matriz química dessas plantas, a dificuldade de isolamento e purificação dos compostos ativos, e a necessidade de estudos pré-clínicos e clínicos.

No futuro, espera-se que a pesquisa nessa área continue a avançar, com o desenvolvimento de novas metodologias para a descoberta e caracterização de compostos bioativos, a otimização de processos de extração e purificação, e a realização de estudos clínicos para avaliar a eficácia e segurança de novos fármacos derivados de plantas da família Amaryllidaceae. No caso de atividade antileishmania, estudos futuros devem elucidar as principais moléculas ativas nos extratos de *Ismene amancaes*, em especial no seu bulbo. Tanto para os extratos como para os alcaloides, a investigação de atividade contra amastigotas intracelulares será um importante modelo a ser usado no aprofundamento deste estudo.

5. CONCLUSÃO

O estudo da *Ismene amancaes* contra *Leishmania in vitro* destaca a importância de explorar a biodiversidade da família Amaryllidaceae para fins terapêuticos. A combinação de técnicas de isolamento químico, análises estruturais e ensaios biológicos permite aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos alcaloides e impulsiona a pesquisa de novos medicamentos baseados em produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHANDARI, Vasundhra et al. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 2580-2585, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Brasília: Ministério da Saúde, 2 ed, p. 462-476, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

CASTRO, L. S. et al. *Leishmania infantum* AS A CAUSATIVE AGENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE STATE OF MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 58, p. 23, 2016.

CESÁRIO, F. R. A. S. et al. Phytochemical profile and mechanisms involved in the anti-nociception caused by the hydroethanolic extract obtained from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum (Jenipapo-bravo) leaves in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 97, p. 321–329, jan. 2018.

COELHO, V. P. DE M.; AGRA, M. DE F.; BARBOSA, M. R. DE V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, jun. 2006.

COSTA, Jackson Mauricio Lopes et al. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. 2005.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*, v. 63, n. 1, p. 101–128, mar. 2012.

DORVAL, M. E. et al. [Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 1, p. 43-6, Jan-Feb 2006.

EVIDENTE, A. Advances on the Amaryllidacea Alkaloids Collected in South Africa, Andean South America and the Mediterranean Basin. *Molecules*, v. 28, n. 10, p. 4055, 12 maio 2023.

FERREIRA JUNIOR, M.; VIEIRA, A. O. S. Espécies arbóreo-arbustivas da família Rubiaceae Juss. na bacia do rio Tibagi, PR, Brasil. *Hoehnea*, v. 42, n. 2, p. 289–336, jun. 2015.

FEU, A. Identificação de alcaloides em extratos de espécies de Amaryllidaceae através da técnica de CL-EM suportada por estratégia de rede molecular e avaliação da atividade antiparasitária Identification of alkaloids in Amaryllidaceae species extracts through the technique of CL-EM supported by molecular network strategy and assessment of antiparasitic activity. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em: <<https://repositorio.ufes.br/server/api/core/bitstreams/087da227-cd8f-4314-acdc-87e0b209e902/content>>. Acesso em: 1 dez. 2024.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, v. 14, n. 2, p. 111-29, Feb 2015. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25614221> >.

MAGRI, Marcello Mihailenko Chaves et al. PERFIL DE SEGURANÇA APÓS EXPOSIÇÃO À DIFERENTES FORMULAÇÕES DE ANFOTERICINA B EM 1879 PACIENTES COM INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA (IFI): ESTUDO OBSERVACIONAL BRASILEIRO. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, p. 103311, 2023.

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 8, n. 2, p. 121–132, 17 mar. 2021.

OLMEDO, D. et al. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. *Natural Product Research*, v. 21, n. 7, p. 625–631, jun. 2007.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian journal of veterinary research*, 16(1). 2015

RATH, Susanne et al. Antimoniais empregados no tratamento da

leishmaniose: estado da arte. Química Nova, 2003.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2 set. 2020.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? Parasitology Research, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 7 abr. 2021.

SOTO-VÁSQUEZ et al. Alkaloid Composition and Biological Activities of the Amaryllidaceae Species *Ismene amancaes* (Ker Gawl.) Herb. Plants, v. 11, n. 15, p. 1906–1906, 22 jul. 2022.

SOUZA, Renata Kelly Dias; MENDONÇA, Ana Cleide Alcantara Morais; PESSOA DA SILVA, Maria Arlene. Aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de especies de Rubiaceae em Brasil. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

STOCKDALE, Lisa; NEWTON, Robert. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. PLoS neglected tropical diseases, v. 7, n. 6, p. e2278, 2013.

SUNI, M.L.; PASCUAL, E.; JARA, E.; et al. Desarrollo reproductivo del “amancay” *Ismene amancaes* (Amaryllidaceae) en su ambiente natural
Reproductive development of “amancay” *Ismene amancaes* (Amaryllidaceae) in its natural environment. vol. 18. 2011.

VALLI, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. The Invisible Beauty of the Biodiversity: The Rubiaceae Taxon. Revista Virtual de Química, v. 8, n. 1, 2016.