



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição



FACFAN

Natasha Caroline Ledra
Curso de Farmácia

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EXTRATO DE
***CRINUM SCABRUM* E ALCALÓIDES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE**

Campo Grande
2025



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição



FACFAN

Natasha Caroline Ledra

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EXTRATO DE
CRINUM SCABRUM E ALCALÓIDES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE**

Projeto de Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, como requisito parcial para a obtenção
do título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

Campo Grande
2025

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO	9
2.2	VETOR.....	11
2.3	FORMAS CLÍNICAS.....	13
2.4	CICLO DO PARASITA.....	14
2.5	TRATAMENTO E SUAS LIMITAÇÕES.....	16
2.6	IMPORTÂNCIA DA BUSCA DE NOVOS TRATAMENTOS	17
2.7	FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE E SUAS RESPECTIVAS PLANTAS.....	18
2.8	ATIVIDADE BIOLÓGICA DESCRITA PARA A FAMÍLIA.....	19
2.9	ALCALÓIDES HAEMANTIDINA E CRINAMINA.....	20
2.10	GÊNERO CRINUM.....	23
3	HIPÓTESE	24
4	JUSTIFICATIVA	24
5	OBJETIVOS	25
5.1	OBJETIVO GERAL.....	25
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
6	METODOLOGIA	25
6.1	PARASITOS	25
6.2	AMOSTRAS	26
6.3	ENSAIO DE VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS	26
6.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	27
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
8	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada que afeta milhões de pessoas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, existem aproximadamente 14.000 mil infectados pela doença, sendo as regiões Norte, Centro-oeste e Nordeste as mais afetadas. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida durante o repasto sanguíneo realizado pela fêmea do inseto Flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, conhecido como mosquito-palha. A doença pode se manifestar desde lesões cutâneas, mucocutâneas até formas viscerais, sendo cada forma clínica correlacionada com a cepa de *Leishmania* e o estado imunológico do hospedeiro. Atualmente os fármacos disponíveis para o tratamento da doença consistem basicamente em antimoniais pentavalentes e anfotericina B, no entanto, devido à crescente resistência aos tratamentos convencionais, à toxicidade dos medicamentos, à limitação de fármacos disponíveis e ao estigma social causado pela doença, há necessidade da busca de novas terapias mais eficazes e seguras. Nesse contexto, produtos naturais ou derivados são importantes fontes de estudo. As plantas da Família Amaryllidaceae destacam-se pela diversidade de metabólitos secundários, incluindo alcalóides isoquinolínicos e estudos anteriores demonstraram várias propriedades biológicas, incluindo atividade antiprotozoária para alcalóides específicos da família. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar através de ensaios biológico *in vitro* o potencial antileishmania do extrato de *Crinum scabrum* e dos alcalóides crinamina e haemantidina, contra o protozoário de *L. amazonensis*. A fração acetato de etila do extrato de *C. scabrum* foi a mais ativa contra as formas promastigotas, mas o extrato metanólico apresentou maior seletividade. Entre os alcalóides isolados, haemantidina apresentou maior atividade antileishmania e maior seletividade. Espera-se que esses resultados possam contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos, melhorando o controle e tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Amaryllidaceae, Alcalóides, *Leishmania amazonensis*, Leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected parasitic disease that affects millions of people, mainly in tropical and subtropical regions. In Brazil, according to the Ministry of Health, there are approximately 14,000 people infected with the disease, with the North, Midwest and Northeast regions being the most affected. The disease is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted during blood transfusions by the female phlebotomine bug of the genus *Lutzomyia*, known as the straw mosquito. The disease can range from cutaneous and mucocutaneous lesions to visceral forms, with each clinical form correlating with the strain of *Leishmania* and the host's immune status. Currently, the drugs available to treat the disease consist basically of pentavalent antimonials and amphotericin B. However, due to the growing resistance to conventional treatments, the toxicity of the drugs, the limitation of available drugs and the social stigma caused by the disease, there is a need to search for new, more effective and safer therapies. In this context, natural products or their derivatives are important sources of study. Plants from the Amaryllidaceae family stand out for their diversity of secondary metabolites, including isoquinoline alkaloids, and previous studies have demonstrated various biological properties, including antiprotozoal activity for specific alkaloids from the family. In view of this, the aim of this work is to investigate the anti-leishmanial potential of *Crinum scabrum* extract and the alkaloids crinamine and haemantidine against the *L. amazonensis* protozoan through *in vitro* biological tests. The ethyl acetate fraction of the *C. scabrum* extract was the most active against promastigote forms, but the methanolic extract showed greater selectivity. Among the alkaloids isolated, haemantidine showed the greatest anti-leishmania activity and selectivity. It is hoped that these results can contribute significantly to the development of new drugs, improving the control and treatment of leishmaniasis.

Keywords: Amaryllidaceae, Alkaloids, *Leishmania amazonensis*, Cutaneous leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, a doença apresenta diversas formas clínicas, variando desde manifestações cutâneas até viscerais, que podem ser fatais se não tratadas. Além dos sintomas clínicos, a leishmaniose também é responsável pelo estigma social, levando a um grande impacto psicológico para as pessoas afetadas pela doença. A crescente resistência aos tratamentos convencionais e a toxicidade dos medicamentos disponíveis reforçam a necessidade urgente de novas terapias mais eficazes e seguras.

Neste contexto, a exploração de compostos bioativos derivados de plantas tem ganhado destaque. A família Amaryllidaceae, conhecida por sua diversidade de alcalóides com atividades farmacológicas, oferece um amplo campo para investigação, principalmente por compostos da família já terem apresentado atividade antiprotozoária em estudos anteriores. Desta forma, o gênero *Crinum*, representado pela espécie *Crinum scabrum*, pode representar uma fonte de pesquisa para o combate a leishmaniose, uma vez que, apresenta poucos estudos sobre seus alcalóides e atividades farmacológicas.

Este trabalho visa, portanto, avaliar a atividade antileishmania de extratos de *Crinum scabrum* e dos alcalóides crinamina e haemantidina isolados de plantas da família Amaryllidaceae, identificando uma possível atividade específica contra o parasita *Leishmania (L.) amazonensis*. Dessa forma, pretende-se avançar na busca por alternativas terapêuticas que possam ser integradas aos tratamentos existentes, ampliando o arsenal disponível contra a leishmaniose e melhorando a qualidade de vida dos afetados por essa doença.

Através de ensaios biológicos *in vitro*, este estudo se propõe a oferecer novas perspectivas sobre o potencial farmacêutico da planta *Crinum scabrum* e dos alcalóides haemantidina e crinamina. A expectativa é que os resultados obtidos possam servir de base para outros estudos e para o desenvolvimento de novos fármacos, contribuindo significativamente para o controle e tratamento da leishmaniose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A Leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. São

considerados protozoários heteróxeos que necessitam de mais de um hospedeiro para realizar seu ciclo de vida, sendo um vertebrado e um invertebrado (Ferreira, 2020). A doença pode ser dividida em Leishmaniose Tegumentar Americana, que afeta a pele e as mucosas, e Leishmaniose Visceral, que afeta órgãos internos. Dentre essas, a leishmaniose tegumentar possui grande distribuição mundial e no Continente Americano. No Brasil ela é considerada endêmica em todos os estados, sendo as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* as três principais causadoras de doenças em humanos (Brasil, 2017).

A *Leishmania* pode ser dividida entre dois principais subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, ambas responsáveis pela leishmaniose tegumentar em humanos (OPAS, 2022).

Quadro 1. Posição taxonômica do agente etiológico da leishmaniose tegumentar

Ordem	Kinetoplastida
Família	Trypanosomatidae
Gênero	<i>Leishmania</i>
Subgêneros	<i>Leishmania</i> <i>Viannia</i>
Espécies	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) chagasi</i> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) lainsoni</i>

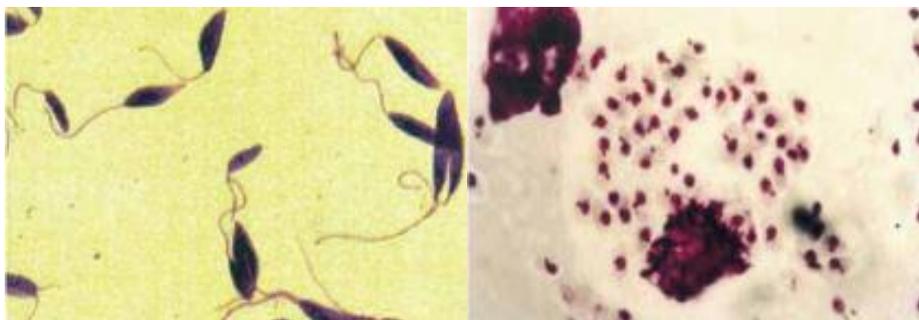
Fonte: elaborado pela autora (2025).

No Brasil a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma das espécies prevalentes, possuindo a forma flagelada promastigotas, encontrada no trato gastrointestinal do inseto vetor, e outra forma aflagelada (sem flagelo livre) ou amastigota, observada nos tecidos de hospedeiros vertebrados, sendo assim, um parasita

intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) (Peña et al, 2023) (Figura 1).

A forma amastigota, possui um formato ovóide e levemente achatado com tamanho aproximado de 1,5 e 3 x 3 e 6,5µm. As promastigotas apresentam formas alongadas, com um flagelo livre em sua região anterior e medem aproximadamente 16 e 40 x 1,5 e 3µm. As paramastigotas que são as formas de transição entre amastigotas e promastigota são pequenas, ovais ou arredondadas, possuem um pequeno flagelo livre e medem 5 a 10 x 4 a 6µm (Neves, 2016).

Figura 1. Formas dos protozoários. 1A) Promastigota e 1B) Amastigota



Fonte: Brasil - Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar (2017)

2.2 VETOR

A doença é transmitida aos animais e seres humanos através da fêmea infectada do inseto Flebotomíneo ou Flebótomo, que inocula o parasita no momento da picada. O flebotomíneo é um inseto hematófago invertebrado de estatura pequena da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gêneros *Lutzomya*: vetor responsável pela transmissão nas Américas (Novo Mundo), e *Phlebotomus*; responsável pela transmissão nas regiões da África, Europa e Ásia (Velho Mundo) (OPAS, 2022; Brasil 2017).

Os flebotomíneos apresentam uma ampla distribuição geográfica e adaptação a diferentes condições climáticas, estando presentes em áreas silvestres, rurais e urbanas (Brasil, 2017). No Brasil os vetores são conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui e cangalha, podendo ainda apresentar outros nomes populares de acordo com a localização geográfica (Brasil, 2017). Conforme Neves (2016), as principais espécies envolvidas na transmissão da Leishmaniose tegumentar são *L. whitmani*, *L. wellcomei*, *L.*

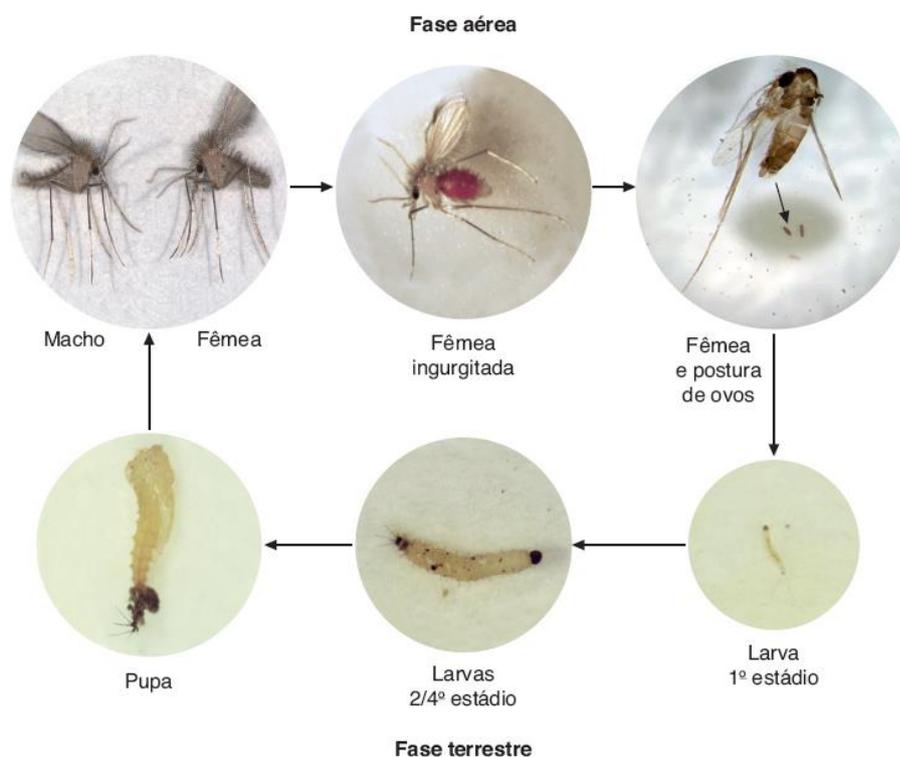
pessoai, *L. intermedia*, *L. umbratilis* e *L. flaviscutellata*, sendo algumas dessas espécies vetores específicos de algumas formas clínicas de leishmaniose.

Os vetores possuem uma coloração acastanhada, medem em média de 2 a 4mm de comprimento, possuem o corpo coberto por cerdas finas, sua cabeça forma um ângulo de 90° com o eixo longitudinal do tórax e quando em repouso suas asas se mantêm em posição semiereta. Os machos e as fêmeas podem ser diferenciados através da anatomia da extremidade posterior, sendo esse bifurcado nos machos e nas fêmeas pontuda ou ligeiramente arredondada (Neves, 2016; Coura, 2013; Wijerathna; Gunathilaka, 2020).

De acordo com Ferreira (2020), o ciclo de vida dos flebotomíneos pode ser dividido em fases de acordo com a maturidade do vetor: aéreo para os adultos e terrestre para as formas imaturas (ovos, quatro estados larvais e pupa) (Figura 2). Os flebotomíneos adultos se alimentam do néctar de plantas e soluções açucaradas e a hematofagia do tipo telmofagia é restrita à fêmea da espécie, que necessita de sangue para a postura dos ovos (Ferreira, 2020; Cecilio et al., 2022).

Os insetos adultos possuem uma atividade crepuscular e/ou noturna, ficando restritos durante o dia em troncos de árvores, fendas de rochas, tocas de animais e no peridomicílio em folhagens e no próprio solo. A contaminação do inseto ocorre no momento do repasto sanguíneo, quando a fêmeaingere os macrófagos parasitados provenientes das micro lesões causadas na derme no momento da picada. Após a digestão do sangue as fêmeas depositam os ovos em locais sombreados, com presença de matéria orgânica. Algumas fêmeas morrem após a postura dos ovos, no entanto, aquelas que sobrevivem necessitam realizar um segundo repasto, ocorrendo nesse momento a transmissão dos parasitos para os hospedeiros vertebrados (Ferreira, 2020).

Figura 2. Ciclo de vida dos Flebotomíneos.



Fonte: Ferreira, 2020

2.3 FORMAS CLÍNICAS

De acordo com Ferreira (2020), as formas clínicas da doença podem ser divididas em dois grandes grupos: Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e Leishmaniose Visceral ou Calazar. A LTA é causada pelos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, sendo no Brasil as principais espécies responsáveis pela doença a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Ela pode ainda ser subdividida em Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose cutâneo mucosa (LCM) e Leishmaniose cutânea difusa (LCD), estando cada forma clínica correlacionada com o estado imunológico do paciente e a cepa de *Leishmania* (Neves, 2016; Silva et al 2021).

A Leishmaniose cutânea localizada é a mais frequente e apresenta próximo a região de inoculação do parasito a presença de uma lesão cutânea ulcerosa, indolor, única ou múltipla e que tendem à cicatrização. A LC pode progredir para a forma cutâneo-disseminada, com lesões numerosas e está diretamente relacionada a pacientes imunossuprimidos. Nessa fase, as lesões possuem aspectos variados e há possibilidade

de infecção secundária bacteriana, levando a formação de secreção purulenta, edema e rubor (Brasil, 2017; Ferreira, 2020).

A leishmaniose cutânea mucosa no Brasil, é causada preferencialmente pela espécie *L. braziliensis* e possui os mesmos processos de infecção da forma cutânea. No entanto, após alguns meses ou anos da infecção inicial, ocorre o aparecimento de lesões secundárias destrutivas nas mucosas e cartilagens do nariz, boca, faringe e laringe. Sendo caracterizada por lesões indolores degenerativas que levam a ulceração e a perda tecidual (Costa et al., 2009; Mokni, 2019; Silva et al 2021).

A última forma da Leishmaniose tegumentar é a Leishmaniose cutâneo difusa, associada a infecção por *L. amazonensis*. Nessa forma, a infecção ocorre como na LC, formando inicialmente um nódulo, posteriormente uma úlcera única e por fim lesões metastáticas múltiplas por toda a pele. Acredita-se que a LCD esteja associada a uma deficiência imunológica, que torna o paciente incapaz de produzir uma resposta inflamatória contra o protozoário (Burza et al., 2018; Brasil, 2017; Silva et al 2021).

O segundo grande grupo é a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, causada por parasitos do grupo *Leishmania donovani*. Possui um perfil crônico com desenvolvimento abrupto ou gradual e suas características clínicas podem variar de acordo com a região onde ocorre (África, Ásia, Europa e América). Comumente manifesta febre irregular, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e quando não tratada, caquexia (Costa et al 2023; Rey, 2010).

Os parasitas apresentam tropismo por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) que estão presentes em grande quantidade em órgãos como fígado, baço, medula óssea e sistema linfático. Além disso também atingem o rim, intestino, pulmão e pele quando em fases mais avançadas da doença. A Leishmaniose visceral apresenta diferentes sintomatologias e evolução como: formas assintomáticas, formas agudas, forma subaguda, formas crônicas e leishmaniose dérmica pós-calazar (Ferreira, 2020; Rey, 2010; Neves, 2016; Coura, 2013).

2.4 CICLO DO PARASITA

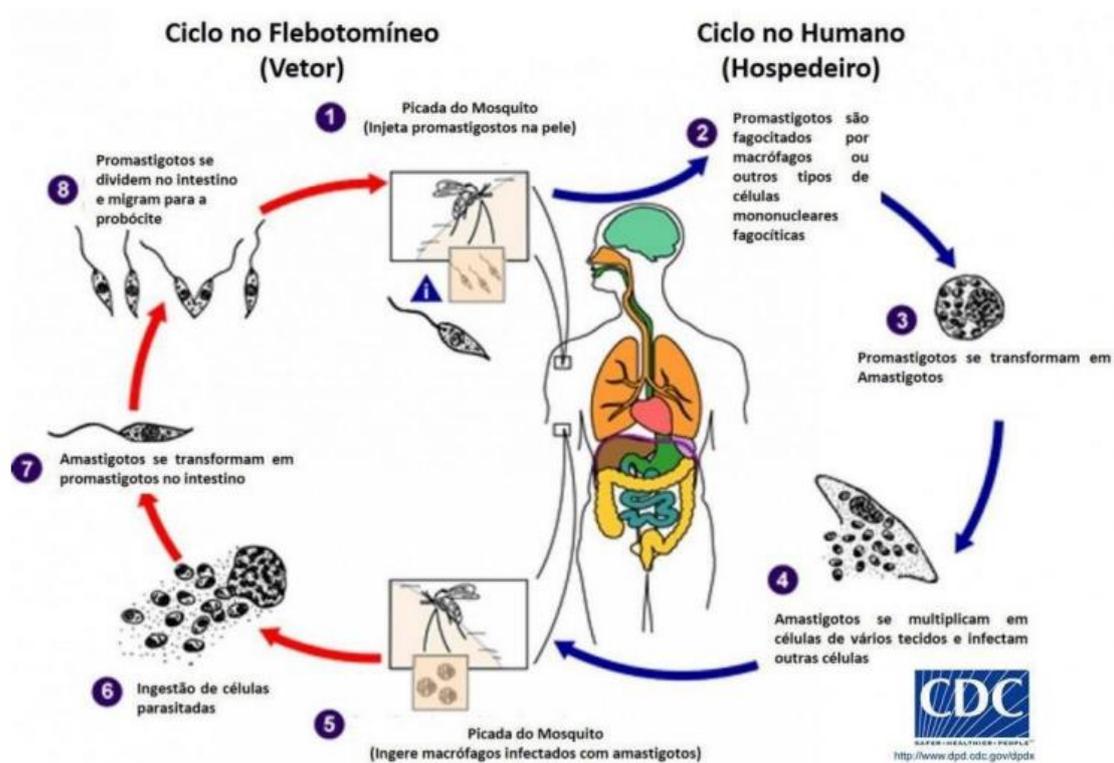
O ciclo de vida do parasito é dimórfico e pode ser dividido em dois momentos: ciclo no vetor e ciclo no hospedeiro vertebrado. O ciclo no vetor começa com a infecção do flebotomíneo quando a fêmea ingere o sangue contendo macrófagos parasitados com a forma amastigota do parasita. No tubo digestivo do vetor, após aproximadamente três

dias os macrófagos se rompem e liberam a forma promastigota que adere ao epitélio intestinal do inseto (Figura 3). A localização da promastigota no tubo digestivo depende da espécie do protozoário. Espécies do subgênero *Viannia*, permanecem no intestino posterior e migram posteriormente para a faringe. As espécies do subgênero *Leishmania* multiplicam-se primeiramente na parede do estômago e depois migram para o esôfago e faringe do flebotomíneo (Dvorak et al., 2018; Coura, 2013).

Após a infecção pelo parasita, a fêmea do flebotomíneo no momento do hematofagismo, corta e lesa o tecido subcutâneo abaixo da epiderme. A saliva do inseto possui substâncias quimiotáticas e neuropeptídeos vasodilatadores capazes de imunossuprimir a resposta do hospedeiro e inibir a apresentação de antígenos, permitindo a inoculação da forma promastigota proveniente da região anterior do trato digestivo e a consequente infecção do hospedeiro vertebrado (Cecílio et al. 2022; Rego; Soares, 2021).

Logo, o ciclo no hospedeiro vertebrado tem início no momento da ingestão do sangue pelo inseto, onde ocorre a regurgitação das formas promastigotas. Essas formas são interiorizadas pelos macrófagos, onde realizam a divisão binária e diferenciação em amastigotas em um período de vinte e quatro horas. Após a divisão binária, as amastigotas ocupam todo o espaço citoplasmático do macrófago, fazendo com que a célula se rompa e libere as formas amastigotas. Com o rompimento do macrófago, as amastigotas são fagocitadas novamente, levando a uma resposta inflamatória no local ou ainda podendo atingir o sistema linfático, sangue e outros órgãos. (Neves, 2016; Lima Junior, et al., 2022).

Figura 3: Ciclo Biológico da Leishmania spp.



Fonte: adaptado de CDC, 2025.

2.5 TRATAMENTO E SUAS LIMITAÇÕES

De acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde (Brasil, 2017) o tratamento da leishmaniose pode variar de acordo com a forma clínica desenvolvida, com a espécie infectante e com características particulares das pessoas infectadas (idade, quadro clínico e comorbidades) assim como os índices de cura. Segundo a OPAS (Organização Pan-americana da saúde) (2022, p. 15) “não é obrigatório identificar a espécie para iniciar o tratamento, [...] o tratamento deve ser iniciado de acordo com o quadro clínico, a disponibilidade de medicação e a relação risco-benefício”.

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose tegumentar são atualmente os antimoniais pentavalentes. No mundo, existem dois antimoniais pentavalentes disponíveis para o tratamento da leishmaniose: antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio. No entanto, no Brasil, o Glucantime (antimoniato de N-metilglucamina) é o único disponibilizado para o tratamento da leishmaniose (Brasil, 2017). O fármaco é administrado geralmente por via intramuscular, mas também pode ser endovenosa ou intralésional. As limitações do tratamento com o antimonial são a teratogenicidade e a contra-indicação em pacientes acima de 50 anos; portadores de

cardiopatias; nefropatias e hipersensibilidade aos componentes da medicação (OPAS, 2022).

A Anfotericina B é considerada um medicamento de segunda escolha, indicado para o tratamento de leishmaniose em caso de resistência ao tratamento ou quando o uso de antimoniais pentavalentes é contraindicado. No Brasil, estão disponíveis o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal para aplicação intravenosa. Apesar de ser segunda linha de tratamento, para pacientes com leishmaniose tegumentar coinfectados com HIV o desoxicolato de anfotericina B é considerado medicamento de primeira escolha para tratamento. Outra droga disponível na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Brasil (RENAME) é a Pentamidina (diamidinas aromáticas), apresentada como isetionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina. No entanto, o medicamento é contraindicado para gestantes; pacientes menores de 1 ano; diabetes mellitus; insuficiência renal e/ou hepática e doenças cardíacas (Brasil, 2024; Neves, 2016).

A partir de 2020 a Pentoxifilina, vasodilatador periférico com propriedades hemorreológicas foi incluída como coadjuvante no tratamento da leishmaniose tegumentar. Estudos demonstraram que a Pentoxifilina como coadjuvante com o antimoniato de meglumina diminui o tempo de cura. No entanto, a droga é contraindicada em menores de 12 anos; gestante; imunossuprimidos; transplantados e pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca. Além dessas opções a Miltefosina, medicamento administrado por via oral e pertencente a classe das alquilfosfocolinas, é indicada como alternativa terapêutica em muitos casos de leishmaniose tegumentar, principalmente em casos de leishmaniose cutâneo difusa. No entanto, em casos de leishmaniose cutâneo difusa causados por *Leishmania amazonensis*, o sugere-se inicialmente a utilização de antimoniais pentavalentes (Brasil, 2017; OPAS, 2022).

2.6 IMPORTÂNCIA DA BUSCA DE NOVOS TRATAMENTOS

No Brasil o antimoniato de meglumina, a Anfotericina B, a Pentamidina e a Pentoxifilina são fármacos antileishmania inclusos na lista de medicamentos essenciais. No entanto, as opções de tratamento atuais apresentam alto custo, toxicidade e muitas vezes o desenvolvimento de resistência ao fármaco utilizado. Além disso, os fármacos administrados em grande parte por via parenteral em unidades de saúde, causam

muitos efeitos adversos como edema, mal-estar, cansaço e febre, o que dificulta a adesão e continuidade do tratamento (OPAS, 2022).

Diante da dificuldade de um tratamento efetivo e por ser uma doença com importante aspecto clínico e diversidade epidemiológica, a leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, sendo necessário o desenvolvimento de fármacos menos tóxicos e mais efetivos para o tratamento da doença. A pesquisa com produtos naturais representa uma estratégia importante no combate à leishmaniose. Além disso, o Brasil é um país rico em várias espécies de plantas que podem ser estudadas, podendo apresentarem atividades biológicas significativas e potencial para novos fármacos (Gervazoni et al., 2020; Brasil, 2017).

2.7 FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE E SUAS RESPECTIVAS PLANTAS

A família Amaryllidaceae (J. St.-Hil) é uma grande família de monocotiledôneas com flores bulbosas de aproximadamente 1.000 espécies e 79 gêneros diferentes. São plantas presentes principalmente na África, Costa Mediterrânea e América do Sul e são conhecidas por suas variedades ornamentais como narcisos (*Narcissus*), “snowdrops” (*Galanthus*) e “snowflakes” (*Leucojum*) (J. Nair et al., 2013; C. Danquah et al., 2022).

No Brasil, foram registrados 14 gêneros nativos, sendo alguns exclusivamente brasileiros (Renara et al., 2020; Araújo, 2007). As plantas dessa família são herbáceas, terrestres e eventualmente aquáticas ou rupícolas, com hábitos epifíticos ou epífitas (Luiz Junior, 2016). Além disso, são perenes e possuem bulbos ou rizomas subterrâneos com “disposição das folhas geralmente dística, inflorescência em escapos umbeliformes com espata formada por duas ou mais brácteas espatais, flores com três sépalas e três pétalas e geralmente seis estames” (Amaral, 2020).

A família Amaryllidaceae é dividida em três subfamílias principais de acordo com características morfológicas, moleculares e bioquímicas, sendo elas: Amaryllidoideae, Allooideae e Agapanthoideae. A subfamília Amaryllidoideae apresenta como principais gêneros: *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Narcissus*, *Crinum*, *Clivia*, *Zephyranthes*, *Galanthus*, *Lucojum*, *Lycoris*, *Cyrtanthus* e *Haemanthus*. Por outro lado, a subfamília Allooideae inclui muitos gêneros de plantas comestíveis conhecidas: *Allium*, *Nothoscordum* e *Tulbaghia* (Meerow et al, 2015; Chase et al., 2009). Por fim, a subfamília Agapanthoideae é representada principalmente pelo gênero *Agapanthus* (Menezes et al., 2015).

2.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA DESCRITA PARA A FAMÍLIA

A família Amaryllidaceae é conhecida pela sua grande diversidade de alcalóides e por suas propriedades farmacológicas, como: antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiplasmodial, anticarcinogénica, antiespasmódica, antiplaquetária, antiasmática, antitrombótica, antitumoral, imunomoduladora e principalmente inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) (Danquah, 2022; Paiva, 2023). Diversas espécies possuem compostos bioativos com potencial medicinal. Entre as mais conhecidas, está o alcalóide galantamina, obtido de algumas espécies de *Galanthus* (snowdrop), muito utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer (Harbatová et al., 2016).

Algumas plantas com atividade biológica descrita e mais comumente conhecidas são: *Amaryllis belladonna* L., normalmente ornamental, possui atividade citostática contra células cancerígenas, atividade antibacteriana e antifúngica. *Crinum bulbispermum*, capaz de inibir a proliferação de células de glioblastoma resistentes à apoptose. *Crinum macowanii* e *Crinum moorei* com atividade antifúngica. *Narcissus* (planta utilizada desde a antiguidade e principalmente por Hipócrates) possui o alcalóide narciclasina, responsável por atividade anticâncer e de acordo com estudos, um possível efeito profilático para a artrite em ratos (Danquah et al., 2022; Nair et al., 2023).

Segundo a revisão realizada por Danquah (2022) e Harbatová (2016) outras espécies com atividades biológicas estudadas, são: *Allium*: com capacidade de inibição da agregação plaquetária, atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, antifúngica e capaz de suprimir a proliferação de células tumorais. *Tulbaghia*: muitos estudos provam sua atividade antimicrobiana, principalmente contra espécies de microrganismos destacados como prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS). A planta *T. violacea* apresentou atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei* e *Leishmania tarentolae*. A espécie *Crinum* apresentou várias atividades biológicas, podendo-se destacar sua atividade anti-inflamatória, analgésica, anti-carcinogênica e atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma cruzi*.

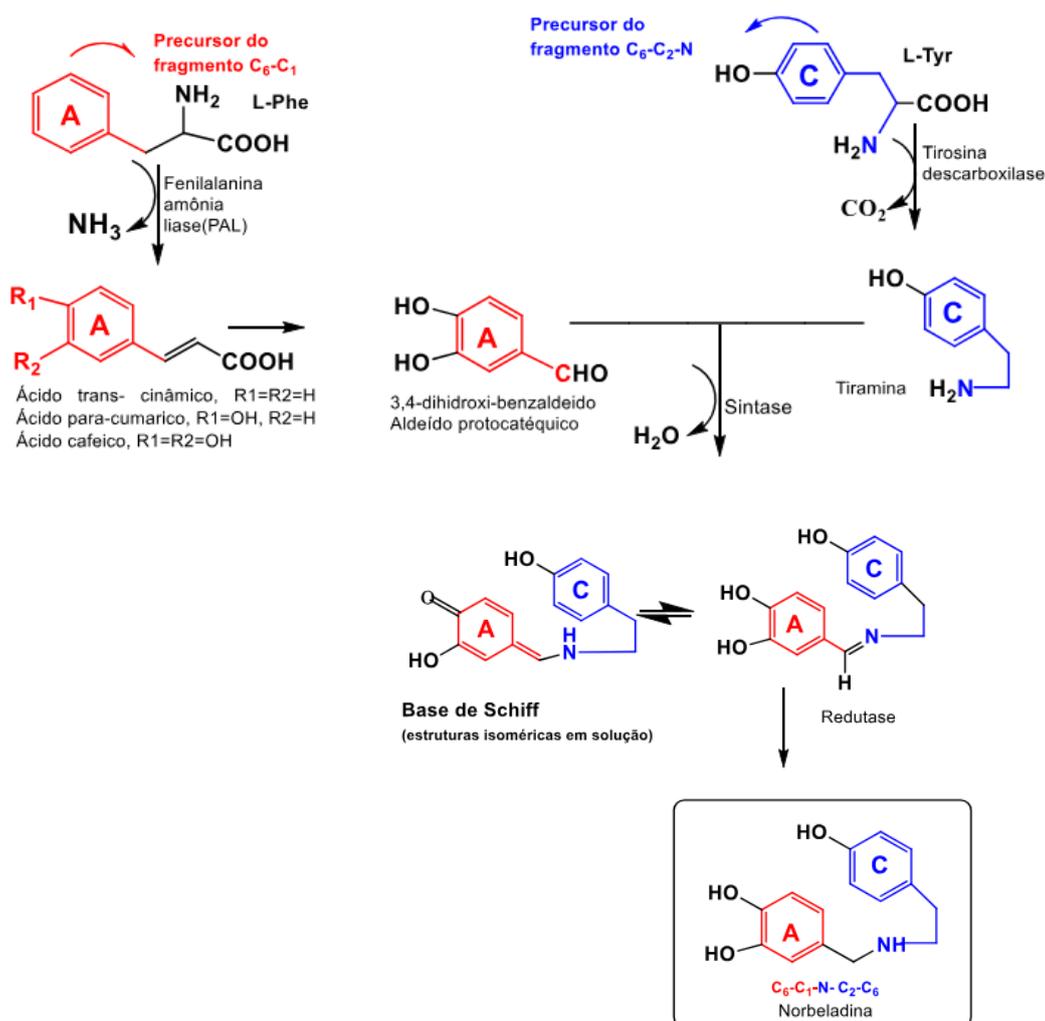
Outro grande grupo da família é o gênero *Cyrtanthus*, presente em grande parte na região Africana, mas com grande variedade de propriedades fitoquímicas. Como principais espécies pode-se destacar: *C. elatus* (Jacq.) Traub, *C. obliquus* (L.f.) Aiton e *C. mackenni* Hook. O gênero possui alcalóides como licorina, tazetina, haemantamina e

haemantidina e de acordo com estudos os alcalóides apresentaram atividade anti-helmíntica, anti-inflamatória e antiprotozoária (Danquah et al., 2022).

2.9 ALCALÓIDES HAEMANTIDINA E CRINAMINA

A família Amaryllidaceae é rica em compostos com propriedades bioativas. Mais de 600 estruturas de alcalóides isoquinolínicos foram isoladas de várias espécies de Amaryllidaceae (Jin et al., 2019). Os alcalóides são compostos naturais que apresentam características de álcalis (base) e são derivados de aminoácidos, contendo um nitrogênio heterocíclico. Os alcalóides isoquinolínicos presentes na família Amaryllidaceae são derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, que se convertem ao precursor norbeladina (Figura 4) (Simões et al., 2017).

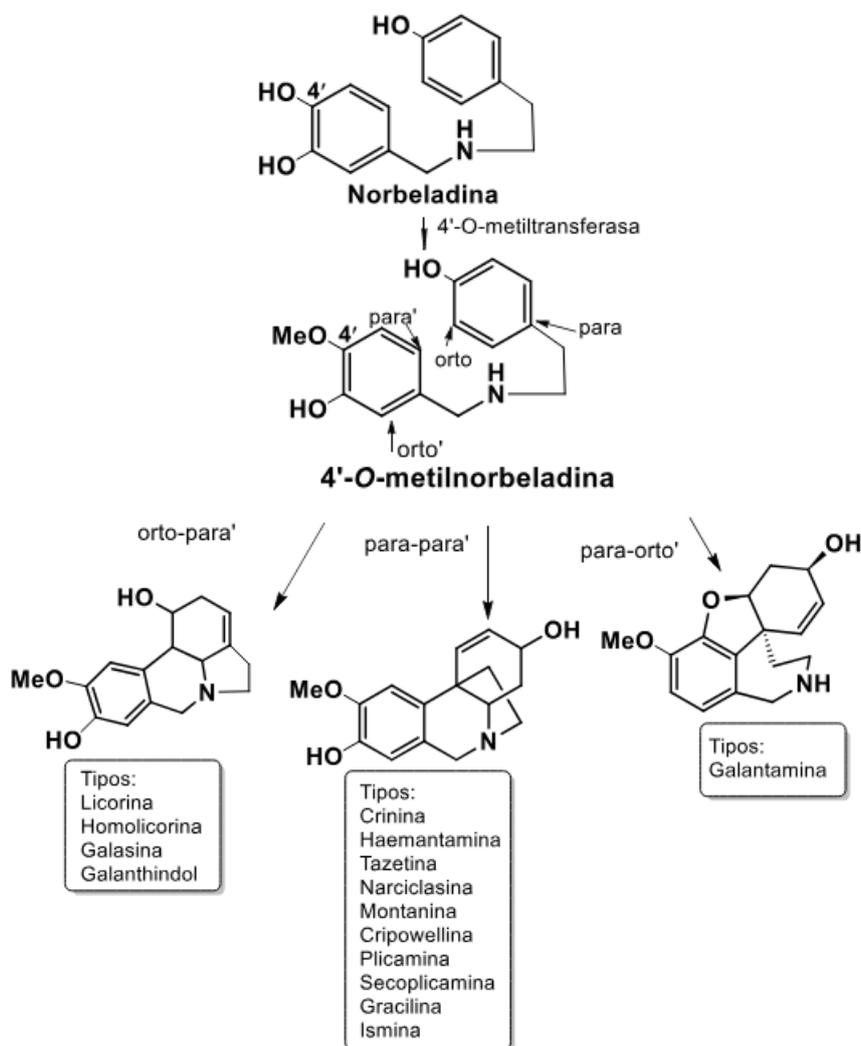
Figura 4. Formação da norbeladina



Fonte: Fonte: Aquino, 2021.

Após a formação da norbeladina, ocorrem três tipos de acoplamento oxidativo intramolecular, formando os principais grupos, *ortho-para*: resultando nos alcalóides licorina, e homolicorina. *Para-ortho*: galantamina e *para-para*: crinina, haemantamina, tazetina e narciclasina (Figura 5) (Harbatová et al., 2016).

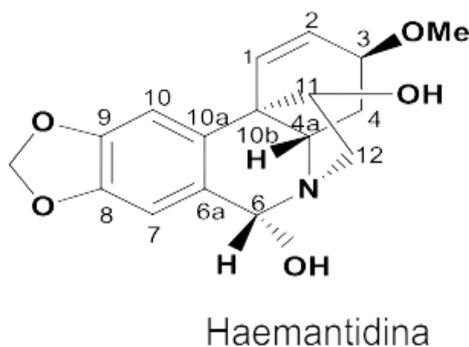
Figura 5. Acoplamento oxidativo da norbeladina



Fonte: Aquino, 2021.

A partir da formação da haemantamina, ocorre a síntese de outro alcalóide denominado hamentidina (Figura 6). A rota Biosintética desse alcalóide ocorre primeiramente pelo acoplamento oxidativo do tipo *para-para*, formando a haemantamina, que por sua vez é convertida para seu análogo 6-hidroxi, a haemantidina (Kilgore et al., 2015).

Figura 6. Estrutura haemantidina

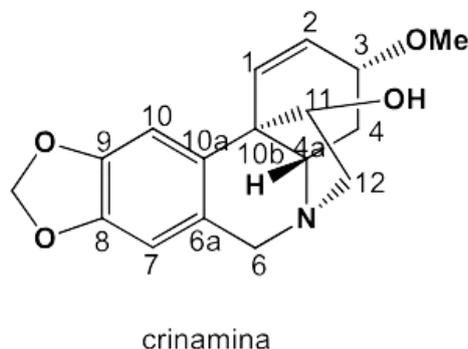


Fonte: Kilgore e Kutchan (2015)

De acordo com estudos, a haemantidina apresenta principalmente atividade antibacteriana e antiprotozoária contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e leve atividade contra *Plasmodium falciparum*. *In vitro* apresentou atividade contra células cancerígenas como A549 (células de carcinoma alveolar) e propriedades anti-inflamatórias. O alcalóide haemantidina pode ser encontrado em diversas plantas, sendo relatado nas espécies: *Lycoris radiata*, *Pancreatium canariense*, *Pancreatium maritimum*, *C. elatus*, *Haemanthus albiflos*, *Z. citrina*, *Zephyranthes robusta* (Herb. ex Sweet) Baker e *Chlidanthus fragans* Herb (Piava, 2023; Nair, 2019; Dunaquah, 2022; Harbatová, 2016).

Além da haemantidina, pela mesma rota biosintética e acoplamento oxidativo do tipo *para-para* do composto 4'-O-metilnorbeladina, ocorre a formação da crinina. Esta por sua vez sofre uma metilação no oxigênio da posição três, obtendo-se assim o alcalóide crinamina (Figura 7). A crinamina, de acordo com a literatura, pode ser encontrada nas espécies: *Crinum bulbispermum*, *Cyrtanthus falcatus*, *Boophone disticha* Herb., *Crinum asiaticum* L, *Crinum amabile*, *Crinum stuhlmannii* e *Brunsvigia radulosa*. O alcalóide é responsável por ter uma atividade antibacteriana, citostática contra células cancerígenas pancreáticas e prostáticas (Zhong et al., 2018). Além disso, em estudos apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum* e uma baixa atividade antiprotozoária (Harbatová et al., 2016; Paiva et al., 2023; Nair et al., 2019; Nair et al., 2013).

Figura 7. Estrutura crinamina



Fonte. Vigamonte (2021)

2.10 GÊNERO CRINUM

O gênero *Crinum* pertencente à família Amaryllidaceae e subfamília Amaryllidoideae, é um gênero pantropical, com aproximadamente 65 espécies em sua maioria africanas e terrestres. Possuem flores brancas com estrias rosa avermelhadas, campanuliformes e caules sem a presença de folhas (Meerow et al., 2022).

Tradicionalmente a espécie é conhecida por seu valor medicinal e ornamental devido as suas flores vistosas e a semelhança ao lírio. Segundo Nair (2019) a espécie *Crinum* é utilizada na medicina tradicional ao redor do mundo para o tratamento de hemorroidas, malária, tuberculose, ferimentos e infecções do trato urinário. As plantas da família Amaryllidaceae ganham espaço e interesse por conta de seus alcalóides isoquinolínicos e de sua variedade de atividades biológicas descritas (Ghane et al., 2018).

De acordo com estudos, a espécie *Crinum* apresenta diversas atividades farmacológicas como efeito anti-inflamatório e analgésica. Extratos obtidos do bulbo da espécie *C. asiaticum* demonstraram um efeito contra células tumorais como A549 e LOVO. Também apresentou atividade antiproliferativa e quimiossensibilizante contra células cancerígenas multirresistentes. A espécie também demonstrou efeitos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de atividade antifúngica e atividade antioxidante, sendo capaz de proteger os eritrócitos humanos. Extratos obtidos de *C. bulbispermum* apresentaram efeitos inibitórios da acetil-colinesterase devido à presença do alcalóide galantamina (Danquah et al., 2022; Ghane et al., 2018).

A espécie *Crinum scabrum*, parte da família Amaryllidaceae, apresenta escassos estudos sobre seus compostos e atividades farmacológicas estando distribuída em grande parte no sudeste brasileiro e em margens de rio no estado do Espírito Santo. De acordo

com pesquisas nas bases de dados, a espécie apresenta como principais alcalóides isolados a haemantamina, a licorine e crinamina, sendo a crinamina o composto mais abundante (Nichio-Amaral et al., 2020; Fennel, Standen, 2001).

3 HIPÓTESE

Diante da necessidade de novos agentes terapêuticos contra a leishmaniose espera-se que o extrato de *Crinum scabrum* e os alcalóides haemantidina e crinamina da família Amaryllidaceae apresentam atividade antileishmania significativa capaz de interferir na viabilidade do parasita, contribuindo para a redução da carga parasitária em modelos experimentais *in vitro*.

4 JUSTIFICATIVA

Este trabalho possui relevância devido à crescente necessidade de novos tratamentos eficazes contra a leishmaniose. Esta doença parasitária negligenciada continua a afetar milhões de pessoas globalmente, com um impacto significativo no Brasil. A resistência aos tratamentos convencionais e a toxicidade dos medicamentos atuais destaca a urgência em descobrir terapias mais seguras e eficazes. A investigação de compostos bioativos derivados de plantas, como *Crinum scabrum*, representa uma abordagem promissora, oferecendo novas possibilidades terapêuticas.

A família Amaryllidaceae é conhecida por sua diversidade de alcalóides com propriedades farmacológicas significativas, incluindo atividades antiprotozoárias comprovadas. Contudo, estudos específicos sobre a planta *Crinum scabrum* e os alcalóides da família Amaryllidaceae (crinamina e haemantidina), são escassos, o que indica um vasto campo inexplorado que pode levar a descoberta de novos agentes terapêuticos contra a doença.

Desta forma, a pesquisa contribuirá para a compreensão das propriedades farmacológicas da planta *Crinum scabrum* e seus alcalóides, além de proporcionar uma base científica sólida para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os benefícios potenciais desse estudo incluem a redução da morbidade e mortalidade associadas à leishmaniose, bem como a diminuição do estigma social e do impacto econômico da doença nas comunidades afetadas. Para a comunidade científica, esta pesquisa poderá resultar em publicações significativas, fortalecer colaborações interdisciplinares e contribuir para o avanço do conhecimento em fitoterapia e farmacognosia. Portanto, a

pesquisa visa oferecer soluções que possam melhorar significativamente o tratamento da leishmaniose e a qualidade de vida das pessoas afetadas pela doença.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é investigar a atividade antileishmania da planta *Crinum scabrum*, pertencente à família Amaryllidaceae, e dos alcalóides haemantidina e crinamina, com o intuito de identificar e caracterizar compostos bioativos com potencial terapêutico para o tratamento da leishmaniose. Para tanto, serão realizados ensaios biológicos que permitam avaliar a eficácia do extrato e dos alcalóides isolados, contribuindo para o desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas no combate a esta doença negligenciada.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaios biológicos *in vitro* com extratos de *Crinum scabrum* contra *Leishmania (L.) amazonensis*.
- Avaliar a atividade antileishmania dos alcalóides haemantidina e crinamina, isolados de plantas da família Amaryllidaceae, através de ensaios biológicos *in vitro*.
- Avaliar a citotoxicidade de extratos de *Crinum scabrum* e dos alcalóides haemantidina e crinamina em fibroblastos NIH/3T3;
- Determinar a especificidade e eficácia do extrato e alcalóides testados contra *Leishmania (L.) amazonensis*.
- Explorar o potencial dos compostos bioativos estudados como possíveis novos fármacos para tratamento da leishmaniose e contribuir para a redução do impacto da doença.

6 METODOLOGIA

6.1 PARASITOS

Este projeto consiste em um estudo *in vitro* com cepa de *Leishmania amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8), mantidas na forma promastigota a 26°C. As culturas foram cultivadas em meio Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado, 10.000 uI/mL de Penicilina e 10 mg/mL de Estreptomicina (Fermiano et al., 2024).

6.2 AMOSTRAS

Os extratos da planta *Crinum scabrum* foram preparados e fornecidos pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo. As amostras de extratos secos, assim como os alcaloides haemantidina, crinamina e o derivado de haemantidina, foram obtidos através de extração ácido-base, e então isolados e purificados utilizando diversas técnicas cromatográficas. A identificação dos alcaloides foi realizada por métodos cromatográficos e espectroscópicos, conforme descrito em estudos anteriores (TALLINI et al., 2024b). Para os experimentos de viabilidade, as amostras dos extratos foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich, USA) estéril na concentração de 100 mg/mL e armazenadas em geladeira (4°C) até serem utilizadas.

6.3 ENSAIO DE VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS

A atividade antileishmania das amostras será avaliada em células promastigotas de *Leishmania amazonensis*, utilizando diferentes concentrações que variam de 1000 a 15,6 µg/mL em meio Schneider suplementado (Sigma-Aldrich, EUA). Os parasitos serão cultivados em placas de 96 poços, com cada poço contendo 1×10^5 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e as diferentes concentrações das amostras a serem testadas. Em seguida, as placas serão incubadas a 26°C por 48 horas em uma incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (Fermiano et al., 2024). A viabilidade celular será obtida por meio do ensaio colorimétrico de resazurina (Sigma-Aldrich). Uma solução de resazurina a 0,2 mg/mL será adicionada a cada poço da microplaca, e as absorbâncias serão lidas após 4 horas de incubação a 26°C, nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm, utilizando um espectrofotômetro. Os cálculos de viabilidade celular serão realizados com base nos dados fornecidos pelo site do fornecedor AlamarBlue® (Fermiano et al., 2024). Como fármaco de referência anti-promastigota, será utilizada Anfotericina B em concentrações seriadas de 50 a 0,78 µM. Poços contendo apenas os parasitos e o meio de cultura servirão como controles positivos de viabilidade. A metade da dose inibitória mínima (IC50) será determinada através de uma curva de regressão dose-resposta, não linear, gerada pelo programa Prism 5 (GraphPad Software, EUA) (Fermiano et al., 2024).

6.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para o ensaio de citotoxicidade, utilizaremos células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, linhagem de fibroblastos de camundongo). As células serão cultivadas em placas de 96 poços, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 10.000 uI/mL de Penicilina e 10 mg/mL de Estreptomicina. As amostras serão testadas em concentrações de 1000 a 15,625 µg/mL, e a microplaca será incubada por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. Células tratadas com Anfotericina B, em concentrações que variam de 50 a 0,78 µg/mL, serão usadas como referência. Poços contendo apenas células e meio de cultura servirão como controle positivo de viabilidade. Após a incubação, será adicionada uma solução de resazurina a 0,2 mg/mL em cada poço, e as placas serão incubadas por mais 4 horas a 37°C e 5% de CO₂ para avaliação da viabilidade celular. As absorbâncias serão medidas nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. A concentração citotóxica semi-máxima (CC50) será determinada a partir de uma regressão sigmoideal da curva dose-resposta, gerada utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA) (Fermiano et al., 2024).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* para os ensaios *in vitro*, considerando que essas formas são de fácil cultivo, apresentam crescimento rápido em meio extracelular e permitem uma triagem inicial de compostos de forma ágil e de baixo custo. Embora as amastigotas sejam a forma clinicamente relevante no hospedeiro vertebrado, os ensaios com promastigotas são amplamente utilizados na fase preliminar da pesquisa, servindo como filtro para a seleção de moléculas com potencial leishmanicida. Nesse contexto, os diferentes extratos de *Crinum scabrum* foram avaliados quanto a atividade antileishmania e a viabilidade das células foi avaliada por espectrofotometria pelo método da resazurina. Os resultados obtidos foram descritos na Figura 8.

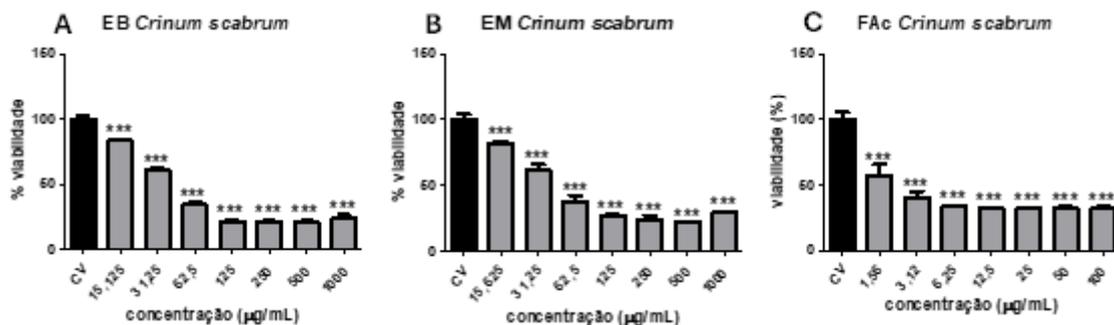


Figura 8: Atividade antileishmania dos extratos de *Crinum scabrum*. Diferentes extratos da planta foram incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – Extrato bruto (EB); B – Extrato metanólico (EM) e C – Fração acetato de etila (FAC). *** significa $p < 0,001$. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Através dos dados obtidos é possível observar que tanto o extrato bruto (EB), o extrato metanólico (EM) e a fração acetato de etila (FAC) promoveram a redução da viabilidade das formas promastigotas nas concentrações avaliadas, quando comparado ao controle de viabilidade (CV), contendo apenas parasitos com meio de cultura. No entanto, a atividade antileishmania foi mais evidente para a amostra FAC, que reduziu a viabilidade em uma concentração dez vezes menor do que os outros extratos. O EM também apresentou efeito inibitório nas condições testadas, porém em menor grau quando comparado com o EB, que obteve um desempenho superior na redução da viabilidade dos parasitos.

Os extratos de *C. scabrum* também foram avaliados quanto à citotoxicidade na linhagem celular NIH/3T3 e a viabilidade das células foi avaliada pelo método resazurina. Os resultados estão ilustrados na Figura 9.

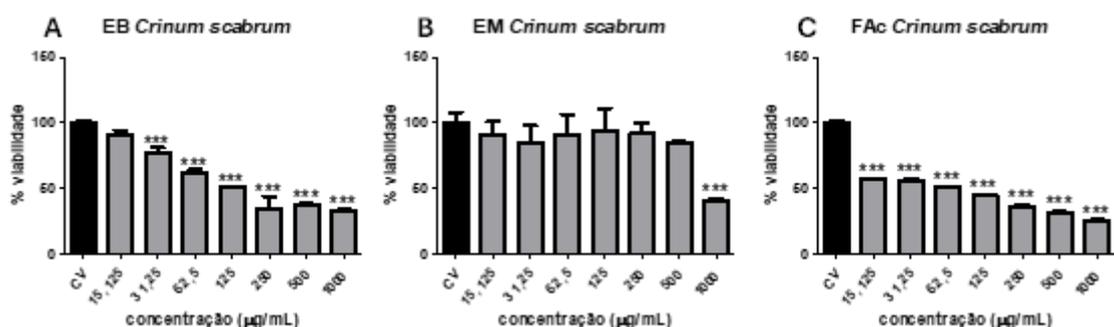


Figura 9: Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Crinum scabrum*. Extrato bruto (EB), Extrato metanólico e fração acetato de etila (FAC) foram incubados com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – Extrato bruto (EB); B – Extrato metanólico (EM) e C – Fração acetato de etila (FAC). *** significa $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

O extrato bruto (EB) e a fração acetato de etila (FAc) foram citotóxicos de forma dose dependente para as células NIH/3T3, porém em menor grau do que o observado para os parasitos. Já o extrato metanólico (EM) demonstrou melhores resultados, sendo menos citotóxico para as células e apresentando uma alta viabilidade celular mesmo em concentrações mais baixas.

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. Os resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de CI₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade das amostras de *Crinum scabrum*

Amostra	IC ₅₀ promastigotas <i>L. amazonensis</i> (µg/mL)	CC ₅₀ fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
EB <i>Crinum scabrum</i>	23,86	50,97	2,14
EM <i>Crinum scabrum</i>	25,08	>1000	>39,87
FAc <i>Crinum scabrum</i>	0,83	20,13	24,25
ANFB	0,04	39,31	982,8

CI₅₀: concentração inibitória de 50% nas células promastigotas; CC₅₀: concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC₅₀ e CI₅₀; ANFB: anfotericina B (em µM).

Observando os resultados das Figuras 8 e 9 e da Tabela 1, podemos notar que as amostras provenientes de *C. scabrum* reduziram de forma significativa e dose-dependente a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* nas condições testadas. Dentre os extratos avaliados, FAc apresentou maior atividade antileishmania, com uma CI₅₀ de 0,83 µg/mL, valor consideravelmente menor aos observados para EB e EM (23,86 e 25,08 µg/mL, respectivamente). Isso demonstra que dentre os extratos a fração acetato de etila foi aproximadamente 28 a 30 vezes mais ativa em relação ao extrato bruto e o extrato metanólico.

Considerando a citotoxicidade das amostras frente às células NIH/3T3, as amostras FAc e EB apresentaram citotoxicidade dose-dependente, sendo que EB apresentou CC₅₀ cerca de 2,5 vezes maior que FAc (50,97 e 20,13 µg/mL, respectivamente). Isso indica que dentre os compostos FAc apresenta uma maior

citotoxicidade para os fibroblastos do que EB. Por outro lado, o EM destacou-se por apresentar uma baixa citotoxicidade, com CC_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo um perfil de segurança mais favorável para as células.

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, verifica-se que FAc apresentou uma seletividade consideravelmente superior ao do EB (IS 24,25 e 2,14, respectivamente), indicando que, apesar de apresentar maior toxicidade, a fração é mais seletiva na ação contra os parasitos quando comparado ao extrato bruto. Já o EM, apresentou o maior índice de seletividade quando comparado com as demais amostras (IS >39,87), embora sua atividade antileishmania tenha sido inferior à de FAc.

Vale destacar que para a fração acetato de etila foi necessário a diminuição das concentrações para o teste de viabilidade das promastigotas, uma vez que as concentrações padronizadas (10 vezes maiores), não estavam gerando bons resultados devido à baixa viabilidade dos parasitos nessas concentrações. Portanto, é preciso levar em consideração que a CC_{50} foi calculada com concentrações 10 vezes maiores do que as utilizadas para CI_{50} .

Além dos extratos a anfotericina B (ANFB), utilizada como controle positivo e fármaco de segunda escolha para o tratamento de leishmanioses: apesar de ser bastante tóxica para as células da linhagem NIH/3T3 (CC_{50} de 39,31 μM), é bastante ativa contra o parasito (CI_{50} de 0,04 μM), o que se reflete em IS elevado de 982,8. No entanto, os resultados podem variar de acordo com as cepas de *Leishmania*, as linhagens celulares e as condições usadas em cada experimento. Apesar de se tratar de um experimento *in vitro*, os efeitos tóxicos da anfotericina B para os pacientes são bem conhecidos, como a nefrotoxicidade.

Os alcalóides de *Crinum scabrum* também foram avaliados quanto a atividade antileishmania e a viabilidade das células foi avaliada por espectrofotometria pelo método da resazurina. Os resultados obtidos foram descritos na Figura 10.

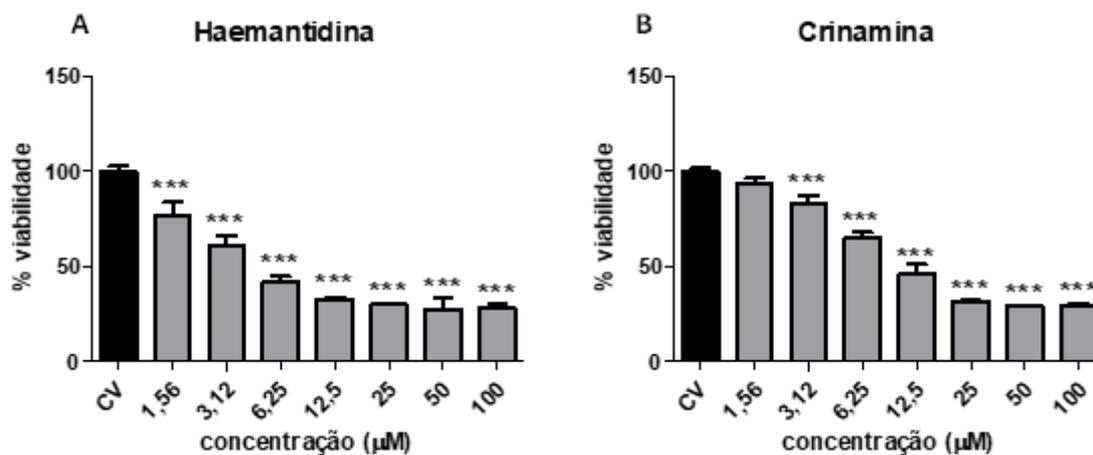


Figura 10: Atividade antileishmania dos alcalóides de *Crinum scabrum*. Diferentes alcalóides da planta foram incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – Haemantidina; B – Crinamina. *** significa $p < 0,001$. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

É possível observar que ambos os alcalóides, haemantidina e crinamina, promoveram a redução da viabilidade das formas promastigotas nas concentrações avaliadas, quando comparado ao controle de viabilidade (CV), contendo apenas parasitos com meio de cultura. No entanto, a atividade antileishmania foi mais evidente inicialmente para a haemantidina, que apresentou uma redução expressiva da viabilidade dos parasitos em concentrações mais baixas de 1,56 a 12,5 μM , e a viabilidade se manteve abaixo dos 20% nas concentrações mais elevadas (25; 50 e 100 μM). No entanto, em menores concentrações ambos os alcalóides apresentarem respostas muito próximas quanto a redução da viabilidade. Esse comportamento sugere que a haemantidina possui uma maior potência em comparação a crinamina, uma vez que sua eficácia foi mais intensa em concentrações mais baixas do alcalóide.

Os alcalóides também foram avaliados quanto à citotoxicidade na linhagem celular NIH/3T3 e a viabilidade das células avaliada pelo método resazurina. Os resultados estão ilustrados na Figura 11.

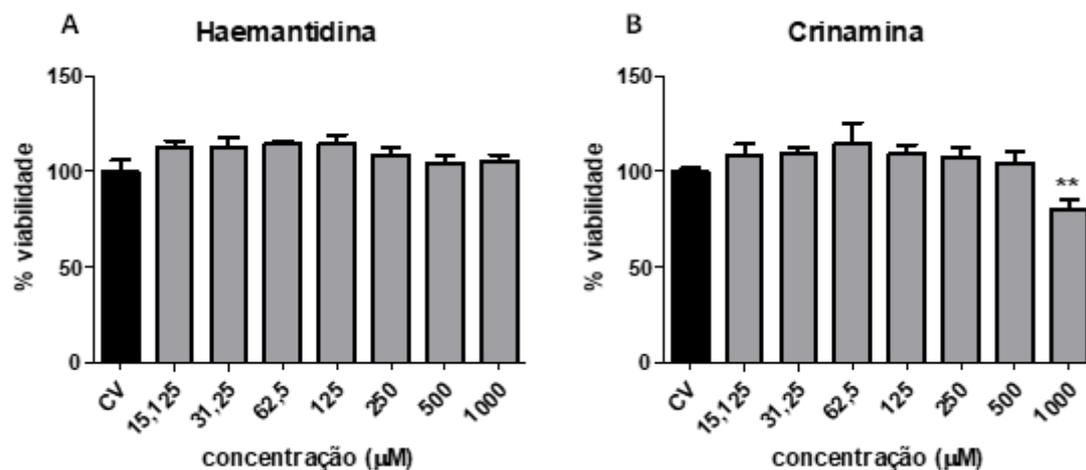


Figura 11: Avaliação da citotoxicidade dos alcaloides de *Crinum scabrum*. Haemantidina e Crinamina foram incubados com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A – Haemantidina; B – Crinamina. *** significa $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Através dos resultados obtidos, é possível verificar que ambos os alcaloides avaliados, apresentaram baixa citotoxicidade para os fibroblastos NIH/3T3 nas concentrações testadas. Para a haemantidina não foram observadas reduções significativas na viabilidade celular em nenhuma das concentrações utilizadas, o que indica um baixo perfil de toxicidade para células de mamíferos. Já o alcaloide crinamina apresentou resultados constantes de baixo perfil de toxicidade até 500 µM, e obteve uma leve redução na viabilidade celular na maior concentração testada (1000 µM). apesar disso, a viabilidade permaneceu acima de 70%, o que indica baixa toxicidade em ensaios *in vitro*.

Tabela 2: Resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade das amostras de *Crinum scabrum*

Alcaloide	IC_{50} promastigotas <i>L. amazonensis</i> (µg/mL)	CC_{50} fibroblastos NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
Haemantidina	3,08	>1000	>263,16
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).

Com os gráficos e resultados de CI_{50} , CC_{50} e IS, podemos determinar que ambas as substâncias reduziram de forma dose-dependente a viabilidade das formas

promastigotas. No entanto, o alcaloide haemantidina apresentou uma melhor resposta antileishmania, com CI_{50} aproximadamente 1,88 vezes menor que a CI_{50} obtida para a crinamina (3,08 e 5,81 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Quanto a citotoxicidade frente aos fibroblastos NIH/3T3, ambos os alcalóides obtiveram bons resultados, apresentando uma $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, o que indica um baixo perfil de toxicidade para as células de mamíferos. Além disso, a haemantidina apresentou um IS superior ao da crinamina ($>263,16$ e $>172,12$, respectivamente), indicando uma maior seletividade para o parasito.

Quanto a citotoxicidade frente aos fibroblastos NIH/3T3, ambos os alcalóides obtiveram bons resultados, apresentando uma $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, o que indica um baixo perfil de toxicidade para as células de mamíferos. Além disso, a haemantidina apresentou um IS superior ao da crinamina ($>263,16$ e $>172,12$, respectivamente), indicando uma maior seletividade para o parasito.

O índice de seletividade (IS) é uma ferramenta fundamental na avaliação de substâncias bioativas, sendo calculado pela razão entre a concentração citotóxica semi-máxima (CC_{50}) em células de mamíferos e a concentração inibitória efetiva (IC_{50}) contra o parasito. Esse parâmetro é particularmente relevante em investigações com extratos naturais. De modo geral, valores de IS acima de 10 são considerados encorajadores, uma vez que indicam maior toxicidade para o parasita em relação às células hospedeiras, refletindo um perfil de seletividade favorável (Mikus & Steverding, 2000; Rayan et al., 2017).

Para compostos puros e em estágios mais avançados de desenvolvimento, são desejáveis valores ainda mais elevados, como $IS > 20$ ou até superiores a 50, visando assegurar níveis adequados de segurança e eficácia (Gervazoni et al., 2020). É importante salientar que, no caso de extratos brutos ou frações, é comum observar variações no IS, em função da complexidade da matriz química. Ainda assim, esses dados são relevantes para a triagem de espécies vegetais com potencial para isolamento de moléculas bioativas. Dessa forma, a aplicação do IS como critério de seleção auxilia na identificação de amostras promissoras e menos citotóxicas, direcionando os estágios iniciais do desenvolvimento de agentes antileishmania.

Em 2019, Nair e van Staden publicaram uma revisão sobre a atividade antiprotozoária descrita para alcalóides da família Amaryllidaceae, entre eles os alcaloides do tipo crinano, amplamente distribuídos na família Amaryllidaceae,

apresentam grande diversidade estrutural e são subdivididos em α - e β -crinanos, incluindo a crinamina e a haemantidina. Dentre eles, destaca-se a crinamina, um alcaloide do subtipo α -crinano, isolado de extratos metanólicos de bulbos frescos de *Crinum stuhlmannii*, que demonstrou atividade antiparasitária específica contra *Entamoeba histolytica*, com um valor de IC₅₀ de 0,53 $\mu\text{g/mL}$, desempenho próximo ao do fármaco padrão omnidazol (IC₅₀ 0,28 $\mu\text{g/mL}$). Esse resultado posiciona a crinamina como um composto promissor no desenvolvimento de agentes antiprotozoários, ainda que sua atividade tenha sido limitada a um único parasito nesse estudo inicial. Outros alcaloides crinanos relacionados apresentaram atividades variadas, muitas vezes inferiores aos padrões utilizados, sendo a crinamina uma das poucas com desempenho relevante frente a *E. histolytica*. Já a haemantidina demonstrou atividade contra os parasitos *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. cruzi*, com valores de IC₅₀ de 1,1 e 1,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses resultados indicam um potencial efeito antitripanossomatídeo seletivo, embora não tenha sido observada atividade frente a *Leishmania donovani* nos estudos citados. (Nair; van Staden, 2019).

8 CONCLUSÃO

Os extratos e os alcalóides isolados apresentaram atividade promissora contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em ensaios *in vitro*. Para os extratos, a fração acetato de etila foi a que obteve maior atividade antileishmania. Por outro lado, o extrato metanólico apresentou o menor perfil de atividade contra os parasitos entre os compostos testados, mas obteve um maior perfil de segurança para a linhagem de fibroblastos e uma boa seletividade.

Os alcalóides haemantidina e crinamina também demonstraram capacidade de reduzir significativamente e de forma dose-dependente a viabilidade dos parasitos. Embora apresentem uma menor eficácia antiparasitária se comparado a FAc, ambos apresentaram baixa citotoxicidade para a linhagem de fibroblastos, o que sugere um bom potencial terapêutico. A haemantidina ainda apresentou uma atividade antileishmania 1,88 vezes menor e uma maior seletividade ao parasito do que a crinamina, obtendo os melhores resultados entre os compostos testados. Essa característica pode estar relacionada a diferenças estruturais e a interação com os alvos bioquímicos.

Apesar dos experimentos gerarem bons resultados, nenhuma das amostras atingiu 100% de inibição da viabilidade nas condições testadas, assim como não chegaram ao

perfil de atividade da Anfotericina B. No entanto, os resultados obtidos demonstram o potencial de *Crinum scabrum*, principalmente dos alcaloides como fontes de bioativos com atividade contra os parasitos de *L. amazonensis*. No entanto, faz-se necessário a realização de novos estudos, como ensaios com amastigotas de *L. amazonensis*, avaliação *in vivo* do perfil de viabilidade e citotoxicidade, assim como a elucidação dos mecanismos de interação das substâncias com os parasitos, para que assim possa ser validada a utilização desses compostos como possíveis fármacos para o tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

BASTIDA, Jaume; LAVILLA, Rodolfo; VILADOMAT, Francesc. Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids. In: **The Alkaloids. Chemistry and Biology**. p. 87–179, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133715/>. Acesso em: 13 jun. 2024.

BASTIDA, Jaume; BERKOV, Strahil; TORRAS-CLAVERIA, Laura; et al. **Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids**. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/250614909_Chemical_and_biological_aspects_of_Amaryllidaceae_alkaloids. Acesso em: 13 jun. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: http://bvs.ms.saude.gov.br/bvs/publicações/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em:

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2024**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: https://bvsm.ms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_2024.pdf. Acesso em: 09 jun. 2024.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126638/>. Acesso em: 29 jun. 2024.

CECÍLIO, P., Cordeiro-Da-Silva, A., & Oliveira, F. (2022). Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. *Communications Biology*, 5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z>. Acesso em: 05 jul. 2025.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed. v. 1. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2013.

COSTA, Jackson Mauricio et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. *Fiocruz.br*, 2024. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9731>. Acesso em: 20 jun. 2024.

COSTA, C. H. N. et al. From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, Basel, v.12, n.7, p.969, 24 jul. 2023. DOI:10.3390/pathogens12070969. Acesso em: 07 jul. 2025.

DANQUAH, Cynthia Amaning; AMANKWAH, Prince; AGANA, Theresa A.; et al. The Phytochemistry and Pharmacology of Tulbaghia, Allium, Crinum and Cyrtanthus: “Talented” Taxa from the Amaryllidaceae. *Molecules*, v. 27, n. 14, p. 4475, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/14/4475>. Acesso em: 11 jun. 2024.

DVORAK, V. et al. Parasite Biology: The Vectors. In: **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. 2018. p. 31–77. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-72386-0_3. Acesso em: 15 jun. 2024.

FERMIANO, M.H.; das Neves, A.R.; da Silva, F.; Barros, M.S.A.; Vieira, C.B.; Stein, A.L.; Frizon, T.E.A.; Braga, A.L.; de Arruda, C.C.P.; Parisotto, E.B.; et al. Selenium-Containing (Hetero)Aryl Hybrids as Potential Antileishmanial Drug Candidates: In Vitro Screening against *L. amazonensis*. *Biomedicines* 2024, 12, 213. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010213>. Acesso em: 08 jun. 2024.

FERREIRA, Marcelo Urbano. **Parasitologia contemporânea**. 2.ed. Rio De Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2021.

FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. Crinum species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, n. 1, p. 15–26, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874101003051?via%3Dihb>. Acesso em: 14 jun. 2024.

Folhas de artemisia annua l. (asterolacea) com atividade antileishmania no tratamento da leishmaniose tegumentar em humanos. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/55132/40639>. Acesso em: 09 jun. 2024.

GERVAZONI, L.; BARCELLOS, G.; FERREIRA-PAES, T.; ALMEIDA-AMARAL, E. **Use of natural products in leishmaniasis chemotherapy: an overview**. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.579891/full>. Acesso em: 10 jun. 2024.

HABARTOVÁ, K.; CAHLÍKOVÁ, L.; ŘEZÁČOVÁ, M.; HAVELEK, R. **The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity**. *Natural Product Communications*, v. 11, n. 10, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30549626/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

JIN, Zhong; YAO, Guangmin. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. **Natural product reports**, v. 36, n. 10, p. 1462–1488, 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/np/c8np00055g>. Acesso em: 11 jun. 2024.

KILGORE, Matthew B; KUTCHAN, Toni M. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. **Phytochemistry reviews**, v. 15, n. 3, p. 317–337, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914137/>. Acesso em: 13 jun. 2024.

MARTINS, Amely Branquinho. Avaliação do potencial antileishmania dos compostos naturais isolados ácido úsnico, cumarin, quercetina e reserpina sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania Chagasi*. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6691>. Acesso em: 23/05/2025.

FD Rego, RP Soares. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/NbnKTGb4D9HrH64PHbfsQsN/#>. Acesso em: 05 jul. 2025.

MCNULTY, James; NAIR, Jerald J; CODINA, Carles; *et al.* Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1068–1074, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942207000246>. Acesso em: 13 jun. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da LT. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacaoepidemiologica>. Acesso em: 17 jun. 2024.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, v. 146, n. 3, p. 232–246, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S015196381930047X?via%3Dihub>. Acesso em: 29 jun. 2024.

NAIR, Jerald J; JOHANNES VAN STADEN. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 262–275, 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513005887?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=89223f921a6e7df4. Acesso em: 11 jun. 2024.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 13ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NICHIO-AMARAL, Renara; CAMPOS-ROCHA, Antônio; ALVES-ARAÚJO, Anderson. **Flora do Espírito Santo: Amaryllidaceae**. Rodriguésia, v. 71, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/HdcV3PkR9nNT6MwHZyLP8Hk/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

PAIVA, M; NASCIMENTO, L; I. A. M. DAMASCENO; *et al.* Pharmacological and toxicological effects of Amaryllidaceae. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/bMznmW7V3qB4MrdhTV mK4Zh/?lang=en>. Acesso em: 11 jun. 2024.

PEÑA MS, TANG FHF, FRANCO FAL, *et al.* *Leishmania (L.) amazonensis* LaLRR17 increases parasite entry in macrophage by a mechanism dependent on GRP78. *Parasitology*. 2023;150(10):922-933. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10577668/>. Acesso em: 06 jul. 2025.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SOTO-VÁSQUEZ, Marilú Roxana; VANESSA, Madeleine; TALLINI, Luciana R; *et al.* Chemical Composition and In Vitro Antiplasmodial Activity of the Total Alkaloids of the Bulbs of Two Amaryllidaceae Species from Northern Peru. **Pharmacognosy Journal**, v. 13, n. 4, 2021. Disponível em: <https://www.phcogj.com/article/1630>. Acesso em: 13 jun. 2024.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2017.

SILVA, A. P. da, MEDEIROS, E. B., GOMES NETTO, J. L. de M., & WANDERLEY, F. S. (2021). Estudo epidemiológico de Leishmaniose Tegumentar Americana em Alagoas,

no período de 2010 à 2018. *Diversitas Journal*, 6(2), 2351–2364. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v6i2-1550>. Acesso em: 05 jul. 2024.

VIGAMONTE, Faviola Aquino. **Caracterização química de alcaloides em *Crinum scabrum*. Herb. (Amaryllidaceae).** Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFES_34450ca725cf1371eed302532e759af2. Acesso em: 14 jun. 2024.

WIJERATHNA T, GUNATHILAKA N. Morphological identification keys for adults of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):450. Published 2020 Sep 7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32894177/>. Acesso em: 05 jul. 2025.