

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CARLOS FELIPE PERALTA DA CRUZ

**Avaliação do efeito antitumoral de extratos e alcalóides
de *Habranthus robustus* em linhagens tumorais**

Campo Grande
2024

CARLOS FELIPE PERALTA DA CRUZ

**Avaliação do efeito antitumoral de extratos e alcalóides
de *Habranthus robustus* em linhagens tumorais**

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

Orientadora: Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

Campo Grande

2024

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os meus familiares e amigos que, ao longo dessa jornada, jamais me permitiram desistir dos meus sonhos. Dedico principalmente aos meus pais, que a cada suor derramado sob o sol, me fizeram chegar até aqui na sombra. Dedico também à minha irmã, que nunca permitiu que o brilho dos meus olhos fosse ofuscado. Agradeço de coração por estarem comigo.

RESUMO

O câncer é uma doença heterogênea caracterizada por multiplicação celular descontrolada, com capacidade de invadir outros tecidos e comprometer funções do organismo. No Brasil, os tipos mais prevalentes incluem o câncer de pele não melanoma, pulmão, mama, colorretal e leucemias, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). O presente estudo avaliou a atividade antitumoral *in vitro* do extrato bruto de bulbos e folhas, além dos alcaloides haemantidina e seu derivado, isolados de *Habranthus robustus*, frente às linhagens celulares KG1 (leucemia mieloide aguda), K562 (leucemia mieloide crônica) e B16F10 (melanoma metastático). Os extratos e alcaloides foram preparados pelo Departamento de Química da UFES, enviados para UFMS onde foram diluídos em DMSO e testados nas linhagens cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina e estreptomicina. As células foram tratadas com concentrações de 1000 a 1,56 µg/ml, e a viabilidade celular foi medida por espectrofotometria (570 nm) utilizando resazurina. A doxorrubicina (0,078 a 5 µM) foi usada como controle positivo de morte e a linhagem NIH/3T3 (Fibroblasto Murino) como controle de células saudáveis. Ensaio em quadruplicata foram analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey, adotando nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que o extrato de bulbos apresentou maior atividade antitumoral, especialmente contra KG1 (IC₅₀=14,79 µg/ml; IS=4,13). A haemantidina exibiu eficácia contra KG1 (IC₅₀=6,80 µg/ml; IS=147,03), enquanto seu derivado foi mais ativo contra K562 (IC₅₀=358,10 µg/ml; IS=2,56). Conclui-se que *H. robustus* possui moléculas bioativas com potencial antitumoral. Estudos futuros devem focar no isolamento e caracterização dessas substâncias, além de expandir os ensaios para outras linhagens tumorais, visando o desenvolvimento de novas terapias anticâncer.

Palavras-Chaves: Linhagem Celular Tumoral; Carcinogênese; Alcaloides de Amaryllidaceae; Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais.

ABSTRACT

Cancer is a heterogeneous disease characterized by uncontrolled cell proliferation, with the ability to invade other tissues and compromise body functions. In Brazil, the most prevalent types include non-melanoma skin, lung, breast, colorectal cancer and leukemia, according to the National Cancer Institute (INCA). The present study evaluated the in vitro antitumor activity of the crude extract of bulbs and leaves, in addition to the haemantidine alkaloids and its derivative, isolated from *Habranthus robustus*, against the cell lines KG1 (acute myeloid leukemia), K562 (chronic myeloid leukemia) and B16F10 (metastatic melanoma). The extracts and alkaloids were prepared by the Chemistry Department of UFES, sent to UFMS where they were diluted in DMSO and tested on the cell lines grown in RPMI medium supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin and streptomycin. Cells were treated with concentrations of 1000 to 1.56 $\mu\text{g/ml}$, and cell viability was measured by spectrophotometry (570 nm) using resazurin. Doxorubicin (0.078 to 5 μM) was used as a positive control for death and the NIH/3T3 cell line (murine fibroblast) as a control for healthy cells. Quadruplicate assays were analyzed by ANOVA and Tukey's post-test, adopting a significance level of 5%. The results demonstrated that the bulb extract showed greater antitumor activity, especially against KG1 ($\text{IC}_{50}=14.79 \mu\text{g/ml}$; $\text{IS}=4.13$). Haemantidine showed efficacy against KG1 ($\text{IC}_{50}=6.80 \mu\text{g/ml}$; $\text{IS}=147.03$), while its derivative was more active against K562 ($\text{IC}_{50}=358.10 \mu\text{g/ml}$; $\text{IS}=2.56$). It is concluded that *H. robustus* possesses bioactive molecules with antitumor potential. Future studies should focus on the isolation and characterization of these substances, in addition to expanding the tests to other tumor cell lines, aiming at the development of new anticancer therapies.

Keywords: Tumor Cell Line; Carcinogenesis; Amaryllidaceae alkaloids; Antitumor Drug Screening Trials.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
2.1 A CARCINOGENESE.....	8
2.2 OS ESTUDOS IN VITRO.....	9
2.3 AS LINHAGENS TUMORAIS	9
2.3.1 LINHAGEM KG1	9
2.3.2 LINHAGEM K562	10
2.3.3 LINHAGEM B16F10	10
2.4 OS FITOQUÍMICOS.....	10
2.5 A AMARYLIDACEAE.....	11
3. JUSTIFICATIVA	12
4. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. METODOLOGIA	13
4.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	13
4.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL	14
4.3 CITOTOXICIDADE	14
4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	14
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde, o câncer é um crescimento rápido e descontrolado de células anormais além do seu limite habitual e que tem capacidade de invadir partes do corpo e espalhar-se para órgãos, originando a metástase. Acredita-se que até 2050 haja 35 milhões de novos casos de câncer (OPAS., 2024). O câncer de pulmão é o mais comum, com 2,5 milhões de novos casos em 2022, seguido do câncer de mama (2,3 milhões), colorretal (1,9 milhões) e próstata (1,5 milhões), representando os principais tipos documentados (OPAS., 2024). Além disso, no Brasil, o câncer de pele não melanoma se destaca com 31,5% dos casos e as leucemias se destacam por compreender 2,5% de todos os casos de câncer. (INCA., 2023). As modalidades de tratamento de tumores aprovadas incluem a quimioterapia, radioterapia, terapia direcionada como monoterapia ou terapia combinada, imunoterapia e terapia hormonal (Olofinsan K et al., 2023).

Apesar dos esforços dos cientistas com novos estudos e propostas de medicamentos, observa-se uma constante resistência ao tratamento devido à heterogeneidade dos tumores, que implica na necessidade de distintas abordagens terapêuticas (Fessart D et al., 2024). Entre 1981 e 2019, cerca de 247 novos medicamentos anticâncer foram aprovados e derivam de produtos naturais (Newman e Cragg., 2020). Neste quesito, a abordagem com compostos fitoquímicos, como fonte de moléculas ativas para serem isoladas e/ou modificadas, tem se mostrado promissora no tratamento complementar de diferentes tipos de tumores, principalmente por seus efeitos sinérgicos quando combinados aos quimioterápicos disponíveis no mercado, além de menores efeitos colaterais e imunomodulação (Hemmati et al., 2023).

Os alcaloides são classificados como metabólitos secundários de origem natural, caracterizados como compostos químicos orgânicos que apresentam um ou mais nitrogênios em sua estrutura, e demonstram diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade anticancerígena (Olofinsan K et al., 2023).

A família Amaryllidaceae, subfamília Amaryllidoideae, é um táxon de grande importância que se encontra adaptada a diversos habitats como florestas, estepes e desertos. Além disso, contam com 1600 espécies classificadas em 75 gêneros

(Scobeyeva et al., 2021). Além disso, é amplamente conhecida por ser uma planta bulbosa e/ou rizomatosa, que apresenta uso popular como ornamental, medicinal e farmacêutico. Sua distribuição geográfica é diversificada, contudo suas espécies têm predominância nas regiões tropicais e subtropicais, como o Mediterrâneo, a África e a América do Sul. Estas plantas têm reconhecimento por seus metabólitos secundários com atividade biológica, com destaque para os alcaloides isoquinolínicos. Esses alcaloides são sintetizados a partir das vias do shikimato e dos fenilpropanoides e apresentam diversidade estrutural como a licorina, a galantamina, a haemantidina, a narciclasina e a pancratistatina. Até o momento, mais de 600 alcaloides foram identificados. (Masi et al., 2020; Desgagné-Penix e Singh., 2014; Kornienko e Evidente., 2008; Zin j e Xu., 2013). No meio científico, alcaloides como Licorina, Galantamina, Homolicorina e narciclasina inibem a acetilcolinesterase e são utilizados no tratamento do Alzheimer (Paiva et al., 2023). Além disso, existem relatos de derivados cumarínicos que exerceram efeitos tóxicos em células tumorais A431 (Carcinoma epidermóide). (Masi et al., 2019). Outros estudos com alcaloides do tipo licorina e crinina isolados de *Crinum jagus* (Amaryllidaceae) e *Eucharis bonplandii* (Amaryllidaceae) demonstraram atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer gástrico AGS, sugerindo a existência de outros compostos com atividade antitumoral (Trujillo L et al., 2023).

A cultura celular *in vitro* é amplamente utilizada para predizer, a curto prazo, a resposta biológica a determinado tipo de patógeno (Hudu et al., 2016). E apesar da presença de diversas metodologias investigativas, a cultura de células desempenha uma importante função no tratamento do câncer, desde o diagnóstico até a elucidação de mecanismos celulares (Tutty MA et al., 2023). Sendo assim, algumas linhagens como B16F10 (câncer de pele), K562 (leucemia mieloide crônica) são utilizadas como teste de atividade anticancerígena, como por exemplo, de compostos pirazol. (Bennani, FE et al., 2022). Além disso, linhagens tumorais como KG1 (Leucemia Mieloide Aguda) são utilizadas para avaliar a viabilidade frente a extratos, como o Feno-grego (Fabaceae), onde são avaliados resultados citotóxicos, inibição do crescimento, modificações morfológicas e morte celular. (Alizadeh S et al., 2009). Contudo, estudos com extratos de *Habranthus robustus* frente a linhagens KG1 são escassos, mas

podem apresentar efeito indutor da apoptose, mecanismo esse presente em plantas da família Amaryllidaceae como o *Allium sativa*. (Hassan H.T., 2004). Assim, demonstra-se que a utilização de culturas celulares auxilia na compreensão de interações e sinalizações moleculares e celulares, delineando mecanismos químicos e moleculares, além de reduzir o uso de animais de laboratório (Habanjar O et al., 2021).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A carcinogênese

A carcinogênese é um processo que elenca diversos estágios envolvidos na mutação ou modificação de genes reguladores de células normais, e desta forma origina células cancerígenas. Neste ponto, as células normais sofrem uma perturbação em sua homeostase por alterações displásicas, hiperplásicas ou regenerativas (Sonnenschein C, Soto AM., 2016). Há diversos fatores que podem induzir a carcinogênese, como fatores físicos (radiações ionizantes e não ionizantes), químicos (amianto, arsênico, etc.), biológicos (toxinas), animais (insetos), mutação genética, entre outros.

Atualmente, entende-se que a alteração genética é necessária, mas não o único motivo para o início e progressão do câncer, tendo em vista que existe um ecossistema complexo que envolve uma variação de células não cancerosas e suas inúmeras funções dentro do tumor ou no microambiente tumoral. (De Visser, K. E. Joyce, J. A., 2023). Contudo, a alteração genética celular causa anomalias na estrutura dos genes que regulam o crescimento e diferenciação celular, isto inclui fatores externos e mutações espontâneas. Neste quesito, alguns tipos de câncer apresentam fatores determinantes por processos endógenos que induzem a mutagênese intrínseca. Além disso, mutações espalhadas no genoma alteram propriedades celulares, desenvolvendo um mecanismo de resistência à homeostase que regula a divisão celular, originando a metástase (Baba, A. I. Et al., 2007).

Neste ponto, a avaliação de novos compostos com potenciais cancerígenos e anticancerígenos se faz necessária, uma vez que constitui uma etapa essencial para avaliação de riscos em uma terapia em potencial. Assim, a avaliação do potencial carcinogênico mais eficiente de compostos químicos ou biológicos é o

estudo *in vivo*. Contudo, isso acarreta agravantes como o tempo elevado e a grande quantidade de animais para obtenção de um resultado, além de ser oneroso e impossibilitar o rastreamento de múltiplos compostos simultaneamente (STEINBERG, P., 2016).

2.2 Os estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro*, como culturas de linhagens tumorais, são úteis para testes de genotoxicidade e citotoxicidade, possibilitando a identificação e determinação de agentes tóxicos, assim como seu potencial terapêutico, reduzindo significativamente o uso de animais de laboratório (STEINBERG, P., 2016). Outro ponto é o uso da triagem *in vitro* para reposicionar medicamentos ou descobrir novos mecanismos de ação complementares às terapias farmacológicas disponíveis no mercado, podendo configurar uma identificação mecanicista de compostos ou uma identificação acidental para uma classe alvo específica, aumentando a viabilidade dos processos na busca por tratamentos mais eficazes (Wilkinson GF, Pritchard K., 2015).

2.3 As linhagens tumorais

As Linhagens celulares tumorais são valiosas na busca de compostos com atividade biológica em diversos tipos de câncer, e seu principal uso é relacionado à capacidade de fornecer uma fonte indefinida de material biológico para fins de pesquisa, permitindo uma disponibilidade da linhagem para outros pesquisadores, além de uma caracterização citológica detalhada, prova de neoplasticidade e autenticidade, tendo em vista a propriedade de reter propriedades do câncer de origem (Mirabelli P, et al., 2019).

A limitação evidente desta técnica é a incapacidade destas células cultivadas interagirem com outras células, similar ao que ocorre no organismo humano, logo, não sofrerem efeitos de sinalização celular como potenciais de crescimento, inflamação e diferenciação. Ademais, a arquitetura tecidual é distinta do organismo humano, e o metabolismo dos compostos não se assemelha ao *in vivo*, o que pode ocasionar uma resistência ou susceptibilidade maior ao composto químico/biológico testado, não refletindo em sua totalidade os efeitos tóxicos e terapêuticos (Mirabelli P, et al., 2019).

2.3.1 Linhagem KG1

A linhagem celular KG1 é utilizada na pesquisa e em estudos sobre a leucemia mieloide aguda (LMA) e representa um modelo útil para o entendimento

sobre as características moleculares e celulares associadas à leucemia. Estas células permanecem com as características das células progenitoras hematopoiéticas, apresentando baixa capacidade de adesão e alta proliferação. Além disso, é ideal para explorar o comportamento celular leucêmico frente às interações com o microambiente tumoral e as respostas às diversas terapias experimentais. Alguns estudos revelaram que esta linhagem tem sensibilidade a compostos antitumorais no quesito de indução da apoptose ou alteração da diferenciação celular. Pesquisas recentes reforçam o seu papel na busca de novas terapias inovadoras, oferecendo artifícios para abordagens precisas e personalizadas no tratamento do câncer hematológico. (Mrózek et al.). 2003; Cassier et al. 2017)

2.3.2 Linhagem K562

A linhagem celular K562 é derivada de uma leucemia mieloide crônica (LMC) e é utilizada em estudos oncológicos para investigar mecanismos moleculares e avaliar terapias antitumorais. A K562 é empregada em pesquisas que exploram a diferenciação celular, apoptose e resistência a medicamentos, principalmente porque essas células mantêm as características genéticas da fusão BCR-ABL, responsável pela ativação da tirosina-quinase, tornando-se um alvo em potencial para novas terapias. (Poudel G., 2022)

2.3.3 Linhagem B16F10

A linhagem celular B16F10 é um modelo de melanoma murino frequentemente empregado para estudar a progressão do melanoma, a formação de metástases e as respostas a terapias antitumorais. A linhagem B16F10 tem elevada capacidade de formar metástases e, por esse motivo, também é utilizada para investigar a angiogênese, uma vez que induzem a uma forte resposta angiogênica em experimentos *in vivo*. Ademais, alguns estudos têm explorado características como resistência à apoptose. Já em experimentos *in vitro*, as células exibem uma alta taxa de proliferação e invasividade, tornando-as adequadas para investigar vias moleculares na busca de compostos bioativos como extratos naturais e agentes sintéticos que culminem na redução da viabilidade celular. (Potez et al.). 2018; Seong et al. 2012).

2.4 O uso de fitoquímicos

No âmbito da pesquisa em linhagens tumorais, a utilização de fitoquímicos tem grande importância, tendo em vista que muitos dos medicamentos disponíveis

no mercado derivaram de plantas (Newman e Cragg., 2020). Os fitoquímicos são metabólitos secundários de plantas com propriedades bioativas, usados principalmente como adjuvantes no tratamento de certas enfermidades, dentre essas, o câncer. Ademais, diversos estudos sinalizam que a classe dos flavonoides e alcaloides apresenta maiores efeitos antitumorais, indicando um potencial a ser explorado (Khan AW, et al., 2022). Os alcaloides e flavonoides podem agir em distintas vias das neoplasias, dentre elas as vias apoptóticas, inibição da proliferação celular, modulação do ciclo celular e estresse oxidativo, resultando no controle celular ou facilitando a atuação de medicamentos antineoplásicos (Wink M., 2015).

2.5 A família Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae é de grande importância por conter diversos alcaloides com potencial biológico. Esta família conta com mais de 1600 espécies classificadas em 75 gêneros, e conta com mais de 600 alcaloides documentados até 2018 (Berkov et al., 2020; Scobeyeva et al., 2021). Sua distribuição geográfica é diversificada, contudo suas espécies têm predominância nas regiões tropicais e subtropicais, como o Mediterrâneo, a África e a América do Sul.

Estas plantas têm reconhecimento por seus metabólitos secundários, como flavonoides, flavanas, terpenos, além de alcaloides como Licorina, galantamina, haemantidina, com atividades biológicas contra o estresse oxidativo, os microorganismos e tumores, com destaque para os alcaloides isoquinolínicos. (Singh B, K.) D., 2015) Esses alcaloides são sintetizados a partir das vias do shikimato e dos fenilpropanoides e apresentam diversidade estrutural como a licorina, a galantamina, a haemantidina, a narciclasina e a pancratistatina. (Masi et al., 2020; Desgagné-Penix e Singh., 2014; Kornienko e Evidente., 2008). Estes alcaloides apresentam atividades antiproliferativas potentes e específicas em linhagens tumorais, uma vez que são capazes de modular o ciclo celular, influenciando diretamente na manutenção da homeostase celular (Nair JJ, van Staden J., 2018).

O *Allium sativum*, popularmente conhecido como alho, é o principal representante da família Amaryllidaceae de uso popular. Existem diversos estudos indicando que os compostos químicos presentes, como alcaloides, terpenos e organossulfurados, possuem propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e anti-inflamatórias que auxiliam no controle da proliferação tumoral (Schäfer G,

Kaschula CH., 2014). Outra planta com potencial antineoplásico é *Habranthus robustus*, tendo em vista que o alcaloide haemantidina, apesar de conter poucos estudos disponíveis, demonstra atividade citotóxica contra linhagens celulares HaCaT (Queratinócitos), A431 (Carcinoma epidermoide) e AGS (Adenocarcinoma gástrico) (Masi M., et al., 2022).

3 JUSTIFICATIVA

A pesquisa em cultura de células tumorais ressalta sua importância no aprofundamento do conhecimento das interações celulares com a progressão tumoral em ambiente controlado, facilitando a avaliação de compostos anticancerígenos, assim como a elucidação de alvos terapêuticos. Pode-se salientar que a aplicação do teste *in vitro* serve como predição de efeitos tóxicos ou medicinais, o que pode conduzir de maneira mais assertiva o estudo *in vivo*, reduzindo custos associados aos ensaios clínicos e os riscos biológicos. O estudo visa investigar a viabilidade e o potencial citotóxico de distintas linhagens celulares na presença de extratos e alcaloides da planta *Habranthus robustus*, além de investigar a seletividade destas amostras para linhagens tumorais, comparando seu efeito numa linhagem de fibroblastos de camundongo.

Autores como Chen Z., et al. (2018) demonstram que a quimiossensibilidade celular *in vitro* pode estar relacionada clinicamente com o aumento da sobrevida livre da doença, e sugerem a implementação de testes de suscetibilidade a medicamentos *in vitro* antes da quimioterapia para prevenir a ocorrência de resistência primária aos medicamentos e tratamento medicamentoso inadequado. Desta forma, ressalta-se a relevância clínica do presente estudo *in vitro* na procura de novos compostos terapêuticos para determinados tipos de neoplasias, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou tratamentos, assim como a elucidação de mecanismos e potenciais citotóxicos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antitumoral do extrato bruto do bulbo e das folhas, além de dois alcaloides (haemantidina e um derivado de haemantidina) isolados da planta *Habranthus robustus*, pertencente à família *Amaryllidaceae*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a viabilidade celular em linhagens KG1, K562 e B16F10 na presença de extrato bruto de flores, bulbo e alcaloides extraídos da planta *Habranthus robustus*.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *Habranthus robustus* e alcaloides isolados heamantidina e derivado de haemantidina em células da linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de camundongos).
- Calcular a concentração inibitória média (CI50) e a concentração citotóxica média (CC50).
- Avaliar a seletividade das amostras quanto às linhagens tumorais, com base nos ensaios de viabilidade e citotoxicidade em linhagem NIH/3T3.

5 METODOLOGIA

6.1. Material vegetal e preparação dos extratos

O extrato bruto (EB) da planta *Habranthus robustus* foi preparado e gentilmente cedido pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Brevemente, a planta foi seca 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 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 foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich, USA) estéril na concentração de 100 mg/mL e armazenadas em geladeira (4°C) no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) até o uso nos experimentos de viabilidade.

6.2. Atividade antitumoral

O ensaio de atividade antitumoral foi realizado no Laboratório de Parasitologia da UFMS e seguiu o estudo de Feu (2024) onde as 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 (Sigma-Aldrich/EUA) foram distribuídas na densidade de 1×10^4 células/poço, em placas de 96 poços, nas condições padronizadas, contendo os extratos nas concentrações de 1000 a 1,56 µg/mL. As placas foram 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).

6.3. Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Parasitologia da UFMS e seguiu o estudo de Feu (2024), onde células da linhagem NIH/3T3 em meio RPMI devidamente suplementado foram distribuídas na densidade de 1×10^4 células/poço, em placas de 96 poços, nas condições padronizadas, contendo os extratos nas concentrações de 1000 a 15,6 µg/ml. As placas foram 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).

6.4. 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 (Concentração Inibitória média) e CC50 (Concentração Citotóxica Média), foi feita uma regressão não linear dos resultados obtidos, e o

índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão de CC50 por CI50. Considerou-se alta citotoxicidade (<10ug/ml), média citotoxicidade (10 a 100 ug/ml) e baixa citotoxicidade (>100ug/ml).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade antitumoral dos diferentes extratos de *Habranthus robustus*, as amostras foram diluídas em meio RPMI devidamente suplementado, com concentrações variando de 1,56 a 1000 µg/mL, e incubadas diferentes linhagens de células tumorais por 48 horas a 37°C. Após esse período, a viabilidade das células foi avaliada por espectrofotometria pelo método da resazurina. (Feu 2024). Os resultados estão na Figura 1.

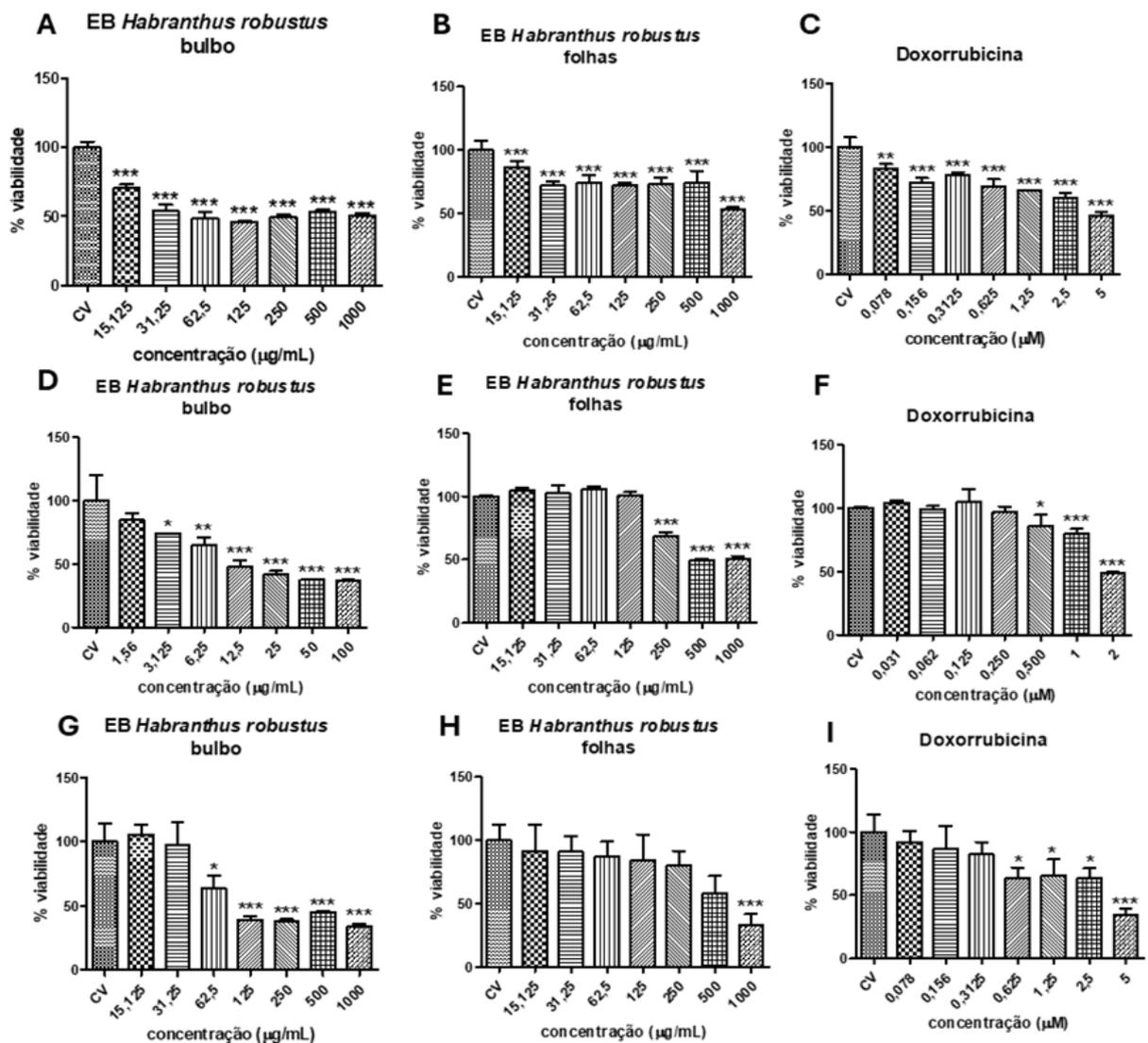


Figura 1: Atividade antitumoral dos extratos de *Habranthus robustus*. Diferentes extratos da planta foram incubados com as linhagens tumorais K562(A,B,C), KG1 (D,E,F) e B16F10(G,H,I) por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A, D e G – extrato bruto (EB) dos bulbos; B, E e H – EB das flores; C, F, e I – Controle com Doxorubicina. *, ** 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 em relação a linhagem K562 (A, B, C), o extrato bruto (EB) do bulbo reduziu consideravelmente a viabilidade celular, evidenciado pela diminuição constante a viabilidade em função do aumento da concentração do EB, (15,125 ug/ml a 125 ug/ml), após isto o valor permanece constante estatisticamente, indicando uma possível resistência celular, tendo em vista que não há evidência de uma relação dose-concentração; neste ponto percebe-se que a eficiência na redução da viabilidade foi superior a doxorrubicina, uma vez que atingiu valores inferiores a 50%. O EB das folhas reduziu a viabilidade das células tumorais, sendo mais evidente na concentração de 1000ug/ml, a qual obteve valores próximos a 50% da viabilidade celular, contudo, trata-se de uma concentração elevada que pode ser tóxica para as células saudáveis. Outro ponto é em relação às concentrações de (15,125 ug/ml a 500 ug/ml), é possível perceber que a variação da viabilidade é mínima, indicando um possível mecanismo de resistência celular ou uma ineficiência do composto testado, podendo cogitar uma variação de concentração fitoquímica entre bulbo e folhas. Por fim, a doxorrubicina demonstrou uma redução gradual da viabilidade de acordo com o aumento da concentração do fármaco, fato esse esperado, tendo em vista a sua característica citotóxica, o que indica uma eficiência superior ao EB das folhas, onde a dose de 0,078uM de doxorrubicina foi equivalente à concentração de 15,125ug/ml do EB das folhas.

Em relação à linhagem KG1 (D, E, F), o EB do Bulbo nas concentrações menores (1,56 e 3,125 µg/mL) demonstra uma leve redução na viabilidade celular, porém significativa, tendo em vista o $p < 0,05$. Já em concentrações intermediárias (6,25 a 25 µg/mL), o efeito citotóxico é mais pronunciado, onde a viabilidade obtém valores abaixo de 50% e diferenças estatísticas significativas, sendo $p < 0,01$ para 6,25 ug/ml e $p < 0,001$ para 12,5 e 25ug/ml. Em relação às concentrações mais altas (50–100 µg/mL), a viabilidade atinge valores inferiores a 50%, sugerindo uma resposta dose-dependente com aumento de eficácia, sugerindo a presença dos alcaloides Licorina e Norbelladina, como demonstrado no estudo de Girard et al. (2022) frente a uma linhagem leucêmica (THP-1). O EB das folhas indicou um efeito dose-dependente, onde as concentrações (15,625 a 125 µg/mL) não demonstraram efeito significativo na viabilidade celular, mantendo valores próximos ao controle, enquanto as concentrações (250 a 1000 µg/mL) indicam uma redução expressiva na viabilidade celular, com maior impacto nas concentrações de 500 e 1000 ug/ml, onde obteve valores próximos de 50% e $p < 0,001$. Essa característica de dose-dependência sugere

que as folhas podem conter compostos bioativos que, em altas concentrações, apresentam citotoxicidade, como Licorina e Pretazetina, sugeridos por Cole et al. (2019). Por fim, a doxirrubicina em concentrações mais baixas (0,031–0,500 μM) apresenta pouca alteração na viabilidade celular, indicando baixo efeito citotóxico, enquanto a concentração mais alta (2 μM) demonstra uma redução significativa na viabilidade, atingindo valores próximos a 50% e $p < 0,001$. Uma hipótese é que, em concentrações baixas, as células podem expressar mecanismos de resistência intrínseca como bomba de efluxo que não permitem que doxorubicina exerça seu efeito citotóxico, como indicado por Szakács, G., et al. (2006).

Em relação à linhagem B16F10 (G, H, I), o EB do Bulbo nas concentrações menores (15,125 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$) não houve redução na viabilidade celular e a margem de erro estatístico foi pronunciada, indicando uma variação na leitura das amostras. Já na concentração intermediária (62,5 $\mu\text{g/mL}$), o efeito citotóxico é mais elevado e significativo, onde a viabilidade obtém valores entorno de 60% e diferença estatística significativa com $p < 0,05$. Em relação às concentrações mais altas (125–1000 $\mu\text{g/mL}$), a viabilidade atinge valores inferiores a 50%, sugerindo uma resposta dose-dependente, tendo em vista a pouca variação da viabilidade entre as concentrações e a diferença altamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$). O EB das folhas não indicou uma diferença estatística significativa, principalmente devido à elevada variação dos resultados nos poços que culminou em um elevado intervalo de erro entre as concentrações (15,125 a 500 $\mu\text{g/ml}$), e neste caso, a sobreposição dos erros demonstra valores estatisticamente similares ao CV, contudo a concentração (1000 $\mu\text{g/ml}$) demonstrou uma relação dose-dependente com diminuição da viabilidade e diferença altamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle. Por fim, a doxorubicina em concentrações mais baixas (0,078–0,3125 μM) não apresentou diferença estatística significativa devido a motivos supracitados na discussão do EB das Folhas. Contudo, as concentrações (0,625 a 2,5 μM) demonstram uma redução mediana na viabilidade, atingindo valores próximos a 60% e valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle. Uma hipótese para a diminuição da viabilidade pode ser o estresse oxidativo causado pela doxorubicina, que aumenta a liberação de ROS que lesam as células, como demonstrado por Dutordoir M.R e Bates D.A. (2016). A concentração (5 μM) cursa com o conceito de dose-dependência, uma vez que retrata a redução da viabilidade para valores inferiores a 50%, paralelo ao aumento abrupto da concentração, obtendo uma

diferença altamente significativa frente ao controle ($p < 0,001$).

Os extratos de *Habranthus robustus* 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. (Feu 2024).

Podemos observar que os extratos foram citotóxicos de forma dose dependente para as células NIH/3T3. Os resultados estão ilustrados na Figura 2.

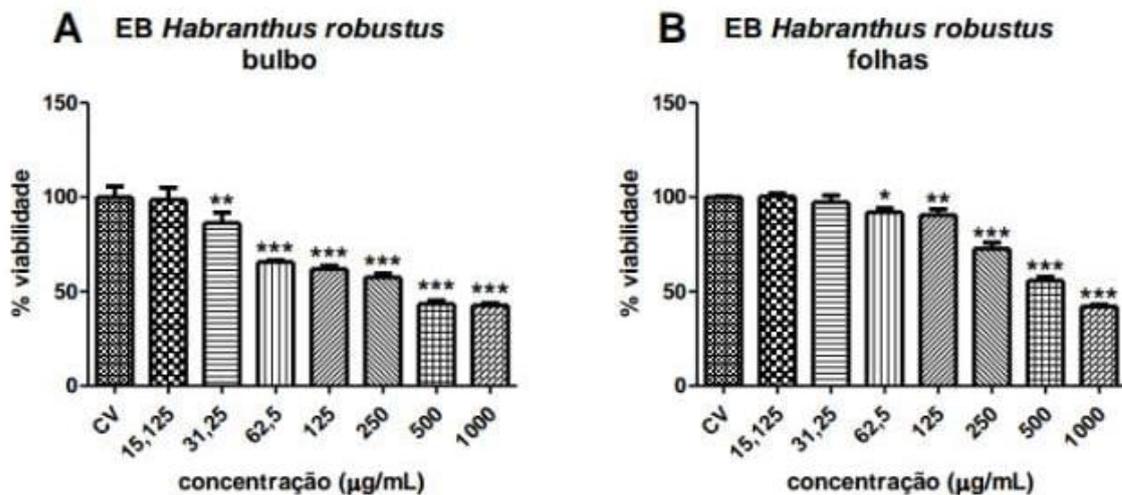


Figura 2: Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Habranthus robustus*. Extrato bruto (EB) do bulbo EB das flores foi incubado com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – Extrato bruto (EB) do bulbo; B – EB das flores. *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Nesta figura 2, é possível notar que os efeitos citotóxicos foram mais evidentes no EB do bulbo, uma vez que os efeitos se iniciaram, de forma singular, em doses menores (31,25 $\mu\text{g/mL}$) se comparados com o EB das folhas na mesma concentração. Ademais, a viabilidade do EB do bulbo nas concentrações (62,5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) reduziu progressivamente, obtendo valores próximos de 50%, enquanto no EB das folhas as concentrações (31,25 a 125 $\mu\text{g/mL}$) se mantiveram estatisticamente constantes e próximas a 100% de viabilidade, e obtiveram resultados progressivos de queda de viabilidade a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$ até 1000 $\mu\text{g/mL}$, onde alcançou 50% de viabilidade, evidenciando uma dose-dependência elevada para efeito citotóxico.

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos de atividade anticancerígena e citotoxicidade, realizou-se 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 CI₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade das amostras de *Habranthus robustus*

Amostra	IC50 K562 (µg/mL)	CC50 fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
<i>EB H. robustus bulbo</i>	79,43	61,09	0,77
<i>EB H. robustus folhas</i>	>1000	258,80	0,26
Doxorrubicina	3,72	4,67	1,25

Amostra	IC50 KG1 (µg/mL)	CC50 fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
<i>EB H. robustus bulbo</i>	14,79	61,09	4,13
<i>EB H. robustus folhas</i>	537,0	258,80	0,48
Doxorrubicina	1,99	4,67	2,35

Amostra	IC50 B16 (µg/mL)	CC50 fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
<i>EB H. robustus bulbo</i>	158,49	61,09	0,38
<i>EB H. robustus folhas</i>	631,0	258,80	0,41
Doxorrubicina	2,15	4,67	2,17

CI₅₀: concentração inibitória de 50% das células cancerígenas; CC₅₀: concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC₅₀ e CI₅₀.

Observando os resultados das Figuras 1 e 2 e da Tabela 1, podemos notar que as amostras de *Habranthus robustus* reduziram de forma significativa e dose dependente a viabilidade de células de diferentes linhagens tumorais nas condições testadas.

Para a célula K562, o EB do Bulbo demonstrou ser moderadamente citotóxico (IC₅₀=79,43 µg/mL), porém indica baixa seletividade (IS=0,77) e toxicidade relevante para os fibroblastos (61,09 µg/ml), obtendo resultados inferiores à doxorrubicina, enquanto o EB das folhas demonstra alta toxicidade para os fibroblastos e baixíssimo efeito antitumoral.

As células KG1, o EB do Bulbo, indicam boa atividade antitumoral (IC₅₀=14,79

ug/mL) e boa seletividade (IS= 4,13), sugerindo menor toxicidade para os fibroblastos, obtendo valores superiores aos da doxorubicina. Enquanto isso, o EB das folhas demonstrou atividade antitumoral extremamente baixa (IC50: 537 ug/ml) e baixa seletividade (IS=0,48).

As células B16F10, o EB do Bulbo, indicam citotoxicidade reduzida (IC50=158,49 ug/ml) e baixíssima seletividade (IS=0,38), enquanto o EB das folhas indica atividade antitumoral muito fraca (IC50=631 ug/ml) e baixa seletividade (IS=0,41). Em ambos os casos, os EB são tóxicos para as células de fibroblastos e não demonstram vantagens na sua utilização frente à doxorubicina.

Com esses resultados, é possível perceber que os EB de *H. robustus* demonstraram melhor atividade antitumoral em células KG1 (IC50= 14,79 ug/mL) e menor eficácia em células B16F10 (IC50= 158,49 ug/mL) e K562 (IC50= 79,43 ug/mL). Enquanto, os EB das folhas foram ineficazes, com IC50 muito superiores em todas as linhagens tumorais. O bulbo apresentou maior seletividade para células KG1 (IS= 4,13), sendo o mais promissor para tratamentos que sejam focados nessa linhagem. Hipóteses que corroboram para os efeitos antitumorais observados principalmente nas células KG1 podem ser baseadas nos estudos de Pellegrino et al. (2018) que reforçam a presença do alcaloide Haemantidina, que é capaz de se ligar ao ribossomo eucariótico e inibir rearranjos conformacionais do RNA, além de ativar a resposta de estresse nucleolar antitumoral que é dependente de P53, atuando assim no bloqueio maturativo celular afetado por esta doença. Outros compostos citados pelo estudo fitoquímico de Singh B. (2015) são flavonoides, flavanas, fosfolipídeos, esteróis, lecitinas, terpenos giberelinas, além de diversos alcaloides com efeitos biológicos que podem contribuir de forma sinérgica para compostos citotóxicos, ou aumentar a interação com receptores regulatórios.

Considerando a citotoxicidade das amostras frente às células NIH/3T3, ambas as amostras apresentaram citotoxicidade dose-dependente, em sua maioria indicando índices de seletividade (razão da CC₅₀ pela CI₅₀ de cada amostra) baixos para todas as linhagens, com exceção do EB do Bulbo frente à KG1 que sinalizou uma seletividade interessante (IS=4,13) pelas células tumorais. Neste caso, não se sabe com precisão qual composto químico é responsável pelo efeito observado, contudo, alguns estudos, como o de Perinová et al. (2020), cogitam a possibilidade de alcaloides supracitados, como Haemantidina, que apresenta hidroxilas em sua estrutura e que pode demonstrar uma característica polar que permearia a membrana

celular por difusão passiva. É interessante observar também os resultados obtidos para a doxorrubicina (fármaco citotóxico utilizado amplamente no tratamento de diversos tipos de tumores), neste caso o índice de seletividade se manteve elevado em todos os testes, reforçando sua característica citotóxica seletiva, contudo a linhagem K562 obteve valores levemente superiores de citotoxicidade, reforçando a ideia de que esta linhagem tem mecanismos intrínsecos de resistência ao fármaco, como fatores de iniciação e manutenção tumoral, como citado por Xin H et al. (2013).

A atividade antitumoral de alguns alcaloides encontrados em plantas da família Amaryllidaceae também foi testada. Os alcaloides haemantidina, um derivado da haemantidina.

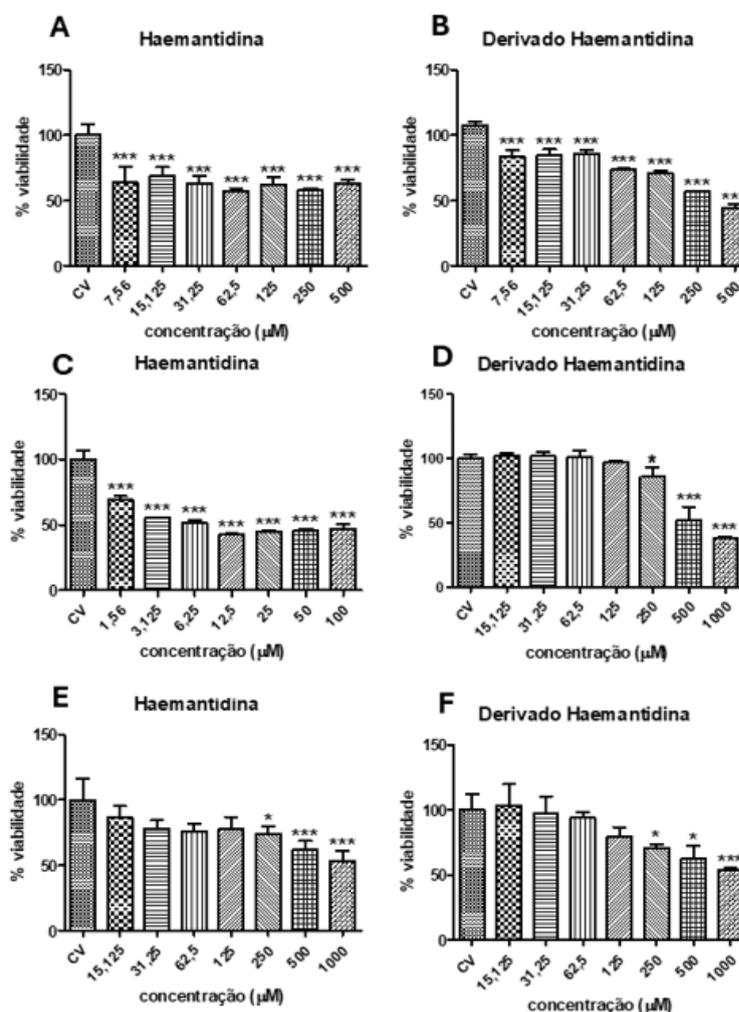


Figura 3: Atividade antitumoral de alcaloides da Família Amaryllidaceae. Diferentes concentrações dos alcaloides foram incubadas com as linhagens tumorais K562, KG1 e B16F10 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – haemantidina, B – seu derivado. *, **, *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

A citotoxicidade dos alcaloides em células NIH/3T3 também foi analisada.

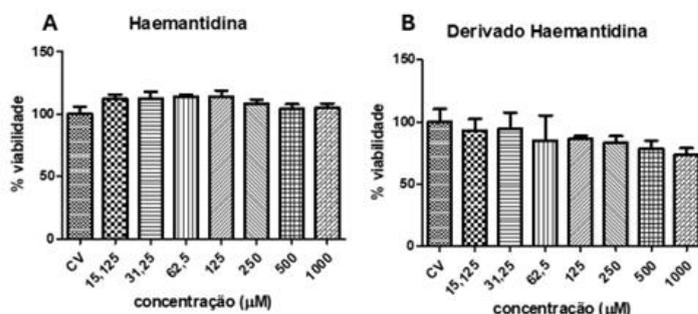


Figura 4: Avaliação da citotoxicidade dos alcalóides da Família Amaryllidaceae. Diferentes concentrações dos alcalóides foram incubadas com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – haemantidina, B – seu derivado. *, **, *** significa $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (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 alcalóides da Família Amaryllidaceae

Alcalóide	IC_{50} K562 (µg/mL)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	630,95	>1000	1,58
Derivado			
Haemantidina	398,10	>1000	2,51
Doxorrubicina	3,72	4,67	1,25

Alcalóide	IC_{50} KG1 (µg/mL)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	6,80	>1000	147,06
Derivado			
Haemantidina	680,77	>1000	1,47
Doxorrubicina	1,99	4,67	2,35

Alcalóide	IC_{50} B16 (µg/mL)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	1479,11	>1000	0,68
Derivado			
Haemantidina	1333,52	>1000	0,75
Doxorrubicina	2,15	4,67	2,17

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

Podemos notar que o alcalóide Haemantidina frente à linhagem K562 apresentou baixa atividade antitumoral (IC_{50} =630,95 ug/ml) e baixa citotoxicidade nos fibroblastos (>1000 ug/ml), apesar de o índice de seletividade ser 1,58, logo, os

resultados demonstram que não haverá benefícios em relação à doxorubicina, uma vez que apresenta índice de seletividade próximo ($IS=1,25$), porém menor concentração capaz de causar citotoxicidade na célula tumoral ($IC_{50}=3,72$). Contudo, se analisarmos os dados do alcaloide derivado da Haemantidina, o índice de seletividade é mais interessante ($IS=2,51$) e retrata uma menor concentração capaz de causar citotoxicidade na célula tumoral ($IC_{50}=398,10$ ug/ml) e menor efeito tóxico para os fibroblastos ($CC_{50}>1000$ ug/ml), sugerindo um composto promissor que pode ser estudado e modificado quimicamente para alcançar resultados melhores frente a esta linhagem tumoral.

Com relação à KG1, o alcaloide Haemantidina apresentou alta atividade antitumoral ($IC_{50}=6,80$ ug/ml), alta segurança para os fibroblastos ($CC_{50}>1000$ µg/mL) e altos índices de seletividade ($IS=147,06$), demonstrando resultados muito superiores à doxorubicina, que apresenta seletividade de 2,35, além de 100 vezes mais efeito que seu alcaloide derivado ($IC_{50}=680,77$ ug/ml), sugerindo um excelente potencial terapêutico frente à KG1.

A linhagem B16F10 frente ao alcaloide Haemantidina e seu derivado demonstrou baixos resultados de atividade antitumoral ($IC_{50}= 1479,11$ ug/ml e $1333,52$ ug/ml, respectivamente), além de baixa toxicidade para os fibroblastos ($CC_{50}>1000$ ug/ml) e sem seletividade significativa ($IS=0,68$ e $0,75$, respectivamente), demonstrando que não são boas opções terapêuticas frente a esse tipo de tumor. Neste caso, os resultados da doxorubicina são superiores aos dos alcaloides. Contudo, podem ser testadas em outras linhagens tumorais para avaliar seu efeito biológico.

Por fim, os resultados positivos obtidos com a Haemantidina podem estar relacionados à sua estrutura isoquinolínica com grupos polares como as hidroxilas em C6, que podem aumentar a interação com receptores de membrana e permitirem a difusão passiva, como citado por Perinová et al. (2020). Outros estudos, como o de Havalek et al. (2014), ressaltam que a Haemantidina diminui a viabilidade celular e o potencial de membrana mitocondrial por declínio de células na fase S, que induziria a apoptose, uma vez que acumula células no estágio G1 e G2, aumentando os níveis de p16 e fatores pró-apoptóticos, obtendo assim maior efeito apoptótico em células leucêmicas que têm ciclo celular e maturação limitados. Já em relação ao derivado de Haemantidina, os resultados são inferiores. Uma hipótese seria que, pela perda da hidroxila C6, a polaridade é diminuída em detrimento da formação de um éter pela

inserção do grupo propino, que aumenta o tamanho molecular e impede a formação de ligações, devido à nuvem eletrônica presente entre C14 e C15, proveniente da tripla ligação entre carbonos. Sendo assim, a molécula em questão não seria capaz de atravessar a membrana por difusão passiva e nem interagir eficientemente com o ribossomo eucarioto. A estrutura molecular dos alcaloides se encontra abaixo na figura 5.

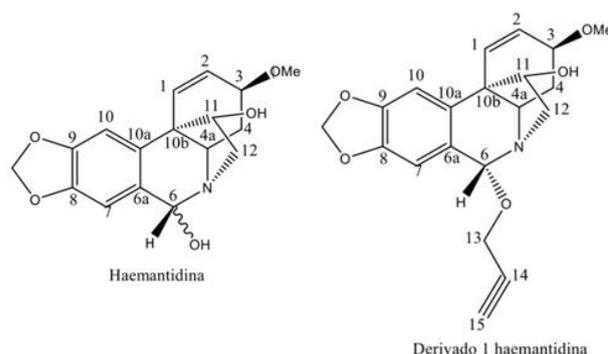


Figura 5: Alcaloides encontrados na Família Amaryllidaceae

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, tanto dos extratos brutos (bulbo e folhas) de *Habranthus robustus* quanto dos alcaloides isolados, pode-se notar atividades antitumorais interessantes, com diferenças marcantes em eficácia e seletividade.

Os extratos do bulbo demonstraram maior eficácia citotóxica em relação às linhagens tumorais hematológicas (KG1 e K562), com baixos valores de IC50. No entanto, com menor seletividade em comparação à doxorrubicina, sinalizando a necessidade de melhorar a segurança para células não tumorais. Os extratos das folhas exibiram menor atividade antitumoral, com IC50 elevados, sugerindo uma baixa concentração de compostos bioativos no extrato.

Em relação aos alcaloides isolados, a haemantidina demonstrou eficácia superior no tratamento de leucemias, evidenciada pelos valores baixos de IC50 e altos índices de seletividade frente à linhagem KG1. Esse resultado pode indicar que compostos bioativos isolados podem superar os extratos em termos de eficácia e segurança, ressaltando a importância de se estudar moléculas mais específicas.

Ademais, apesar de a haemantidina ter apresentado baixa eficácia em relação ao melanoma, o perfil dos alcaloides, associado aos resultados de baixa toxicidade

para fibroblastos, traz à tona o potencial do *H. robustus* como fonte de novos agentes antitumorais. No tocante aos extratos brutos, sua composição contém misturas complexas de compostos secundários ativos que podem atuar de forma sinérgica ou até serem melhorados para alvos específicos.

Por fim, tanto os extratos quanto os alcaloides oferecem potenciais no combate ao câncer, com a maior seletividade e eficácia frente às leucemias vindas dos alcaloides. Contudo, estudos futuros devem focar na avaliação fitoquímica dos extratos, assim como a otimização de compostos isolados, além da compreensão mais aprofundada dos seus mecanismos de ação, almejando o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras.

REFERÊNCIAS

ALIZADEH, S. et al. Antineoplastic Effect of Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum*) Seed Extract against Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line (KG-1). [s.d.].

ALVES, B. **INCA lança a Estimativa 2023 – Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/inca-lanca-a-estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil/>>. Acesso em: 7 dez. 2024.

BABA, A. I.; CĂTOI, C. **Comparative oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.

BENNANI, F. E. et al. Design and prediction of novel pyrazole derivatives as potential anti-cancer compounds based on 2D-QSAR study against PC-3, B16F10, K562, MDA-MB-231, A2780, ACHN and NUGC cancer cell lines. **Heliyon**, v. 8, n. 8, p. e10003, ago. 2022.

BERKOV, S. et al. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. Em: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. (s.l.) Elsevier, 2020. v. 83p. 113–185.

Carga global de câncer aumenta em meio à crescente necessidade de serviços - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. 2024. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2024-carga-global-cancer-aumenta-em-meio-crescente-necessidade-servicos>>. Acesso em: 29/05/2024

CASSIER, P. A. et al. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 8, p. 1089–1098, out. 2017.

CHEN, Z. et al. Evaluation of the in vitro Chemosensitivity and Correlation with Clinical Outcomes in Lung Cancer using the ATP-TCA. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 139–145, 16 mar. 2018.

COLE, E. R. et al. Cytotoxic and Genotoxic Activities of Alkaloids from the Bulbs of *Griffinia gardneriana* and *Habranthus itaobinus* (Amaryllidaceae). **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 707–717, 27 jun. 2019.

DE VISSER, K. E.; JOYCE, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 374–403, mar. 2023.

FESSART, D.; ROBERT, J. Mécanismes de résistance aux traitements des cancers. **Bulletin du Cancer**, v. 111, n. 1, p. 37–50, jan. 2024.

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**. 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

GIRARD, M.-P. et al. Chemical Synthesis and Biological Activities of Amaryllidaceae Alkaloid Norbelladine Derivatives and Precursors. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.

27, n. 17, p. 5621, 31 ago. 2022.

GOPAUL, K.; SHINTRE, S.; KOORBANALLY, N. A Review on the Synthesis and Anti-cancer Activity of 2-substituted Quinolines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 631–646, 14 maio 2015.

HABANJAR, O. et al. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12200, 11 nov. 2021.

HASSAN, H. T. Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy. **Leukemia Research**, v. 28, n. 7, p. 667–671, jul. 2004.

HEMMATI BUSHEHRI, R. et al. Integration of phytotherapy and chemotherapy: Recent advances in anticancer molecular pathways. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 26, n. 9, set. 2023.

HUDU, S. A. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2016.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>. Acesso em: 29/05/2024

JIN, Z.; XU, X.-H. Amaryllidaceae Alkaloids. Em: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). **Natural Products**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 479–522.

KHAN, A. W. et al. Role of Plant-Derived Active Constituents in Cancer Treatment and Their Mechanisms of Action. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1326, 13 abr. 2022.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 1982–2014, 1 jun. 2008.

MASI, M. et al. Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreaticum maritimum*. **Toxins**, v. 14, n. 4, p. 262, 7 abr. 2022.

MASI, M. et al. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 277–281, nov. 2019.

MASI, M. et al. Advances in the Chemical and Biological Characterization of Amaryllidaceae Alkaloids and Natural Analogues Isolated in the Last Decade. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5621, 29 nov. 2020.

MIRABELLI; COPPOLA; SALVATORE. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1098, 1 ago. 2019.

MRÓZEK, K. et al. Molecular cytogenetic characterization of the KG-1 and KG-1a acute myeloid leukemia cell lines by use of spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 38, n. 3, p. 249–252, nov. 2003.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Insights to the tribe Haemantheae of the South African Amaryllidaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 292, p. 115177, jun. 2022.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cell cycle modulatory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **Life Sciences**, v. 213, p. 94–101, nov. 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

OLOFINSAN, K.; ABRAHAMSE, H.; GEORGE, B. P. Therapeutic Role of Alkaloids and Alkaloid Derivatives in Cancer Management. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5578, 22 jul. 2023.

OOFT, S. N. et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 513, p. eaay2574, 9 out. 2019.

PAIVA, M. J. M. et al. Pharmacological and toxicological effects of Amaryllidaceae. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e277092, 2023.

PELLEGRINO, S. et al. The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. **Structure**, v. 26, n. 3, p. 416–425.e4, mar. 2018.

PEŘINOVÁ, R. et al. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, p. 103928, jul. 2020.

POTTEZ, M. et al. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206693, 5 nov. 2018.

POUDEL, G. et al. Mechanisms of Resistance and Implications for Treatment Strategies in Chronic Myeloid Leukaemia. **Cancers**, v. 14, n. 14, p. 3300, 6 jul. 2022.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, dez. 2016.

SCHÄFER, G.; KASCHULA, C. The Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Organosulfur Compounds in Cancer Chemoprevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 233–240, 31 jan. 2014.

SCOBEYEVA, V. A. et al. Gene Loss, Pseudogenization in Plastomes of Genus *Allium*

(Amaryllidaceae), and Putative Selection for Adaptation to Environmental Conditions. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 674783, 8 jul. 2021.

SEONG, I. et al. Sox10 Controls Migration of B16F10 Melanoma Cells through Multiple Regulatory Target Genes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31477, 21 fev. 2012.

STEINBERG, P. In Vitro–In Vivo Carcinogenicity. Em: REIFFERSCHIED, G.; BUCHINGER, S. (Eds.). **In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 157p. 81–96.

SINGH, A.; DESGAGNÉ-PENIX, I. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. **Plant Science Today**, v. 1, n. 3, p. 114–120, 1 jul. 2014.

SINGH B, K. D. Phytochemistry and Pharmacology of Genus Zephyranthes. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 04, n. 04, 2015.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, mar. 2006.

TRUJILLO, L. et al. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Plants against Cancer Cells: Biotechnological, In Vitro, and In Silico Approaches. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2601, 13 mar. 2023.

TUTTY, M. A.; HOLMES, S.; PRINA-MELLO, A. Cancer Cell Culture: The Basics and Two-Dimensional Cultures. Em: MOVIA, D.; PRINA-MELLO, A. (Eds.). **Cancer Cell Culture**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2023. v. 2645p. 3–40.

Wilkinson GF, Pritchard K. In Vitro Screening for Drug Repositioning. *Journal of Biomolecular Screening*. 2015;20(2):167-179.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251–286, 8 set. 2015.

XIN, H. et al. Multi-Drug–Resistant Cells Enriched From Chronic Myeloid Leukemia Cells by Doxorubicin Possess Tumor-Initiating–Cell Properties. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 122, n. 4, p. 299–304, 2013.