

## Estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de alcaloides frente a *Giardia Lâmblia*

*In vitro*, *in vivo* and *in silico* studies of alkaloids against *Giardia Lamblia*

Estudios *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de alcalóides contra *Giardia Lamblia*

Recebido: 06/12/2021 | Revisado: 10/12/2021 | Aceito: 26/02/2022 | Publicado: 08/03/2022

**Daniela Macedo Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9935-177X>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: dm8687@gmail.com

**Ademir Macedo Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5678-2740>  
Universidade de Pernambuco, Brasil  
E-mail: ademir.nascimento@upe.br

### Resumo

A técnica *In Silico* seleciona e otimiza a escolha dos melhores processos em uma matriz de interesse, já o estudo *In Vitro* é realizado em placas de Petri com culturas celulares. O estudo *In Vivo* proporciona mensurar os efeitos da espécie a ser estudada. Neste caso, o alcalóide será injetado tanto nas culturas celulares como nos estudos *in vivo*, para indicar toxicidade, eficiência e seus efeitos posteriores. Serão analisados alcalóides ou outros tipos de compostos que geram fármacos. Os alcalóides são metabólitos secundários que se caracterizam por serem uma estrutura cíclica com nitrogênio e par de elétrons livres, sendo muito reativos e apresentando aplicações nas áreas farmacêuticas e medicinais. A *Giardia Lamblia* é um protozoário patogênico cuja transmissão é por intermédio de água e alimentos contaminados, sendo responsável pela doença giardíase, que apresenta alguns sintomas como dores abdominais, diarreia e causa milhões de mortes por ano em todo o mundo.

**Palavras-chave:** *In silico*; *In vivo*; *In vitro*; Alcalóide; *Giardia lamblia*.

### Abstract

The *In Silico* technique selects and optimizes the choice of the best processes in a matrix of interest, while the *In Vitro* study is performed in Petri dishes with cell cultures. The *In Vivo* study provides the measurement of the effects of the species to be studied. In this case, the alkaloid will be injected both in cell cultures and in *in vivo* studies, to indicate toxicity, efficiency and its subsequent effects. Alkaloids or other types of compounds that generate drugs will be analyzed. Alkaloids are secondary metabolites that are characterized by being a cyclic structure with nitrogen and free electrons, being very reactive and presenting applications in the pharmaceutical and medicinal areas. *Giardia Lamblia* is a pathogenic protozoan whose transmission is through contaminated water and food, being responsible for the disease giardiasis, which has some symptoms such as abdominal pain, diarrhea and causes millions of deaths per year worldwide.

**Keywords:** *In silico*; *In vivo*; *In vitro*; Alkaloid; *Giardia lamblia*.

### Resumen

La técnica *In Silico* selecciona y optimiza la elección de los mejores procesos en una matriz de interés, mientras que el estudio *In Vitro* se realiza en placas Petri con cultivos celulares. El estudio *In Vivo* proporciona la medición de los efectos de las especies a estudiar. En este caso, el alcaloide se inyectará tanto en cultivos celulares como en estudios *in vivo*, para indicar toxicidad, eficacia y sus efectos posteriores. Se analizarán alcaloides u otro tipo de compuestos que generen drogas. Los alcaloides son metabolitos secundarios que se caracterizan por ser una estructura cíclica con nitrógeno y electrones libres, siendo muy reactivos y presentando aplicaciones en las áreas farmacéutica y medicinal. *Giardia Lamblia* es un protozoo patógeno cuya transmisión es a través de agua y alimentos contaminados, siendo el responsable de la enfermedad giardiasis, que presenta algunos síntomas como dolor abdominal, diarrea y causa millones de muertes al año en todo el mundo.

**Palabras clave:** *In silico*; *In vivo*; *In vitro*; Alcaloide; *Giardia lamblia*.

## 1. Introdução

Os alcaloides são compostos cíclicos, que possuem nitrogênio e pares de elétrons livres, apresentam basicidade. Encontrado principalmente em plantas, é muito utilizado no meio medicinal.

Os alcalóides podem ser encontrados em micro-organismos, organismos marinhos, animais e plantas, que exibem os mesmos em sua composição, utilizados por muitas décadas (Naidoo et al., 2021; Nett et al., 2020; Porto et al., 2020).

Podem ser divididos em 25 subgrupos, com 1850 estruturas químicas conhecidas até o momento, por sua variedade de estruturas, complexidade e basicidade, forma sais que são muito solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos (Acosta-Virgen et al., 2018; Kornpointner et al., 2020; Naidoo et al., 2021).

Estas propriedades facilitam alguns processos como a extração, fracionamento e alguns fatores podem provocar a decomposição do alcalóide são estes: aquecimento, pH e luz (Castilhos et al., 2007; Jarrad et al., 2016).

A *Giardia Lamblia* é um protozoário patogênico, encontrado principalmente em água e alimentos contaminados, como também, em regiões com pouco ou nenhum tipo de saneamento básico, a mesma causa a doença Giardíase, que provoca milhões de mortes por ano no mundo (Kornpointner et al., 2020; Xu et al., 2019).

O estudo *in silico* é justificado porque através dele é realizada uma triagem dos alcalóides com objetivo de posteriormente obter um banco de dados, onde será realizado cálculo dos descritores moleculares e estudos de similaridade para estudar a inibição da atividade da *Giardia Lamblia* (Kornpointner et al., 2020; Xu et al., 2019).

Os estudos *in vitro* e *in vivo* possuem importância devido ao estudo *in vitro*, primeiramente obter a extração dos alcalóides e sua caracterização, o estudo *in vivo* se constitui na testagem em animais para visualizar os efeitos dos alcalóides nos mesmos (Deyon-Jung et al., 2016; Muratov et al., 2020).

### 1.1 Exemplos de alcalóides

Alguns dos principais alcalóides utilizados são (Jarrad et al., 2016):

- Taxol que é empregado para o câncer.
- *Lycopodium* e seus derivados são aplicados no tratamento de Alzheimer.
- *Cinchona* é empregado contra a malária
- A morfina é utilizada como analgésico.

Alcalóides marinhos têm sido empregados como agente anticâncer e seus derivados exibem a mesma aplicação (Toro-Uribe et al., 2018).

Vinte e cinco por cento dos alcalóides são utilizados nas áreas medicinais e farmacêuticas, estas substâncias naturais são isoladas de plantas, tem múltiplas aplicações como na biotecnologia, na indústria alimentícia, cosméticos, é empregado na citotoxicidade de células cancerígenas e atividades antivirais (Kutchan, 1996; Naidoo et al., 2021; Nett et al., 2020).

### 1.2 Classificação dos alcalóides

Os alcalóides derivados de sua origem botânica (Jarrad et al., 2016; Kornpointner et al., 2020; Muratov et al., 2020; Xu et al., 2019):

- Rubiaceae que exibe o gênero *Psychotria*, compreende várias espécies distribuídas nos trópicos.
- Indol, o mesmo exibe propriedades farmacológicas e são distribuídos em Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae Juss, subdivididos em monômero índole e triptamina índole, monoterpeneoide indole.
- A Portulacaceae que exibe diversas aplicações medicinais, são estas: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e neuroprotetora.
- Os alcalóides isoquinolina são distribuídos em subespécies que são as Papaveraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae, e Menispermaceae.
- A piridina pode ser subdividida em quinolina e indolizidine, são distribuídos em subespécies, são elas: Palmaceae,

Leguminosae, Zingiberaceae e Solanaceae.

- Os esteróides são encontrados nas plantas Solanaceae, Liliaceae, Apocynaceae e Buxaceae.

### 1.3 Aplicação dos alcalóides e métodos de caracterização

Empregados na área farmacêutica, para o emprego e desenvolvimento de novos fármacos, como também em sínteses comerciais, como é o caso da morfina e da codeína (Acosta-Virgen et al., 2018; Castilhos et al., 2007; Nishiyama et al., 2020).

### 1.4 Técnicas de Caracterização

Algumas técnicas de caracterização são utilizadas para a elucidação de suas estruturas, dentre elas (Nishiyama et al., 2020):

1. O Infravermelho
2. UV-VIS(Ultravioleta-Visível), cuja banda característica está na região de comprimento de onda entre 254 e 259 nanômetros, característicos de alcalóides aromáticos.

### 1.5 Giardíase

#### 1.5.1 Características e Disseminação (Gargantini et al., 2016)

A giardíase é causada por um protozoário patogênico, é uma das mais frequentes infecções parasitárias, está presente no ciclo da vida em duas distintas formas: trofozoite proliferativo e um cisto resistente infeccioso denominado Giardia (Gargantini et al., 2016).

Os primeiros sintomas da Giardíase ocorre de uma a duas semanas após a contaminação, exibe algumas sequelas posteriores, são elas (Rodrigues et al., 2012):

- Dores abdominais
- Desnutrição
- Náusea
- Fadiga
- Mal- estar
- Perda de Peso
- Podendo chegar a morte

Giardia Lamblia, também conhecida por Giardia intestinalis, é um microorganismo unicelular eucariótico, que afeta o intestino, é uma das causas mais comuns da diarreia e contamina milhões de pessoas por ano no mundo (Gargantini et al., 2016).

A sua contaminação ocorre via trato fecal-oral, pela ingestão de cisto através de água e alimentos contaminados, onde posteriormente ataca a mucosa do intestino, em países desenvolvidos, a estimativa de contaminação é de 2 a 7%, já em países menos desenvolvidos há um aumento de casos para 30% (Bendaif et al., 2018).

A origem da contaminação pelo protozoário Giardia Lamblia que provoca a doença giardíase pode ser por meio antropogênico, infectando humanos e algumas espécies de animais como gatos e cachorros (Rognan, 2017).

## 2. Metodologia

### 2.1 Representação das estruturas das moléculas

Para a representação das moléculas na forma computacional, era necessário, desenvolver um método inovador, pois a

representação gráfica, não era possível na química computacional.

Destaca-se o método estrutural de linhas denominado de Wiswesser Line Notation (WLN), o mesmo é empregado na triagem de subestruturas e apresenta como desvantagem a não formação do código canônico (Acosta-Virgen et al., 2018).

## 2.2 Representação das estruturas das moléculas

Em 1960, Harry Morgan desenvolveu um algoritmo que representava estruturas químicas numéricas para cada espécie química (Xu et al., 2019).

David Weininger desenvolveu a primeira versão do SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System), considerou a teoria dos grafos para a proposta de suas estruturas, no SMILES há informações isotópicas das estruturas, assim como configurações sobre ligações duplas e quiralidade (Xu et al., 2019).

## 2.3 Descritores Moleculares

É definido como uma sequência numérica que representa estruturas químicas, sua origem é por meio de um procedimento matemático que através de representações simbólicas da molécula, em informações codificadas, o descritor pode ser representado de duas formas: como matriz e na forma de bits (Muratov et al., 2020).

A classificação dos descritores é dada abaixo (Nett et al., 2020):

Quanto a sua dimensão em:

1. Unidimensional
2. Bidimensional
3. Tridimensional.

Quanto a sua natureza podem ser (Muratov et al., 2020):

1. Constitucionais
2. Topológicos,
3. Geométricos, Eletrostáticos
4. Mecânicos Quânticos.

## 2.4-Similaridade química

Segundo conceito, quanto mais similares as estruturas forem, mais prováveis são de apresentarem propriedades químicas e biológicas semelhantes e pode ser determinado o cliff de atividade, nada mais é que um par de estruturas químicas semelhantes, mas que apresentam propriedades diferentes (Youssef & Singab, 2021).

A partir da similaridade química é possível determinar erros nos experimentos e os cliffs de atividades que são caracterizados por serem pares de estruturas químicas semelhantes, porém com propriedades químicas diferentes. O cálculo da similaridade química em uma molécula é realizado aplicando o coeficiente de similaridade aos descritores moleculares, destacando-se o coeficiente de Tanimoto e a distância Euclidiana.

## 2.5 Histórico do estudo QSAR

Hansch e Fujita desenvolveram a base dos estudos QSAR demonstrando que a atividade biológica tem relação com outras propriedades das moléculas estudadas, enquanto Free e Wilson estudaram como descrever a atividade biológica através de equações congêneres (Rognan, 2017).

Em 1980, com o estudo das estruturas 3D, foi aprimorado o desenvolvimento e aplicação de estruturas QSARS e Hopfinger e sua equipe desenvolveu um método com base em sua fórmula molecular denominado análise da fórmula molecular (MAS) que emprega a análise conformacional. Posteriormente em 1988 Kramer e colaboradores desenvolveram a análise comparativa de campos moleculares (COMFA), utiliza descritores 3D estéricos e empregando o método dos mínimos quadrados (Rognan, 2017).

Posteriormente foi implantada a Análise comparativa de índices de similaridade molecular. Existem também outros modelos QSAR, como o 4D, os modelos são calculados após a obtenção de uma simulação de dinâmica molecular. O descritor 5D permite uma variedade de conformações de suas estruturas.

A aplicação dos modelos QSAR vai desde a otimização dos compostos até a descoberta e avaliação dos mesmos.

## 2.6 Modelos QSAR

Estes modelos podem ser representados por uma equação matemática que relaciona as propriedades químicas e biológicas (Kutchan, 1996).

A atividade biológica é calculada de forma experimental, a representação matemática é dada a seguir (Toro-Uribe et al., 2018):

$$P=K'(D1+D2+D3)$$

No qual

1. Representação dos dados

2. Otimização da hipótese é a atividade biológica e D são os descritores e K é um peso definido para o cálculo do algoritmo.

Podem ser divididos em (Kutchan, 1996; Nett et al., 2020):

- Globais, emprega uma Classificação dos modelos QSAR
- Conjunto de moléculas, onde podem haver subgrupos que possuem similaridade em suas estruturas
- Locais são o subconjunto de um conjunto maior como os modelos globais.

## 2.7 Método de aprendizado de máquina

É desenvolvido em três etapas:

Generalização

A hipótese é desenvolvida para a obtenção de uma relação entre os descritores e sua atividade biológica, é otimizada a depender de qual algoritmo será selecionado e é utilizado e posteriormente, a hipótese é testada avaliando um conjunto teste (Porto et al., 2020).

Identificação de padrões de um conjunto de dados, baseado nos descritores, algumas de suas aplicações são:

Determinação da variedade de estruturas do conjunto de dados, da consistência dos dados obtidos experimentalmente e identificação de possíveis interferências que influenciam na atividade (Rognan, 2017).

## 3. Resultados e Discussão

Técnicas estudadas: In silico, In vitro e In vivo Características e Origem.

As técnicas in silico, também denominada computacionais, têm sido desenvolvidas para a descoberta de novos fármacos, com o auxílio da quimioinformática, realiza o estudo das propriedades estruturais, físico químicas, bioquímicas, farmacológicas e toxicológicas para a predição e desenvolvimento de um novo fármaco (Xu et al., 2019).

Os descritores moleculares são propriedades características de cada molécula, é estudado no método *in silico*.

O termo quimioinformática foi criado por Frank Brown, em 1998, engloba os seguintes itens: representação, visualização, manipulação com posterior processamento dos dados das estruturas químicas, gerando uma base de dados. Em uma segunda etapa, tem-se a organização da base de dados das estruturas químicas e por fim o estudo da relação quantitativa entre a estrutura e atividade da molécula, cuja sigla em inglês é QSAR (Kutchan, 1996).

### 3.1 Estudos *in vitro*

Primeiramente extrai-se os alcalóides numa solução ácido e base, obtendo-se uma fração de diclorometano e os alcalóides presentes na solução e após passar por cromatografia líquida a vácuo obtém-se o alcalóide isolado desejado. O alcalóide Nuciferina é obtido da sequoia e dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido) em 10 mM ou em uma solução 0,9% salina com 85% de ácido láctico para cada 50 mL, outros alcalóides são empregados neste estudo *in vitro*, são eles Clozapina que é dissolvido em 0,2% de ácido acético. Liu e colaboradores coletaram amostras em tubos de 0,5 e 1,5 cm, os tubos são lavados e a epiderme das plantas são removidas, é esterilizada por etanol e em seguida por cloreto de mercúrio durante 15 minutos, 3% da espécie presente é sacarose e 0,7% é de agar (Deyon-Jung et al., 2016).

Medellín e colaboradores investigaram a inibição da polimerização do tubulin obtido do Citoesqueleto, a cada 12,5% de DMSO é preparado usando água ultra pura. A reação de tubulin é preparada utilizando 243 microlitros de buffer, 0,5 microlitros de etilenoglicol, 112 microlitros de tubulin glicerol, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 mM de etilenoglicol (Bendaif et al., 2018; Muratov et al., 2020).

Após isso, esta solução é misturada.

O grupo de Bauermeister empregou a técnica *in vitro* em modelos biomecânicos, desenvolvidos pela investigação do metabolismo usando microorganismos ou biocatalisadores (Xu et al., 2019).

### 3.2 Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* são realizados em organismos vivos, animais que são testados em laboratórios, como ratos e camundongos e é observada a resposta de cada alcalóide nos animais para posteriores estudos (Deyon-Jung et al., 2016; Rodrigues et al., 2012).

## 4. Conclusão

A partir dos estudos realizados é possível determinar a importância das técnicas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* dos alcalóides, que todos estes métodos serão empregados para a pesquisa e posterior aplicação dos métodos para inibição da atividade da *Giardia Lamblia* frente aos alcalóides testados.

## Referências

- Acosta-Virgen, K., Chávez-Munguía, B., Talamás-Lara, D., Lagues-Guillén, A., Martínez-Higuera, A., Lazcano, A., Martínez-Palomo, A., & Espinosa-Cantellano, M. (2018). *Giardia lamblia*: Identification of peroxisomal-like proteins. *Experimental Parasitology*, 191, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2018.06.006>
- Bendaif, H., Melhaoui, A., Ramdani, M., Elmsellem, H., Douez, C., & Ouadi, Y. E. (2018). Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreaticum foetidum* Pom (Moroccan endemic Amaryllidaceae). *Microbial pathogenesis*, 115, 138–145. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.12.037>
- Castilhos, T. S., Giordani, R. B., Henriques, A. T., Menezes, F. S., & Zuanazzi, J. Â. S. (2007). Avaliação *in vitro* das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 209–214. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200013>
- Deyon-Jung, L., Morice, C., Chéry, F., Gay, J., Langer, T., Frantz, M. C., Rozot, R., & Dalko-Csiba, M. (2016). Fragment pharmacophore-based *in silico* screening: A powerful approach for efficient lead discovery. *MedChemComm*, 7(3), 506–511. <https://doi.org/10.1039/C5MD00444F>

- Gargantini, P. R., Serradell, M. del C., Ríos, D. N., Tenaglia, A. H., & Luján, H. D. (2016). Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Current opinion in microbiology*, 32, 52–58. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2016.04.017>
- Jarrad, A. M., Debnath, A., Miyamoto, Y., Hansford, K. A., Pelingon, R., Butler, M. S., Bains, T., Karoli, T., Blaskovich, M. A. T., Eckmann, L., & Cooper, M. A. (2016). Nitroimidazole carboxamides as antiparasitic agents targeting *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120, 353–362. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.04.064>
- Kornpointner, C., Berger, A., Traxler, F., Hadžiabdić, A., Massar, M., Matek, J., Brecker, L., & Schinnerl, J. (2020). Alkaloid and iridoid glucosides from *Palicourea luxurians* (Rubiaceae: Palicoureae) indicate tryptamine- and tryptophan-iridoid alkaloid formation apart the strictosidine pathway. *Phytochemistry*, 173. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2020.112296>
- Kutchan, T. M. (1996). Heterologous expression of alkaloid biosynthetic genes—a review. *Gene*, 179(1), 73–81. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00426-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00426-X)
- Muratov, E. N., Bajorath, J., Sheridan, R. P., Tetko, I. V., Filimonov, D., Poroikov, V., Oprea, T. I., Baskin, I. I., Varnek, A., Roitberg, A., Isayev, O., Curtalolo, S., Fourches, D., Cohen, Y., Aspuru-Guzik, A., Winkler, D. A., Agrafiotis, D., Cherkasov, A., & Tropsha, A. (2020). QSAR without borders. *Chemical Society reviews*, 49(11), 3525–3564. <https://doi.org/10.1039/D0CS00098A>
- Naidoo, D., Manning, J. C., Slavětinská, L. P., & Staden, J. V. (2021). Isolation of the antibacterial alkaloid distichamine from *Crossyne Salisb.* (Amaryllidaceae: Amaryllideae: Strumariinae). *South African Journal of Botany*, 137, 331–334. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2020.10.011>
- Nett, R. S., Lau, W., & Sattely, E. S. (2020). Discovery and engineering of colchicine alkaloid biosynthesis. *Nature* 2020 584:7819, 584(7819), 148–153. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2546-8>
- Nishiyama, T., Matsuoka, A., Honda, R., Kitamura, T., Hatae, N., & Choshi, T. (2020). Total synthesis of carbazole alkaloid clausamine E. *Tetrahedron*, 76(15), 131110. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2020.131110>
- Porto, D. D., Matsuura, H. N., Henriques, A. T., Rosa, L. M. G., Fett, J. P., & Fett-Neto, A. G. (2020). The alkaloid brachycerine contributes to protection against acute UV-B damage in *Psychotria*. *Industrial Crops and Products*, 147, 112216. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112216>
- Rodrigues, R. P., Mantoani, S. P., Almeida, J. R. D., Pinsetta, F. R., Semighini, E. P., Silva, V. B. D., & Silva, C. H. P. D. (2012). Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Revista Virtual de Química*, 4(6), 739–776. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120055>
- Rognan, D. (2017). The impact of in silico screening in the discovery of novel and safer drug candidates. *Pharmacology & therapeutics*, 175, 47–66. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2017.02.034>
- Toro-Urbe, S., Ibáñez, E., Decker, E. A., McClements, D. J., Zhang, R., López-Giraldo, L. J., & Herrero, M. (2018). Design, Fabrication, Characterization, and In Vitro Digestion of Alkaloid-, Catechin-, and Cocoa Extract-Loaded Liposomes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(45), 12051–12065. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B04735>
- Xu, M., Eiriksson, F. F., Thorsteinsdóttir, M., Heidmarsson, S., Omarsdóttir, S., & Olafsdóttir, E. S. (2019). Alkaloid fingerprinting resolves *Huperzia selago* genotypes in Iceland. *Biochemical Systematics and Ecology*, 83, 77–82. <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2019.01.009>
- Youssef, F. S., & Singab, A. N. B. (2021). An Updated Review on the Secondary Metabolites and Biological Activities of *Aspergillus ruber* and *Aspergillus flavus* and Exploring the Cytotoxic Potential of Their Isolated Compounds Using Virtual Screening. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8860784>