

## Introdução

A família botânica Amaryllidaceae é conhecida desde a Antiguidade, devido à utilização de suas espécies na medicina tradicional. As diversificadas atividades terapêuticas destas espécies são atribuídas especialmente aos seus alcaloides, pertencentes à classe dos isoquinolínicos (presentes principalmente na família Amaryllidaceae), em concentrações e variedades estruturais muito interessantes <sup>1</sup>. Até o momento cerca de 500 alcaloides estruturalmente distintos já foram isolados, sendo que das 110 espécies existentes ainda restam muitas por serem investigadas <sup>2</sup>. Alcaloides desta família tem demonstrado atividades biológicas importantes, incluindo antiviral, citotóxica, antitumoral e pró-apoptótica <sup>3</sup>. O gênero *Hippeastrum*, tem grande ocorrência na América do Sul, sendo que no Estado do Rio Grande do Sul já foram relatadas 8 espécies, tornando este fato um atrativo para o desenvolvimento de novas investigações químicas. Estudos prévios do conteúdo alcaloídico em *Hippeastrum* revelam a ocorrência principal dos seguintes núcleos: licorina e tazetina, seguido por montanina e crinina <sup>4</sup>. *Trichomonas vaginalis* é o parasito causador da tricomonose, reside no trato urogenital do homem e da mulher causando vaginite, uretrites e prostatites <sup>5</sup>. Diversas consequências na saúde de pacientes com tricomonose estão relatadas, incluindo complicações na gestação, infecções associadas à doença inflamatória pélvica, predisposição ao câncer cervical, aumento dos riscos de infertilidade e infecções pelo HIV <sup>6</sup>. E por não possuir mitocôndrias, utiliza os hidrogenossomos para produzir energia <sup>7</sup>.

## Resultados e Discussão

A partir do extrato B de *Hippeastrum morelianum* Lem. (vide figura 1) foi realizada cromatografia líquida à vácuo em sílica gel com diferentes eluentes, sendo que a fração eluída com *n*-butanol foi purificada em cromatografia em coluna isolando-se o alcaloide candimina. A partir do extrato B de *Hippeastrum santacatarina*, isolou-se o alcaloide licorina através de cromatografia em coluna.

A integridade estrutural dos alcaloides foi avaliada após incubação com *T. vaginalis* durante 24h. A licorina mostrou-se intacta após recuperação a partir do meio de cultura e avaliação do perfil cromatográfico em CLAE-PDA em comparação ao padrão de referência. Por outro lado, de acordo com a mesma análise cromatográfica a candimina recuperada do meio de cultura apresentou variações no tempo de retenção em relação ao padrão de referência. A partir desses dados e considerando a possível instabilidade do anel lactona presente na candimina sugere-se que durante o metabolismo do parasito possa ocorrer uma hidrólise e consequente abertura do anel. Esses resultados preliminares indicam que alguma modificação estrutural poderia ocorrer na molécula da candimina durante a incubação com *T. vaginalis* enquanto a licorina permanece intacta (Fig. 2).

Para o ensaio de citotoxicidade dos alcaloides frente ao parasito *T. vaginalis*, uma curva de crescimento foi desenvolvida, com o isolado clínico TV-VP60, onde a cinética de crescimento dos parasitos foi avaliada na presença e na ausência de alcaloides. Considerando os resultados da licorina verifica-se que o número máximo de parasitos tratados é similar ao controle com um atraso de 12h, considerando ambos os inóculos iniciais (Fig. 3A). Quando os trofozoítos tratados foram centrifugados após 12h e inoculados em meio novo, sem licorina, desenvolveram uma curva de crescimento idêntica ao controle (Fig. 3B). Os resultados para candimina verifica-se que após 60h de incubação a curva de parasitos tratados atingiu os mesmos valores do controle (Fig. 4A). Quando os trofozoítos foram centrifugados após 12h e inoculados em meio novo, sem candimina, desenvolveram uma curva de crescimento idêntica ao controle (Fig. 4B), assim como observado para licorina no mesmo experimento. Uma possibilidade para entendimento desses resultados é que uma parcela dos trofozoítos não afetados pelos alcaloides seriam os responsáveis pelo aumento do número total de trofozoítos observados na curva de crescimento. E a reversão do efeito citotóxico sugere que o efeito dos alcaloides não é persistente, ou seja, na ausência recupera a cultura.

## Perspectivas

A multidisciplinaridade deste trabalho, assim como os intrigantes aspectos envolvidos nas questões de morte celular de amitocôndriados abrem algumas perspectivas como a continuidade da investigação química da família Amaryllidaceae, especialmente de seus alcaloides; continuação da investigação antiparasitária e nanoencapsulação destes alcaloides visando direcionar a substância ativa.

## Referências

- COOK, J. W.; LOUDON, J. D.; MCCLOSKEY, P. Dehydration of lycorine. *Journal of the Chemical Society*, p. 4176-4181, 1954.
- ZHONG, J. Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Natural Products Report*, v. 22, p. 11-126, 2007.
- LEWIS, J. R. Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Products Reports*, v.7, p. 549-556, 1989.
- HOFMANN JUNIOR, A. E.; SEBEN, C.; SOBRAL, M.; DUTILH, J. H. A.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. S. Alkaloids of *Hippeastrum glaucescens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 1455-1456, 2003.
- WHO, 2001. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. WHO, Geneva, p. 1-120.
- JOHNSTON, V. J.; MABEY, D. C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 21, p. 56-64, 2008.
- MILER, W. C.; SWYGARD, H.; HOBBS, M. M.; MARCIA, M.; FORD, C. A.; HANDCOCK, M. S.; MORRIS, M.; SCHMITZ, J. L.; COHEN, M. S.; HARRIS, K. M.; UDRY, J. R. The prevalence of *Trichomonas* in young adults in the United States. *Sexual Transmitted Diseases*, v. 32, p. 593-598, 2005.

## Materiais e Métodos

Bulbos secos de *Hippeastrum morelianum* e *Hippeastrum santacatarina* foram triturados em moinho de facas, sendo cada um submetido a maceração em etanol 96 % por 24 horas e posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório. O marco vegetal foi recolocado em maceração, repetindo-se o processo descrito anteriormente até reação negativa frente aos reativos de precipitação de alcaloides, obtendo-se, assim, um extrato bruto, que foi submetido à extração ácido-básica de alcaloides (Fig. 1).

Para a realização da avaliação farmacológica, o isolado clínico TV-VP60 e o isolado padrão 30236 de *Trichomonas vaginalis* foram cultivados em meio Trypticase- Extrato de Levedo- Maltose (TYM) pH 6,0 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado, a 37°C. Foram realizadas análise por CLAE-PDA e ensaio de citotoxicidade (experimentos com cinética de crescimento).

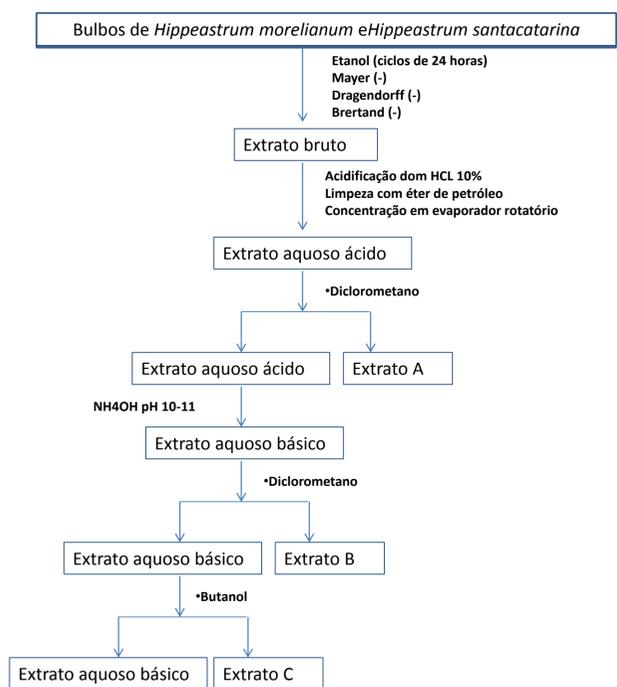


Fig.1. Obtenção dos extratos de alcaloides.

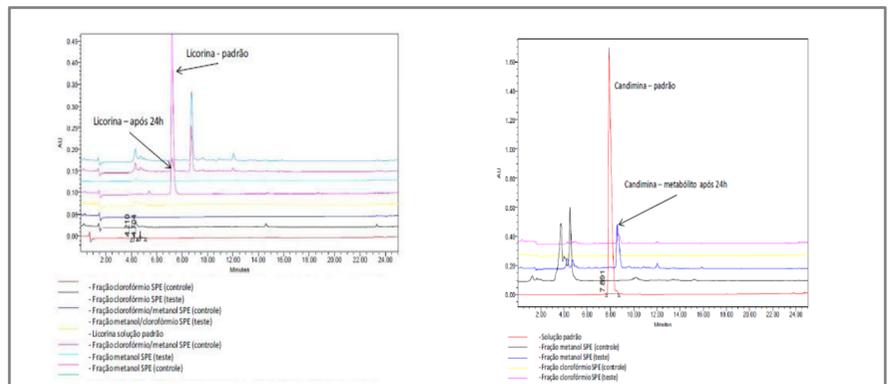


Fig.2. Cromatograma demonstrando o perfil dos alcaloides após incubação com *T. vaginalis*.

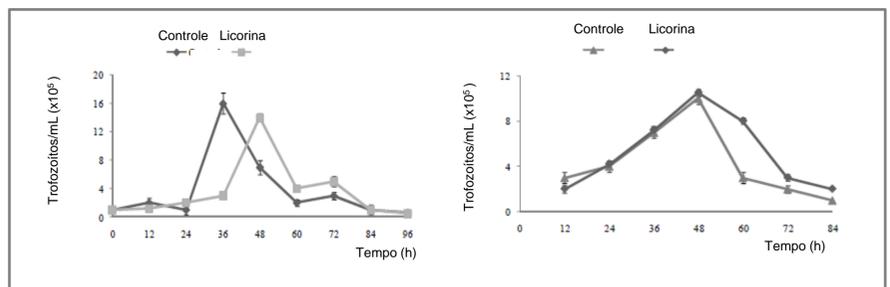


Fig.3A: Número máximo de parasitos tratados é similar ao controle com um atraso de 12 horas.

Fig.3B: Quando centrifugados após 12 horas e inoculados em meio novo (sem licorina), curva de crescimento idêntica ao controle.

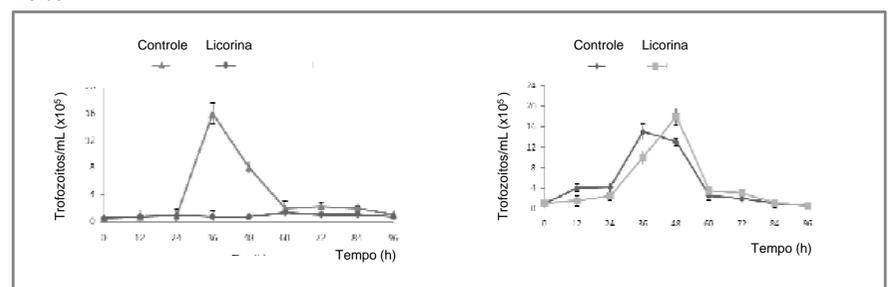


Fig.4A: Número máximo de parasitos tratados é similar ao controle com um atraso de 12 horas.

Fig.4B: Quando centrifugados após 12 horas e inoculados em meio novo (sem candimina), curva de crescimento idêntica ao controle.