



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KALINE RODRIGUES CARVALHO

ALCALOIDES BIOATIVOS E FENÓLICOS DE *HIPPEASTRUM*
***SOLANDRIFLORUM* (Lindl.) - AMARYLLIDACEAE**

FORTALEZA-CE

2014

KALINE RODRIGUES CARVALHO

**ALCALOIDES BIOATIVOS E FENÓLICOS DE *HIPPEASTRUM*
SOLANDRIFLORUM (Lindl.) - AMARYLLIDACEAE**

Dissertação submetida à Coordenação de Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Otília Deusdênia Loiola Pessoa
Co-orientadora: Maria da Conceição M. Torres

FORTALEZA-CE

2014

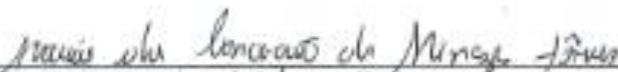
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



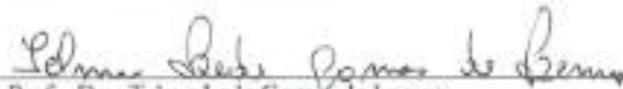
Kaline Rodrigues Carvalho

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/10/2014.

EXAMINADORES:



Dr.^a Maria da Conceição de Menezes Tetras
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr. Kirley Marques Canuto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C323a Carvalho, Kaline Rodrigues.
Alcalóides bioativos e fenólicos de *Hippeastrum solandriflorum* (Lindl.) - Amaryllidaceae / Kaline Rodrigues Carvalho. – 2014.
140 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Mestrado em Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.
Coorientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Menezes Torres.
1. Alcalóides. 2. Alcalóides bioativos. 3. Alcalóides fenólicos. 4. Atividade citotóxica. I. Título.

CDD 547

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico de *Hippeastrum solandriflorum* (Amaryllidaceae) visando o isolamento e elucidação estrutural de novos constituintes químicos bioativos, bem como o estudo farmacológico dos compostos obtidos. A investigação química realizada com o extrato etanólico dos bulbos, através de métodos cromatográficos, incluindo CLAE (fase reversa), resultou no isolamento e identificação de dez substâncias, sendo um derivado do furano: 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído (**HS-1**), dois derivados fenólicos: ácido piscídico (**HS-2**), ácido eucômico (**HS-3**) e sete alcalóides isoquinolínicos: Narciclasina (**HS-4**), 2 α -hidroxipseudolicorina (**HS-5**), 10 α -hidroxi-homolicorina (**HS-6**), Galantamina (**HS-7**), Sanguinina (**HS-8**), N-óxido galantamina (**HS-9**), Narcissidina (**HS-10**). Os alcalóides (**HS-5**) e (**HS-6**) esta sendo relatado pela primeira vez na literatura e os demais como sendo inéditos na espécie estudada. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectrométricos (IV, IES-EM e RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D), além de comparação com dados da literatura. O potencial citotóxico dos alcalóides isolados foi avaliado frente às linhagens de células tumorais humanas: cólon (HCT-116), leucemia (HL-60), ovário (OVCAR-8) e cérebro (SF-295) mostrando valores IC_{50} variando 0,01 – 35,7 μM .

Palavras-chave: Amaryllidaceae; *Hippeastrum solandriflorum*; alcalóides isoquinolínicos; atividade citotóxica

ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of *Hippeastrum solandriflorum* (Amaryllidaceae) aiming the isolation and structural elucidation of new bioactive compounds, as well as its pharmacological investigation. The chemical investigation realized with the EtOH extract from bulbs, through chromatographic methods, including HPLC (reverse phase), resulting in the isolation of ten compounds: a furan derivative: 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde (**HS-1**), two phenolic derivatives: piscidic acid (**HS-2**), eucomic acid (**HS-3**), and seven isoquinoline alkaloids: narciclasin (**HS-4**), 2 α -hydroxypseudolycorin (**HS-5**), 10 α -hydroxy-homolycorin (**HS-6**), galantamin (**HS-7**), sanguinin (**HS-8**), *N*-oxid galantamin (**HS-9**) and narcissidin (**HS-10**). The alkaloids (**HS-5**) and (**HS-6**) are being reported for the first time in the literature, while the other ones have been isolated for the first time in the investigated species. The structures of all isolated compounds were determined based on spectrometric methods (IR, HRMS, NMR ¹H and ¹³C – 1D and 2D), besides comparison with published data. The cytotoxic potential of all alkaloids were evaluated against several tumor cell lines: colon (HCT-116), leukemia (HL-60), ovary (OVCAR-8) and brain (SF-295) showing IC₅₀ ranging from 0.01 to 35.7 μ M.

Key-words: Amaryllidaceae; *Hippeastrum solandriflorum*; isoquinoline alkaloids; cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de <i>Hippeastrum solandriflorum</i> em seu habitat natural. Destaque para folhas, flor e bulbos.....	15
Figura 2 - Estrutura do núcleo isoquinolínico (I) e do alcaloide crinina (II)	17
Figura 3 - Formação biossintética dos precursores dos alcalóides de Amaryllidaceae.....	18
Figura 4 - Formação biossintética dos precursores dos alcaloides isoquilínicos.	20
Figura 5 – Estruturas dos alcaloides representativos dos 11 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae.....	21
Figura 6 – Principais correlações a longa distância (^1H - ^{13}C), observadas no espectro 2-D HMBC para HS-1	36
Figura 7 - Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-1	37
Figura 8 - Espectro de RMN ^1H de HS-1 (CDCl_3 , 300 MHz).	38
Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C de HS-1 (CDCl_3 , 75 MHz).	38
Figura 10 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 de HS-1 (CDCl_3 , 75 MHz).	39
Figura 11 - Espectro de RMN $2\text{D}^1\text{H}$, ^{13}C -HSQC de HS-1 (CDCl_3 , 125 x 75 MHz).	39
Figura 12 - Espectro de RMN $2\text{D}^1\text{H}$, ^{13}C -HMBC de HS-1 (CDCl_3 , 125 x 75 MHz).	40
Figura 13 – Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-2	43
Figura 14 –Espectro de massa de alta resolução de HS-2 , obtido por ESI no modo negativo. ..	43
Figura 15 - Espectro de RMN ^1H de HS-2 (CD_3OD , 300 MHz).	44
Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C de HS-2 (CD_3OD , 75 MHz).	44
Figura 17 - Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-3	46
Figura 18 - Espectro de RMN ^1H de HS-3 (Piridina- d_5 , 300 MHz).....	47
Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C de HS-5 (Piridina- d_5 , 125 MHz).	47
Figura 20 - Espectro de massa de alta resolução de HS-3 , obtido por ESI no modo negativo. ..	48
Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-4	50
Figura 22 - Espectro de massa de alta resolução de HS-4 , obtido por ESI no modo positivo.	51
Figura 23 - Espectro de RMN ^1H de HS-4 ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz).....	51
Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C de HS-4 ($\text{DMSO}-d_6$, MHz).....	52
Figura 25 - Estrutura tridimensional de HS-5 , destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY.	54
Figura 26 – Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais [M+H] $^+$ registrados no espectro de massa (EM/EM-IES) de HS-5	55
Figura 27 - Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-5	57

Figura 28 - Espectro de massa de alta resolução de HS-5 , obtido por IES no modo positivo.....	57
Figura 29 - Espectro de RMN ^1H de HS-5 (CD_3OD , 500 MHz).....	58
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN ^1H de HS-5 (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 5,7 e 2,5 ppm.	58
Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 de HS-5 (CD_3OD , 125 MHz).....	59
Figura 32 - Espectro de RMN ^{13}C de HS-5 (CD_3OD , 125 MHz).....	59
Figura 33 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de HS-5 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	60
Figura 34 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de HS-5 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	61
Figura 35 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de HS-5 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	62
Figura 36 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de HS-5 (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.	63
Figura 37 - Importantes correlações a longa distância (^1H - ^{13}C), observadas no espectro bidimensional HMBC do composto HS-6	65
Figura 38 - Estrutura tridimensional de HS-6 , com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares detectados no experimento NOESY.	66
Figura 39 – Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-6	68
Figura 40 – Espectro de massa de alta resolução de HS-6 , obtido por IES no modo positivo.....	68
Figura 41 – Espectro de RMN ^1H de HS-6 (CD_3OD , 500 MHz).....	69
Figura 42 - Espectro de RMN ^1H -expansão (MeOD, 500 MHz) de HS-6	69
Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz) de HS-6	70
Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (MeOD, 125 MHz) de HS-6	70
Figura 45 - Espectro de RMN-HSQC (MeOD, 125 x 500 MHz) de HS-6	71
Figura 46 - Espectro de RMN-COSY (MeOD, 500 x 500 MHz) de HS-6	72
Figura 47 - Espectro de RMN-HMBC (MeOD, 125 x 500 MHz) de HS-6	73
Figura 48 - Espectro de RMN-NOESY (DMSO- d_6 , 500 x 500 MHz) de HS-6	74
Figura 49 - Importantes correlações a longa distancia ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC de HS-7	76
Figura 51 – Espectro de massa de alta resolução de HS-7 , obtido por IES no modo positivo. ...	79
Figura 52 – Espectro de RMN ^1H de HS-7 (CD_3OD , 500 MHz).....	79
Figura 53 - Espectro de RMN ^1H -expansão (MeOD,500 MHz) de HS-7	80

Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de HS-7	81
Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (CD_3OD , 125 MHz) de HS-7	81
Figura 56 - Espectro de RMN-HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de HS-7	82
Figura 57 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de HS-7 (CD_3OD , 500 x 500 MHz)	83
Figura 58 - Espectro de RMN-HMBC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de HS-7	84
Figura 59 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de HS-7 (CD_3OD , 500 x 500 MHz)	85
Figura 60 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H dos compostos HS-7 e HS-8 (CD_3OD , 500 MHz).	86
Figura 61 - Estrutura tridimensional de HS-7 , destacando os acoplamentos dipolares vistos no espectro NOESY.	87
Figura 62 - Espectro de massa de alta resolução de HS-8 , obtido por ESI, no modo positivo....	89
Figura 63 - Espectro de RMN ^1H de HS-8 (CD_3OD , 500 MHz).	89
Figura 64 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de HS-8 (CD_3OD , 500 x 500 MHz)	90
Figura 65 - Espectro de RMN-HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de HS-8	91
Figura 66 - Espectro de RMN-HMBC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de HS-8	92
Figura 67 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de HS-8 (CD_3OD , 500 x 500 MHz).....	93
Figura 68 -Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H dos compostos HS-7 (b) e HS-9 (a) (CD_3OD , 500 MHz). * Não detectado.	94
Figura 69 - Estrutura tridimensional de HS-9 , destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY	95
Figura 70 - Espectro de massa de alta resolução de HS-9 , obtido por IES, no modo positivo....	97
Figura 71 - Espectro de RMN ^1H de HS-9 (CD_3OD , 500 MHz).	97
Figura 72 - Expansão do espectro de RMN ^1H de HS-9 (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 5,0 e 3,2 ppm.	98
Figura 73 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de HS-9 (CD_3OD , 500 x 500 MHz)	99
Figura 74 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de HS-9 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	100
Figura 75 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de HS-9 (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.....	101
Figura 76 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de HS-9 (CD_3OD , 500 x 500 MHz)	102
Figura 77 - Estrutura tridimensional de HS-10 , destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY	104
Figura 78 - Espectro de massa de alta resolução de HS-10 , obtido por ESI, no modo positivo..	106

Figura 79 - Espectro de RMN ^1H de HS-10 (CD_3OD , 500 MHz).	106
Figura 80 -Expansão do espectro de RMN ^1H de HS-10 (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 5,0 e 3,1ppm.	107
Figura 81 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de HS-10 (CD_3OD , 500 x 500 MHz).	108
Figura 82 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de HS-10 (CD_3OD , 500 x 500 MHz).	109
Figura 83 - Cromatograma de isolamento das substâncias HS-2 e HS-3	119
Figura 84 - Cromatograma do isolamento da substância HS-5 e HS-6	120
Figura 85 - Cromatograma do isolamento de HS-8 e HS-7	121
Figura 86 - Cromatograma do isolamento de HS-9	122
Figura 87 - Cromatograma do isolamento de HS-10	123
Figura 88 – Estruturas dos compostos isolados de <i>H. solandriiflorum</i>	128

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 – Metodologia de isolamento das substâncias obtidas das frações do extrato etanólico dos bulbos de <i>H. solandriiflorum</i>	124
Fluxograma 2 – Metodologia de isolamento das substâncias obtidas da fração aquosa do extrato etanólico dos bulbos de <i>H. solandriiflorum</i>	125

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Publicação de artigos do gênero <i>Hippeastrum</i>	22
Gráfico 2 - Alcaloides isolados de <i>Hippeastrum</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alcaloides isolados de espécies do gênero <i>Hippeastrum</i>	24
Tabela 2 - Estrutura dos alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Hippeastrum</i>	28
Tabela 3 - Atividades biológicas descritas para plantas da família Amarillidaceae	32
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz), CDCl_3 de HS-1	37
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz), CD_3OD de HS-2	42
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H 500 MHz, ^{13}C 100 MHz, Piridina- d_5 e HS-3	46
Tabela 7 – Dados de RMN ^1H 500 MHz ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6 de HS-4	50
Tabela 8 - Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) do composto HS-5	56
Tabela 9 – Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CD_3OD de HS-6	67

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto HS-7 (500 e 125 MHz, CD_3OD), e acoplamentos observados no espectro HMBC.....	78
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto HS-8 (300 e 75 MHz, CD_3OD).....	88
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto HS-9 (500 e 125 MHz, CD_3OD).....	96
Tabela 13 - Dados de RMN ^1H do composto HS-10 (500 MHz, CD_3OD).....	105
Tabela 14 - Citotoxicidade dos compostos (HS-4 a HS-10) em determinadas linhas de células de tumor avaliadas pelo ensaio de MTT, após 72 h de exposição.....	111
Tabela 15 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração HS-AD	116
Tabela 16 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-3	117
Tabela 17 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-6	118
Tabela 18 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt alcaloídico dos bulbos de <i>H. Solandriflorum</i>	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometria de Massa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IV	Infravermelho
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
p. f.	Ponto de fusão
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
TFA	Ácido Trifluoroacético
ppm	Partes por milhão
SPE	Solid Phase Extraction
T_r	Tempo de retenção
EM-IES	Espectroscopia de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i>
Hz	Hertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	16
2.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE	16
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>HIPPEASTRUM</i>	16
2.2.1 Classificação botânica: (FLORA BRASILIENSIS).....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 ORIGEM BIOSINTÉTICA	17
3.2 CLASSIFICAÇÃO	18
3.1.1 Esqueleto tipo-galantamina	19
3.1.2 Esqueleto tipo-crinina.....	19
3.1.3 Esqueleto tipo-licorina.....	19
3.1.4 Esqueleto tipo-homolicorina.....	19
3.1.5 Esqueleto tipo-tazetina	19
3.1.6 Esqueleto tipo-cherilina.....	19
3.1.7 Esqueleto tipo-pancracina.....	19
3.1.8 Esqueleto tipo-buflavina.....	19
3.4 ACALOIDES ISOLADOS DO GÊNERO <i>HIPPEASTRUM</i>	21
3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DESCRITAS PARA AMARYLLIDACEAE	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	35
4.1.1 Determinação estrutural dos compostos isolados dos bulbos de <i>H. solandriflorum</i> . 35	
4.1.2 Determinação estrutural de HS-1	35
4.1.3 Determinação estrutural de HS-2	41
4.1.4 Determinação estrutural de HS-3	45
4.1.5 Determinação estrutural de HS-4	48
4.1.6 Determinação estrutural de HS-5	52
4.1.7 Determinação estrutural de HS-6	64
4.1.8 Determinação estrutural de HS-7	75
4.1.9 Determinação Estrutural de HS-8	86
4.1.10 Determinação Estrutural de HS-9	94
4.1.11 Determinação estrutural de HS-10	103
4.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	110
5. PARTE EXPERIMENTAL	113
5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	113
5.1.1 Cromatografia de Adsorção.....	113
5.1.2 Cromatografia de Exclusão	113
5.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ≈ HPLC)	113
5.1.4 Extração em Fase Sólida (EFS ≈ SPE).....	114
5.2 MÉTODOS FÍSICOS	114
5.2.1 Ponto de Fusão	114
5.2.3 Método de análise dos resultados	114
5.3. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS.....	114

5.3.1 Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)	114
5.3.2 Espectrometria de Massas (EM)	115
5.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	115
5.4 ESTUDOS DOS CONSTITUINTES QUIMICOS DE <i>HIPPEASTRUM</i>	
<i>SOLANDRIFLORUM</i>	115
5.4.1 Material vegetal	115
5.4.2 Preparação do extrato	116
5.4.3 Partição líquido-líquido do extrato etanólico (HS-EtOH).....	116
5.4.4 Fracionamento cromatográfico das frações AcOEt e DCM da partição	116
5.4.5 Fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-3 e isolamento de HS-1	117
5.4.6 Fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-6	117
5.4.7 Fracionamento cromatográfico da fração n-ButOH	118
5.4.8 Extração ácido-base da fração aquosa residual dos bulbos de <i>H. solandriflorum</i>	119
5.4.9 Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica AcOEt.....	119
5.4.10 Fracionamento da fração HP-Fr4-5	121
5.4.11 Fracionamento da fração HP-Fr6-7	122
5.4.12 Tratamento dos compostos HS-5	123
5.5. ENSAIO BIOLÓGICO	123
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
REFERÊNCIAS	130

1 INTRODUÇÃO

Plantas da família Amaryllidaceae são reconhecidas por sua importância econômica devido a sua utilização ornamental, sendo as plantas bulbosas as mais comuns no comércio, principalmente em região temperadas. Algumas plantas dessa família também são de importância medicinal como as espécies: *Crinum glaucum* e *Crinum jagus* são utilizados na Nigéria para tratar perda de memória em idosos (HOUGHTON, *et al.*, 2004), o segundo é também usado para tratar feridas abertas e em preparações anticonvulsivantes (FENNEL, *et al.*, 2001); As folhas e bulbos de *Crinum bulbispermum* são usados na África do Sul para tratar diversas doenças entre elas podem ser citadas: ferimentos, dores de ouvido, infecções de rim e bexiga e redução de inchaços em articulações; As espécies *Amaryllis belladonna* L., *A. formosissima* L. e *A. zeylanica* L. são usadas para tratamento de câncer (PETTIT, *et al.*, 1984). Estudos farmacológicos relatam uso popular de plantas desta família com finalidade curativa (OKUBO, 1993).

Do ponto de vista químico, as plantas da família Amaryllidaceae, são reconhecidas por biossintetizarem uma grande variedade de alcaloides do tipo isoquinolínicos. Essa subclasse de compostos tem sido alvo de muitos estudos devido a sua diversidade estrutural e farmacológica (MCNULTY, 2007).

Diversas atividades tem sido atribuídas aos alcalóides isoquinolínicos de diferentes espécies de Amaryllidaceae, como atividades antifúngica, antiviral, antiparasitária (GHOSAL *et al.*, 1985; SENER *et al.*, 1998, MACHOCHO *et al.*, 2004) citotóxica antitumoral e imunoestimulante (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; WENIGER *et al.*, 1995), antimalárica (SENER *et al.*, 2003), antibacteriana (TRAM *et al.*, 2002; ELGORASHI e VAN STADEN, 2004), e anticolinesterásica, sendo essa uma das atividades mais estudadas para esses alcaloides (HARVEY, 1995; LÓPEZ *et al.*, 2002; ELGORASHI *et al.*, 2006). Devido a essa diversidade farmacológica, torna-se relevante o conhecimento da composição química de outras espécies, e assim, contribuir com a quimiotaxonomia da família.

O gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae), um dos maiores e mais complexos da família Amaryllidaceae, é representado por aproximadamente 70 espécies (ANDRADE, 2012), distribuídas quase que exclusivamente na América latina, particularmente no Brasil e Peru (GIORDANI, 2011).

No Brasil, o gênero é representado por 30 espécies, muitas das quais, possuem propriedades medicinais e são popularmente conhecidas como lírios, tulipas, cebola do mato, cebola berrante e, principalmente, açucenas. A maioria dessas espécies é endêmica da bacia Amazônica, sendo ali seu principal centro de dispersão (FLORY *et al.*, 1977). As plantas deste gênero são reconhecidas pelo seu valor ornamental e tem sido comercializado em diversos países.

A importância econômica e terapêutica de plantas pertencentes ao gênero *Hippeastrum*, assim como a diversidade estrutural dos compostos isolados têm motivado diversos estudos com espécies desse gênero. Estudos preliminares do extrato aquoso de *Hippeastrum solandriflorum* e suas frações mostraram atividade anticâncer. Estes resultados, bem como os relatos na literatura motivaram a busca de novos compostos bioativos através do monitoramento e fracionamento cromatográfico das frações ativas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo a realização do estudo químico de *Hippeastrum solandriflorum*, visando o isolamento e caracterização estrutural de seus metabólitos secundários a partir da investigação química dos bulbos, assim como, investigar as propriedades antiproliferativa dos compostos isolados.

Considerações Botânicas

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE

A família Amaryllidaceae, constituída por aproximadamente 1.110 espécies em 85 gêneros, está distribuída ao longo dos trópicos e regiões temperadas quentes. Espécies dessa família são comercializadas em vários países, devido à beleza de suas flores. Esta família é considerada uma das 20 famílias mais importantes, entre aquelas que apresentam um alto teor de alcaloides em sua composição (UNVER, *et al.*, 2007).

A família Amaryllidaceae está representada no Brasil pelos gêneros *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Alstroemeria*, *Clivia*, *Zephyranthes*, *Haemanthus*, *Eucharis*, *Habranthus*, *Worsleya*, *Griffinia* (MEEROW *et al.*, 1999; JOLY, 2002) e *Rodophiala* (CASTILHOS, 2004), os quais são encontrados preferencialmente nos campos e em algumas partes da caatinga (SCHULTZ, 1990).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO HIPPEASTRUM

O gênero *Hippeastrum* é quase que exclusivamente Sul-americano (FABRIS, 1968) com distribuição desde o México até a Argentina (DAHLGREN *et al.*, 1985) possuindo aproximadamente 70 espécies (ANDRADE *et al.*, 2012).

As plantas do gênero *Hippeastrum*, conhecidas como “açucenas”, são plantas bulbosas com flores de cores, formas e tamanhos variados. Além da beleza das flores, as espécies também possuem valor ornamental quando em estágio vegetativo devido à beleza na arquitetura das folhagens (OKUBO, 1993). De modo geral, elas se caracterizam por serem muito vigorosas, com folhas túrgidas, canaliculadas, de ápice agudo, com cerca de 50 cm de comprimento por 5 cm de largura (DUTHIL, 1987).

2.2.1 Classificação botânica: (FLORA BRASILIENSIS)

Reino: Plantae

Ordem: Asparagales

Família: Amaryllidaceae

Tribo: Amarylleae Endl.

Gênero: *Hippeastrum*

Espécie: *Hippeastrum solandriflorum*.;

Figura 1 - Foto de *Hippeastrum solandriflorum* em seu habitat natural. Destaque para folhas, flor e bulbos.



Foto: Edilberto R. Silveira

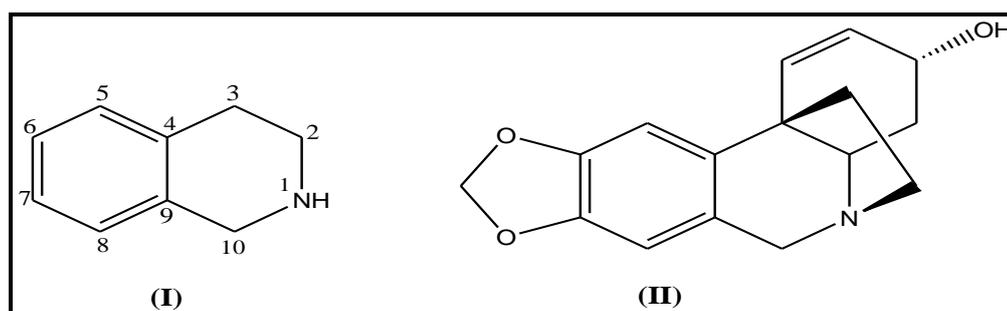
Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os alcaloides constituem uma das maiores classes de metabólitos secundários, apresentando uma ampla diversidade estrutural e um elevado número de atividades biológicas. Eles possuem um ou mais átomos de nitrogênio heterocíclico em suas estruturas, conferindo-lhes características básicas, as quais são determinantes para a química desses metabólitos, principalmente quando estão envolvidas reações do tipo ácido-base.

Estruturalmente, os alcaloides isoquinolínicos caracterizam-se pela presença de um sistema bicíclico, benzeno fundido com o ciclo hexano (Figura 2, **I**). Esse geralmente é substituído nas posições 2 e 3, levando a formação de inúmeras estruturas. Substituições dos hidrogênios (H-6 e H-7) por grupos hidroxila, metoxila ou grupo metilenodioxila são bastante comuns, podendo também ocorrer substituições do hidrogênio ligado ao nitrogênio, como se pode ver no alcaloide crinina (Figura 2, **II**), isolado dos bulbos de *Crinum kirkii*, *Crinum bulbispermum* e *Brunsvigia littoralis* (MACHOCHO *et al.*, 2004; ALI *et al.*, 1984; CAMPBELL *et al.*, 1998). O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ^1H) desses compostos é caracterizado pelos hidrogênios do anel benzênico, que se apresentam como dois simpletos (H-5 e H-8), com deslocamentos entre 7 e 8 ppm (CAMPBELL *et al.*, 1998).

Figura 2 Estrutura do núcleo isoquinolínico (**I**) e do alcaloide crinina (**II**).

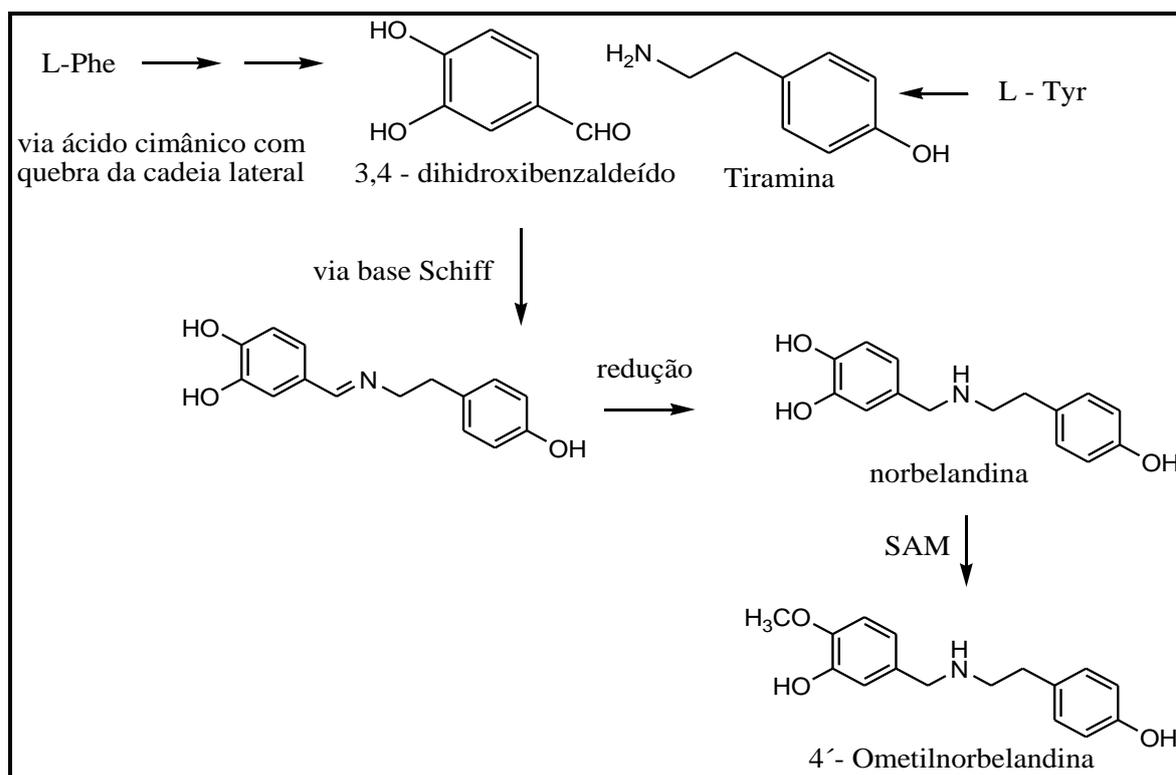


3.1 Origem Biossintética

Embora os alcalóides de Amaryllidaceae tenham diversos tipos estruturais, eles são todos biogeneticamente derivados da norbeladina ou de seus derivados que são produzidos em plantas a partir do aldeído aromático 3,4 diidroxibenzaldeído e da tiramina, sendo estes precursores formados a partir da fenilamina e da tirosina, respectivamente, conforme apresentado na Figura 3.

Os esqueletos básicos dos alcalóides desta família podem ser formados pelos seguintes processos: acoplamento fenólico intramolecular, hidrólise biocatalítica da ligação C-N benzílica, redução da ligação C=O, oxidação de ligações C–O e C–H, *O*- e *N*-metilações.

Figura 3 - Formação biossintética dos precursores dos alcalóides de Amaryllidaceae.



3.2 CLASSIFICAÇÃO

Os alcalóides de Amaryllidaceae são classificados em oito grupos principais: galatamina, crinina, licorina, homolicorina, cherilina, pancracina, buflavina e pancratistatina (JIN *et al.*, 2007). Esses compostos são formados a partir de reações intermolecular do 4-*O*-metilnorbeladina, o qual é considerado o precursor universal dos alcalóides de Amaryllidaceae (EICHHORN *et al.*, 1998; BRUNETON, 2001; BASTIDA, 2006), (Figura 4).

3.1.1 Esqueleto tipo-galantamina

São formados a partir do acoplamento oxidativo fenólico intramolecular *p* - *o*' da norbeladina gerando um intermediário dienona, que sofre ciclização, resultante do ataque da hidroxila a dienona, e subsequente redução da carbonila.

3.1.2 Esqueleto tipo-crinina

São formados a partir do acoplamento fenólico intramolecular *p'*-*p* na norbeladina gerando um intermediário dienona que sofre adição nucleofílica da amina, redução da carbonila.

3.1.3 Esqueleto tipo-licorina

São formados por acoplamento oxidativo fenólico intramolecular *p'*-*o* da norbeladina ou ciclização intramolecular concertada da forma iminoquinonóide, seguido por redução. Os alcalóides do tipo licorina são também conhecidos como pirrolo[c]fenantridina.

3.1.4 Esqueleto tipo-homolicorina

São formados por hidrólise/oxidação biocatalítica da ligação benzílica C-N dos alcalóides tipo-licorina e a ciclização do produto 7-arilindole hidrogenado.

3.1.5 Esqueleto tipo-tazetina

São formados a partir da clivagem da ligação C-N dando origem as estruturas 3a-arilindoles hidrogenadas. Um processo de oxidação da posição 3 do produto, seguido de uma ciclização com perda de água dá origem ao esqueleto tipo-tazetina.

3.1.6 Esqueleto tipo-cherilina

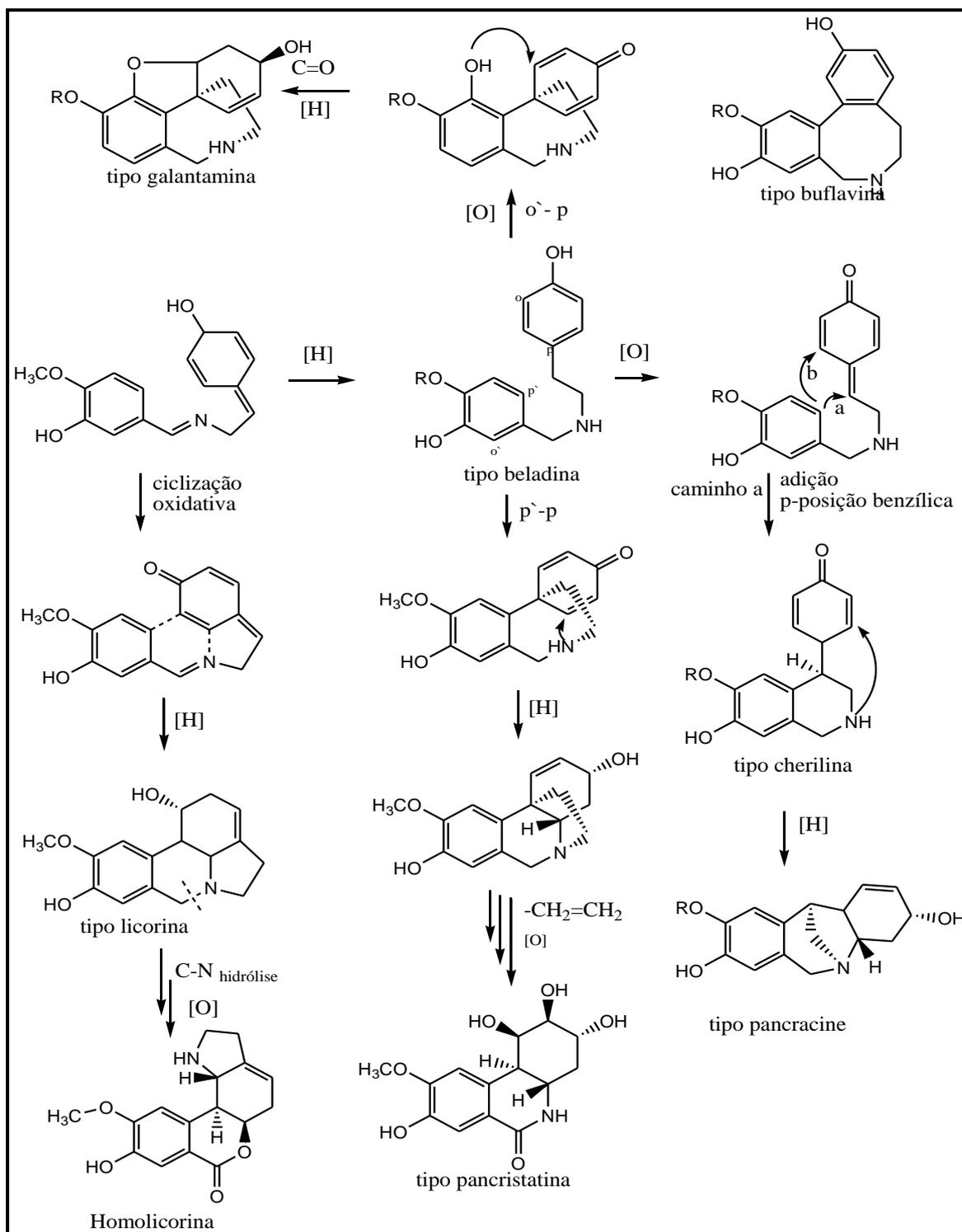
São formados pela adição intramolecular entre a posição *p'* do anel aromático, rico em elétrons, e a posição benzílica da forma quinonóide oxidada (caminho a).

3.1.7 Esqueleto tipo-pancracina

São originados por uma rota adicional na qual o intermediário da cherilina sofre uma adição entre a amina secundária e a dienona.

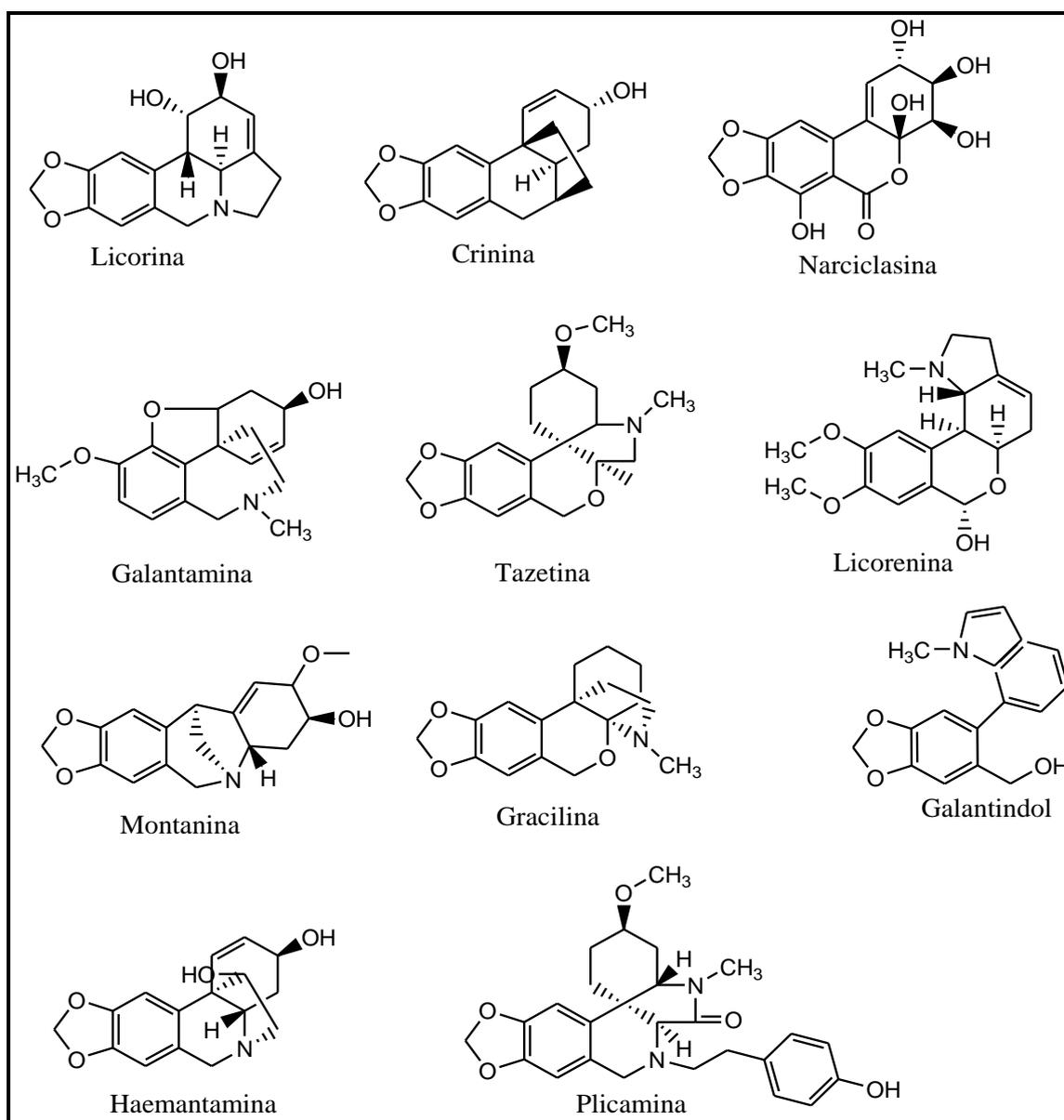
3.1.8 Esqueleto tipo-buflavina

Os alcalóides do tipo-buflavina podem ser originados a partir da adição intramolecular da posição *p'* do anel aromático rico em elétrons com a posição *meta* da forma quinonóide ou, por algum outro acoplamento oxidativo fenólico intermediário.

Figura 4 Formação biossintética dos precursores dos alcalóides isoquilínicos.

Atualmente, os alcalóides de Amaryllidaceae podem ser classificados em 11 grandes grupos de núcleos fundamentais, Figura 5 (HOSHINO, 1998; UNVER *et al.*, 1999. Entre esses, nesse trabalho foram isolados os alcalóides dos tipos: galantamina, crinina, licorina e homolicorina.

Figura 5 – Estruturas dos alcaloides representativos dos 11 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae.



3.4 ALCALOIDES ISOLADOS DO GÊNERO *HIPPEASTRUM*

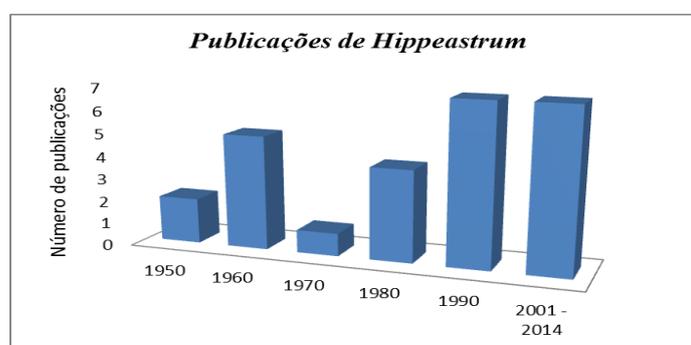
Com o intuito de conhecermos os alcaloides isolados das espécies do gênero *Hippeastrum*, uma pesquisa bibliográfica foi realizada através do *Scifinder sholar* e do site *Science Direct* abrangendo artigos publicados no período de 1950 a 2014, além de busca em trabalhos de conclusão como dissertações de mestrado e teses de doutorado.

De acordo com a revisão, observou-se a presença marcante de alcalóides do tipo isoquinolínicos, confirmando a presença desses compostos como indicadores

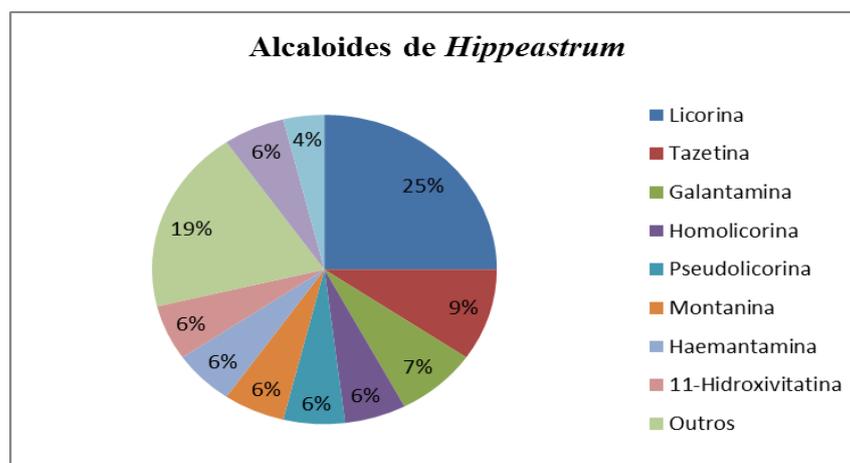
quimiotaxonômicos do gênero e responsáveis pela maioria das atividades biológicas registradas para o mesmo. Destacando-se a licorina, o primeiro alcalóide isolado da família Amaryllidacea, considerada de importância farmacológica por possuir atividades contra várias linhagens de células tumorais (SILVA *et al.*, 2008). A partir do isolamento da licorina, no século XIX, os estudos científicos envolvendo amaryllidaceae foram intensificados devido, principalmente, as atividades antivirais e antitumorais dos mesmos (EVIDENTE *et al.*, 2004; KARTSEV, 2005). Desde então, diversas espécies desta família foram investigadas quanto seu conteúdo alcaloídico (CORDELL *et al.*, 2001).

Com relação ao gênero *Hippeastrum*, existem estudos químicos envolvendo o isolamento de alcaloides desde a década de 50, onde 40 alcalóides diferentes já foram isolados. Conforme mostra o gráfico 1, as pesquisas por compostos desse gênero foram intensificadas a partir da década de 90, quando surgiram a incorporação de novas tecnologias que possibilitaram o isolamento e a determinação de novas substâncias. Os nomes dos compostos isolados de *Hippeastrum*, suas atividades e suas respectivas espécies estão sumarizados na Tabela 1, enquanto suas estruturas estão representadas na Tabela 2.

Gráfico 1 - Publicação de artigos do gênero *Hippeastrum*.



Conforme pode ser observado na Tabela 1 e no Gráfico 2, o metabólito mais frequente em plantas do gênero é licorina (1), presente em doze espécies, seguido do alcaloide tazetina (2). No gráfico 2 pode-se visualizar ainda os compostos mais isolados do gênero *Hippeastrum*, sendo que os compostos com percentual inferior a 4% foram agrupados como outros .

Gráfico 2 - Alcaloides isolados de *Hippeastrum*.

Através do levantamento foi encontrado um artigo envolvendo os constituintes químicos isolados a partir dos bulbos de *Hippeastrum solandriflorum*, onde foram isolados os alcalóides licorina (1), ismina (11), ungeremina (13), hamaina (14) e vitatina (41) (BASTIDA *et al.*; 1996).

Tabela 1 Alcaloides isolados de espécies do gênero *Hippeastrum*.

Alcaloide	Espécie	Atividades	Referência
Licorina (1)	<i>H. ananuca Phil</i>		ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
	<i>H. aulicum Herb. var. robustum</i>		SEBBEN, 2005
	<i>H. bifidum Herb.</i>		HOFMANN <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. bicolor Baker</i>		
	<i>H. candidum Herb</i>	Citotóxica	PHAM, <i>et al.</i> , 1999
	<i>H. solandriflorum</i>	Antibacteriana	
	<i>H. brachyandrum Baker</i>	Antiinflamatória,	BASTIDA <i>et al.</i> , 1996
	<i>H. rutilum Herb</i>	Antitumoral	
	<i>H. equestre Herb</i>	Antiviral	PACHECO <i>et al.</i> , 1982
	<i>H. gaucescens (Martius) Herbert</i>	Analgésica	MARTIN, 1987
	<i>H. vittatum (L'Hér.) Herbert</i>		WILDMAN, 1968
	<i>H. striatum (L'Hér.) Herbert</i>		WILDMAN, 1968
	<i>H. breviflorum Herb.</i>		1968

Tazetina (2)	<i>H. gaucescens (Martius) Herbert</i> <i>H. vittatum (L'Hér.) Herbert</i> <i>H. equestre Herb</i> <i>H. hybrids</i> <i>H. aulicum</i>	Citotóxica Antioxidante Antibacteriana	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014 GIORDANI <i>et al.</i> , 2011 HOFMANN <i>et al.</i> , 2003 PHAM <i>et al.</i> , 1997 DOPKE e BIENERT, 1966; MUEGGE <i>et al.</i> , 1994 MURAV'ÉVA <i>et al.</i> , 1982 BOIT, 1956
Homolicorina (3)	<i>H. vittatum (L'Hér.) Herbert</i> <i>H. rutilum Herb</i>	Citotóxica Antiviral Antimalarial Antitumoral	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014 BOIT, 1956 DOPKE e BIENERT, 1966; WILDMAN, 1960
Haemantamina (4)	<i>H. Bicolor Baker</i> <i>H. rutilum Herb</i> <i>H. vittatum (L'Hér.) Herbert</i>	Antimicrobiana Antioxidante	MUEGGE <i>et al.</i> , 1994 MARTIN, 1987 WILDMAN, 1960 DOPKE e BIENERT, 1966; BOIT, 1956
Galantamina (5)		Citotóxica	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014

	<i>H. equestre</i> <i>H. aulicum</i> <i>H. papilo</i> <i>H. brachyandrum</i> <i>H. rutilum</i>	Antitumoral Anti-inflamatoria	ANDRADE <i>et al.</i> , 2011 PACHECO <i>et al.</i> , 1982 WILDMAN <i>et al.</i> , 1960
Pseudolicorina (6)	<i>H. equestre</i> Herb <i>H. aulicum</i> var. <i>robustum</i> <i>H. johnsonii</i>	Antitumoral	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014 PHAM <i>et al.</i> , 1997 PHAM, <i>et al.</i> , 1999 RAO <i>et al.</i> , 1971 DROPKE <i>et al.</i> , 1961
Narcissidina (7)	<i>H. brachyandrum</i> Baker <i>H. aulicum</i> Herb. var. <i>robustum</i>	Antitumoral	WILDMAN, 1968 WILDMAN, 1960
Montanina (8)	<i>H. aulicum</i> Herb. Var. <i>robustum</i> <i>H. breviflorum</i> <i>H. hybrids</i>	Citotóxica Antitumoral Analgésica Antiviral	MUEGGE <i>et al.</i> , 1994 GIORDANI <i>et al.</i> , 2011 WILDMAN, 1968 DROPKE <i>et al.</i> , 1961
Hipeastidina (9)	<i>H. equestre</i> Herb	-	PHAM <i>et al.</i> , 1997 PHAM <i>et al.</i> , 1997

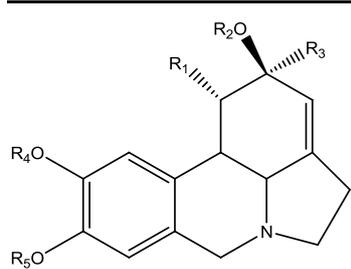
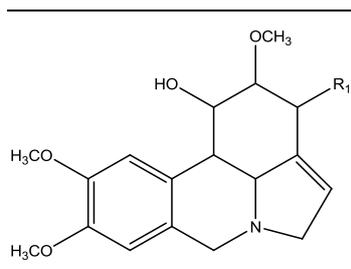
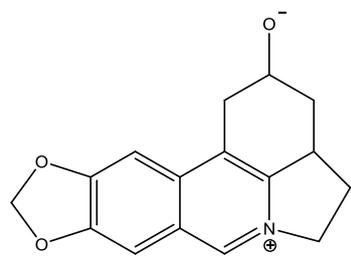
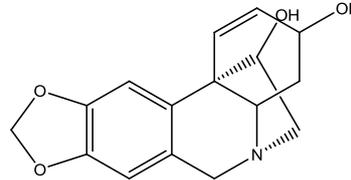
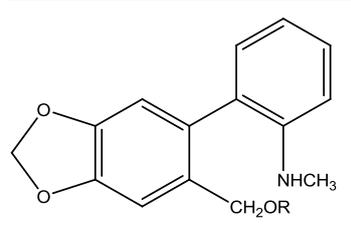
2-O-acetilicorina (10)	<i>H. aulicum</i> Herb. var. <i>robustum</i>	-	WILDMAN, 1968
Ismina (11)	<i>H. solandriiflorum</i> Herb. <i>H. aulicum</i> <i>H. calyptratum</i>	-	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014 BASTIDA <i>et al.</i> , 1996
Galantina (12)	<i>H. aulicum</i> Herb. var. <i>robustum</i>	Antitumoral	WILDMAN, 1968
Ungeremina (13)	<i>H. solandriiflorum</i> Herb.	-	BASTIDA <i>et al.</i> , 1996
Hamaina (14)	<i>H. solandriiflorum</i> Herb.	-	BASTIDA <i>et al.</i> , 1996
Vitacarbolina (15)	<i>H. vittatum</i> (L'Hér.) Herbert	-	BOIT, 1954 BOIT, 1956
Pretazetina (16)	<i>H. gaucescens</i> (Martius) Herbert	Antitumoral	HOFMANN <i>et al.</i> , 2003
3-O-acetilnarcissidina (17)	<i>H. puniceum</i> (Lam.) Urb.	antiviral	QUIRION e HUSSON, 1991
Beviflorina-A (18)	<i>H. breviflorum</i> Herb.	-	SEBBEN, 2005
Breviflorina-B (19)	<i>H. breviflorum</i> Herb.	-	SEBBEN, 2005
epi-Homolicorina (20)	<i>H. ananuca</i> Phil	Citotóxica Antiviral Antimalarial Antitumoral	PACHECO <i>et al.</i> , 1982

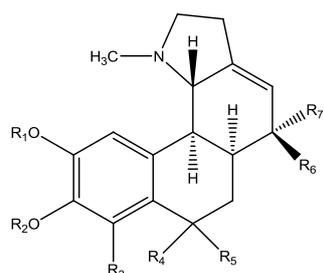
Candimina (21)	<i>H. aulicum</i> <i>H. morelianum</i> Lem.	-	GIORDANI <i>et al.</i> , 2011 GIORDANI <i>et al.</i> , 2011
Trisferidina (22)	<i>H. morelianum</i> Lem.	-	GIORDANI <i>et al.</i> , 2011
Hamayne (23)	<i>H. morelianum</i> Lem.	-	GIORDANI <i>et al.</i> , 2011
Epimacronina (24)	<i>H. morelianum</i> Lem.	-	GIORDANI <i>et al.</i> , 2011
11-Hidroxivitatine (25)	<i>H. papilo</i> <i>H. aulicum</i> <i>H. calyptratum</i> <i>H. puniceum</i>	Citotóxica Antiviral antitumoral	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014 ANDRADE <i>et al.</i> , 2011
Egonina (26)	<i>H. equestre</i> Herb.	-	PHAM <i>et al.</i> , 1997
Epimacronina (27)	<i>H. equestre</i> Herb.	-	PHAM <i>et al.</i> , 1997
Vitacarbolina (28)	<i>H. vittatum</i>	-	YOUSSEF, 2001
O-Metilismine (29)	<i>H. vittatum</i>	-	YOUSSEF, 2001
Galantindol (30)	<i>H. aulicum</i> <i>H. calyptratum</i>	Antiviral	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014

Nerinine (31)	<i>H. aulicum</i> <i>H. calyptratum</i>	Antiviral	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
Albomaculina (32)	<i>H. aulicum</i>	-	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
2 α ,7-Dimetoxihomolicorina (33)	<i>H. calyptratum</i>	Citotóxica	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
2 α ,7-Dimetoxihomolicorina (34)	<i>H. calyptratum</i>	citotóxica	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
Trisfagridina (35)	<i>H. aulicum</i> <i>H. calyptratum</i>		ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
8-O-Dimetilmaritidine (36)	<i>H. aulicum</i> <i>H. calyptratum</i>	Antiviral analgésica	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
3-O-Metilepimaconine (37)	<i>H. calyptratum</i>	Antibacteriana	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
11-oxo-Haemantamine (38)	<i>H. aulicum</i>	Antiviral antitumoral	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
Undulatine (39)	<i>H. brachyandrum</i> <i>H. rutilium</i>	-	BOIT <i>et al.</i> , 1960
3-O-Dimetilhippeastidine (40)	<i>H. ananuca Phil</i>	Antibacteriana	PACHECO <i>et al.</i> , 1982

Vitatina (41)	<i>H. solandriflorum</i>	Citotóxica Antiviral Antitumoral	BASTIDA <i>et al.</i> , 1996
------------------------	--------------------------	--	---------------------------------

Tabela 2 Estrutura dos alcalóides isolados de espécies do gênero *Hippeastrum*

	Licorina (1) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 + R_5 = \text{CH}_2$. Pseudolicorina (6) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{CH}_3$. 2- <i>O</i> -Acetillicorina (10) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 + R_5 = \text{CH}_2$ Galantina (12) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_4 = R_5 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$.
	Narcissidina (7) $R_1 = \text{OH}$ 3- <i>O</i> -Acetilnarcissidina (17) $R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$
	Ungeremina (13)
	Haemantamina (4) $R_1 = \text{OCH}_3$
	Hamaina (14) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$.



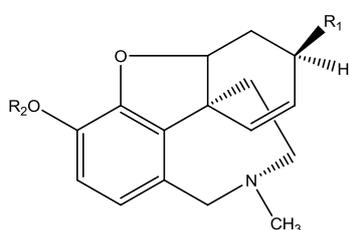
Homolitorina (**3**) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 + R_5 = \text{O}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$.

Hipeastrina (**9**) $R_1 + R_2 = \text{CH}_2$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = R_5 = \text{O}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$. 2 α , 7-dimetoxihomolitorina (**33**) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 + R_5 = \text{O}$, $R_7 = \text{OCH}_3$

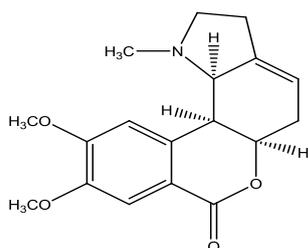
2-Dimetoxihomolitorina (**34**) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 + R_5 = \text{O}$, $R_7 = \text{OCH}_3$

Candimina (**22**) $R_1 + R_2 = \text{CH}_2$, $R_4 + R_5 = \text{O}$, $R_6 = \text{OH}$

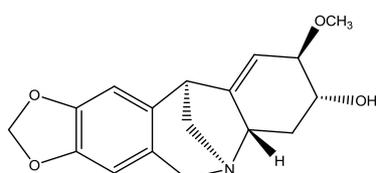
Neirina (**31**) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OH}$, $R_6 + R_7 = \text{H}$, N-H



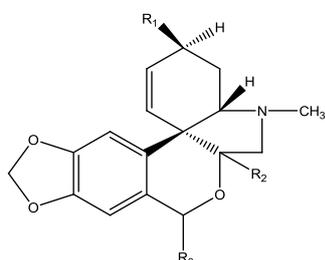
Galantamina (**5**) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$



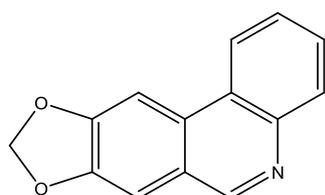
epi-Homolitorina (**20**)



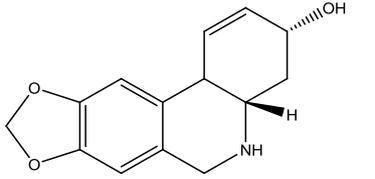
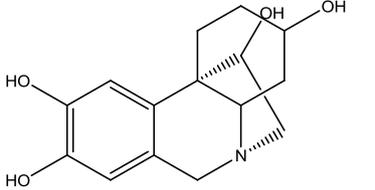
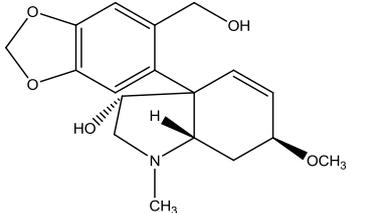
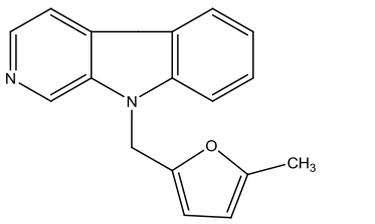
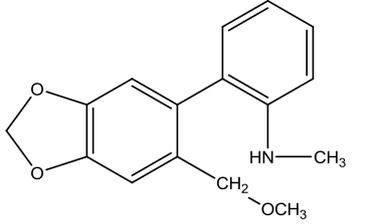
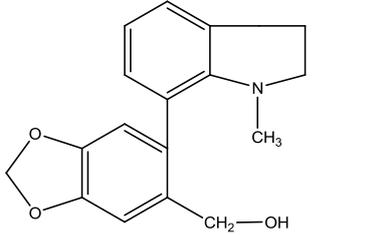
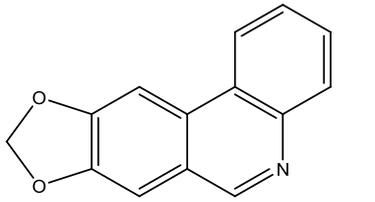
Montanina (**8**)

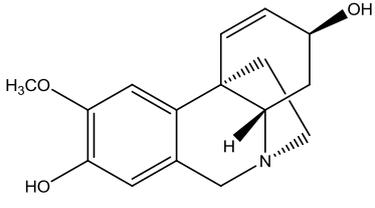
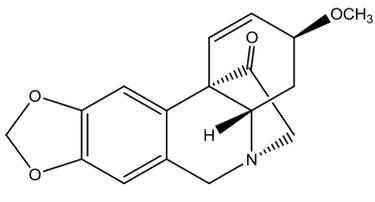
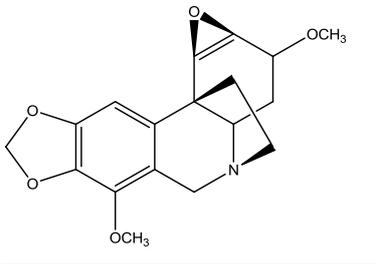
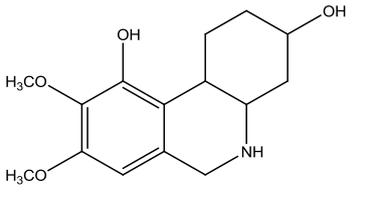
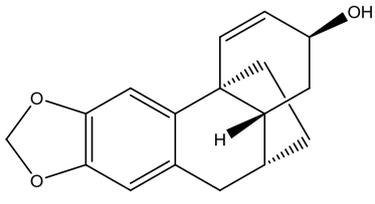


epi-macronine (**27**) $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{O}$



Trisferidina (**23**)

	<p>Hamayna (24)</p>
	<p>11-Hidroxivitatina (25)</p>
	<p>Egonina (26)</p>
	<p>Vitacarbonila (27)</p>
	<p>O-Metilismina (28)</p>
	<p>Galantindol (29)</p>
	<p>Trisfagridina (35)</p>

	Normaritidina (36)
	11-oxo-Haemantamina (38)
	Undulatina (39)
	3-O-Dimetilhippeastidina (40)
	Vitatina (41)

3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DESCRITAS PARA AMARYLLIDACEAE

A família Amaryllidaceae é conhecida desde a Antiguidade, devido à sua utilização na medicina tradicional. Existem relatos, aproximadamente do quarto século a.C., que apontam para o uso do óleo extraído de *Narcissus poeticus*, no tratamento de câncer (PETTIT *et al.*, 1986). Ainda hoje, várias espécies são utilizadas na medicina popular, principalmente no continente africano e europeu, das quais podemos citar a espécie *Brunsvigia littoralis*, com atividade antiviral, antitumoral imonoestimulante e antimalárica (CAMPBELL *et al.*, 1998); *Crinum glaucum*, com atividade antiespasmódica (OKPO e ADEYEMI, 1998) e várias outras do gênero *Crinum*, com atividade analgésica, anticolinérgica, antitumoral e antiviral

(FENNEL e STADEN, 2001), além de *Amnocharis corânica*, utilizada para o controle de desordens mentais (KOORBANALLY *et al.*, 2000), entre outras.

As evidências científicas sobre as propriedades biológicas de plantas da família Amaryllidaceae justificam o uso dessas espécies para o tratamento de sintomas de diferentes doenças. Neste levantamento são relatados dados de compostos isolados de *Hippeastrum*, bem como estudos biológicos para espécies de Amaryllidaceae, deixando claro que estas espécies são prolíficas fontes de metabólitos secundários potencialmente ativos.

Tabela 3 Atividades biológicas descritas para plantas da família Amarillidaceae

Espécie	Atividade reportada	Referência
<i>Echaris amazônica</i>	Citotóxica, antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral	CABEZAS 2003
<i>Crinum moorei</i>	Citotóxica, antifúngica, antiviral, antimalárico	ELGORASHI, 2003
<i>Nerine filifolia</i>	Citotóxica, antimicrobiana	FENNEL e STADEN, 2001
<i>Narcissus angustifolius</i>	Citotóxica, antitumoral, antioxidante	LABRANA <i>et al.</i> , 2002
<i>Galanthus caucasicus</i>	Citotóxica, antitumoral, antioxidante, antibacteriana	TSAKADZE 2005
<i>Amaryllis belladonna</i>	Antibacteriana, antifúngica	EUIDENTE <i>et al</i> 2005
<i>Rhodophiala bifida</i>	Citotóxica, antibacteriana	CASTILHOS 2004
<i>Hippeastrum vittatum</i>	Antibacteriana, citost[atica]	CASTILHOS 2007
<i>Narcissus tazetta</i>	Antitumoral, analgésica, antiinflamatória	HARTWELL, 1967
<i>C. bulbispermun</i>	Analgésica	RATNASOORIYA <i>et al.</i> , 2005
<i>Cyrtanthus</i>	Antioxidante	ELGORASHI e VAN STADEN, 2004
<i>Gethyllis</i>	Antiinflamatória	ELGORASHI e VAN STADEN, 2004

<i>Boophane disticha</i>	Analgésica	ELGORASHI e VAN STADEN, 2004
--------------------------	------------	---------------------------------

Resultados e Discussão

4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1.1 Determinação estrutural dos compostos isolados dos bulbos de *H. solandriflorum*.

O estudo químico dos bulbos de *H. solandriflorum* resultou no isolamento de dez compostos, cujas estruturas foram determinadas com base na análise de seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C , uni- e bidimensionais, infravermelho e espectrometria de massas. Sete destes compostos pertencem à classe dos alcaloides isoquinolínicos (**HS 4 a HS 10**), dois são derivados fenólicos e um furano. A seguir serão apresentadas as determinações estruturais das substâncias **HS-1 a HS-10**.

4.1.2 Determinação estrutural de HS-1

O composto denominado **HS-1** foi isolado em coluna de gel de sílica, a partir de frações oriundas da partição AcOEt e DCM (Fluxograma 1, p. 124). Este composto apresentou-se como sólido amarelo, com ponto de fusão na faixa de 110,1 – 111,9 °C.

O espectro de absorção no infravermelho (Figura 7, p. 37) mostrou uma banda em 3376 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O-H, uma banda em 1659 cm^{-1} associada à vibração de deformação axial de C=O, além de uma banda associada à deformação axial em 1530 cm^{-1} , característica de ligação C=C de olefina (PAIVA *et al.*, 2010).

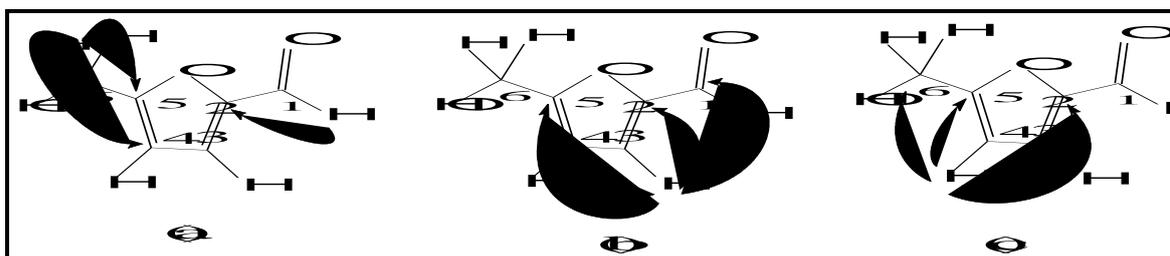
O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 – Figura 8, p. 38) mostrou sinais para hidrogênios olefinicos em δ 6,57 (d, $J = 3,5$; H-4) e 7,20 (d, $J = 3,5$; H-3) compatíveis com anel furânico, um sinal em δ 9,62, característico de hidrogênio de aldeído, bem como um sinal em δ 4,67 (s, 2H-6), característico de hidrogênios oximetilênicos.

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 – Figura 9, p. 38) mostrou seis linhas espectrais, que por comparação com o espectro DEPT 135° (Figura 10, p. 39) demonstrou a existência de um carbono metilênico, quatro carbonos metínicos e um carbono não hidrogenado. Esses dados espectrais foram compatíveis com um perfil semelhante ao composto conhecido na literatura como 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído (AMARASEKARA, *et al.*, 2008).

A proposta estrutural foi confirmada através da análise dos espectros HSQC (Tabela 4; Figura 11, p. 39) e HMBC (Figura 12, p. 40). De acordo com espectro HMBC foram

observados correlações entre o sinal do hidrogênio em $\delta 7,20$ com os carbonos em $\delta 177,9$ (C-1), $152,4$ (C-2), $110,1$ (C-4) e $161,2$ (C-5), assim com do hidrogênio em $\delta 6,57$ com os carbonos em $\delta 152,4$ (C-2), $123,4$ (C-3), $161,2$ (C-5) e $57,5$ (C-6). Adicionalmente, foram observadas correlações dos hidrogênios em $\delta 5,11$ com os carbonos em $\delta 110,1$ (C-4) e $161,2$ (C-5) e do hidrogênio em $\delta 9,62$ (H-1) com o carbono $\delta 152,4$ (C-2).

Figura 6 – Principais correlações a longa distância (^1H - ^{13}C), observadas no espectro 2-D HMBC para **HS-1**.



A reunião dos dados acima discutidos juntamente com a comparação com os descritos na literatura (AMARASEKARA, *et al.*, 2008), permitiu afirmar que **HS-1** se tratava do composto conhecido como 5-(hidroximetil) furan-2-carbaldeído. Um minucioso levantamento bibliográfico revelou que este composto está sendo registrado pela primeira vez no gênero e está sendo isolado como produto natural.

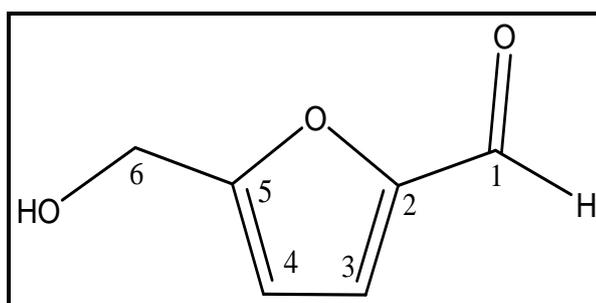


Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz), CDCl_3 de **HS-1**.

C	HSQC		HSQC* Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	177,9	9,62 (s)	178,7	9,53 (s)
2	152,4	-	152,4	-
3	123,4	7,20 (d, $J = 3,5$)	125,0	7,42 (d, $J = 3,6$)
4	110,1	6,49 (d, $J = 3,5$)	110,4	6,51 (d, $J = 3,6$)
5	161,2	-	162,8	-
6	57,5	4,67 (s)	58,6	5,00
OH	-	-	-	-

*(AMARASEKARA, *et al.*, 2008) ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) DMSO-d_6

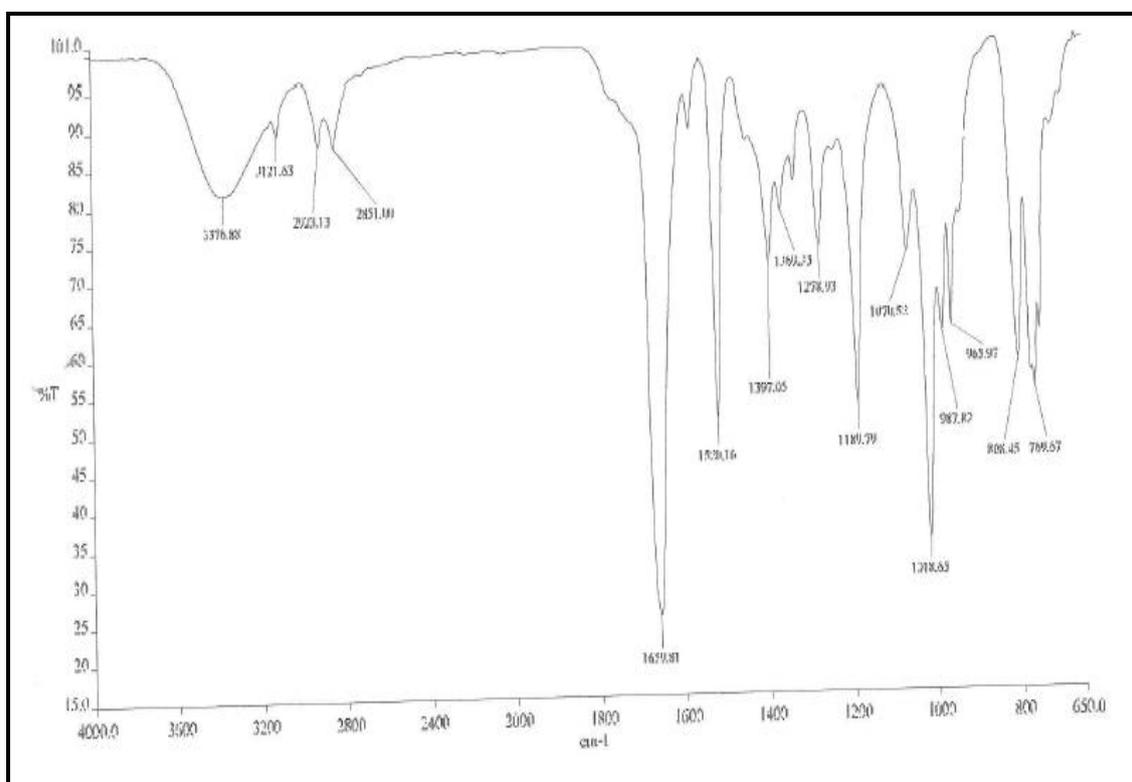
Figura 7 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **HS-1**.

Figura 8 - Espectro de RMN ^1H de HS-1 (CDCl_3 , 300 MHz).

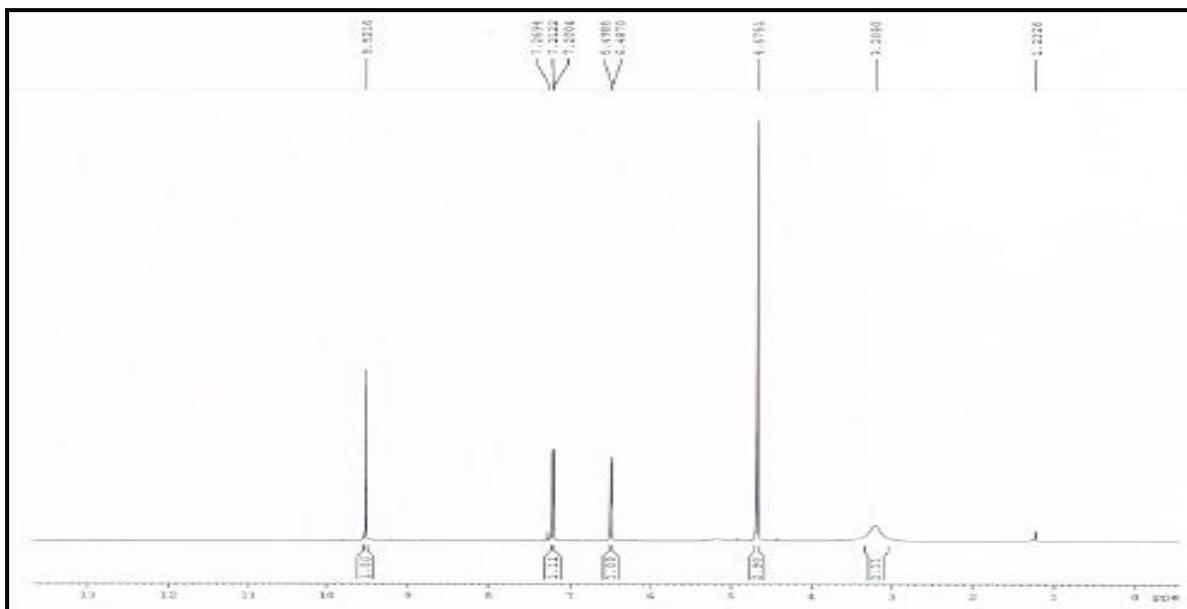


Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C de HS-1 (CDCl_3 , 75 MHz).

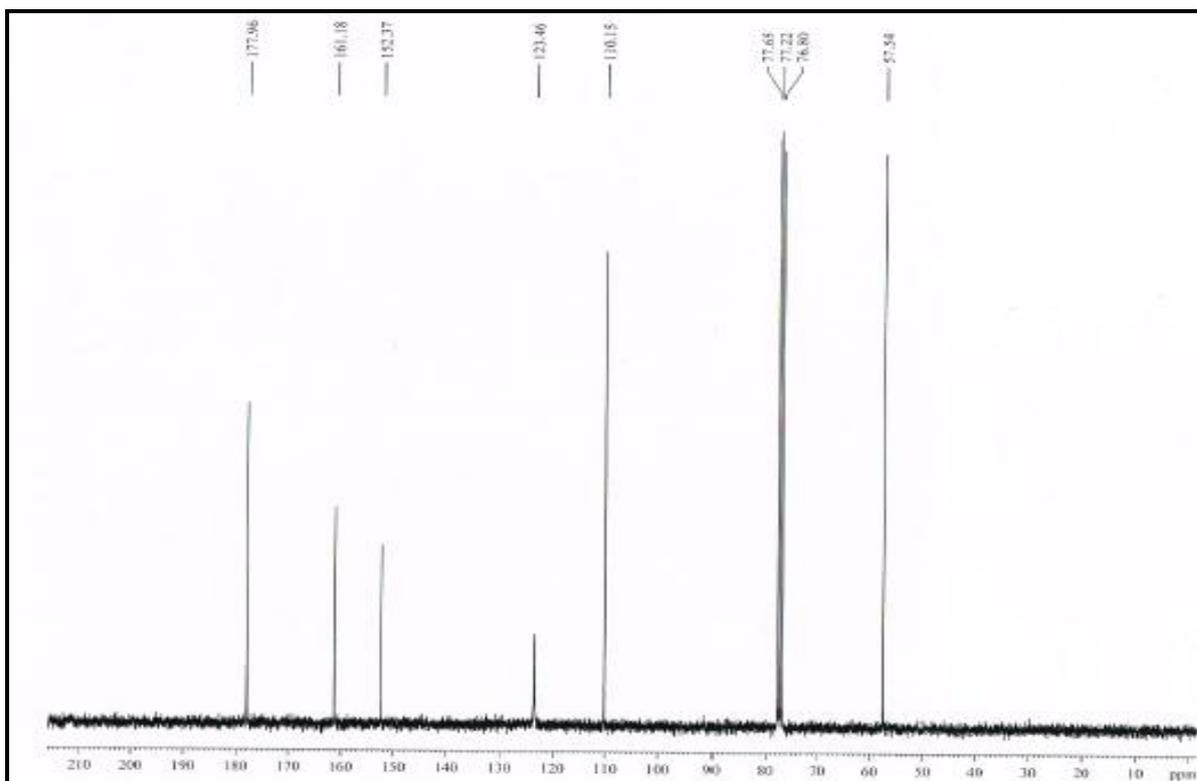


Figura 10 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 de **HS-1** (CDCl_3 , 75 MHz).

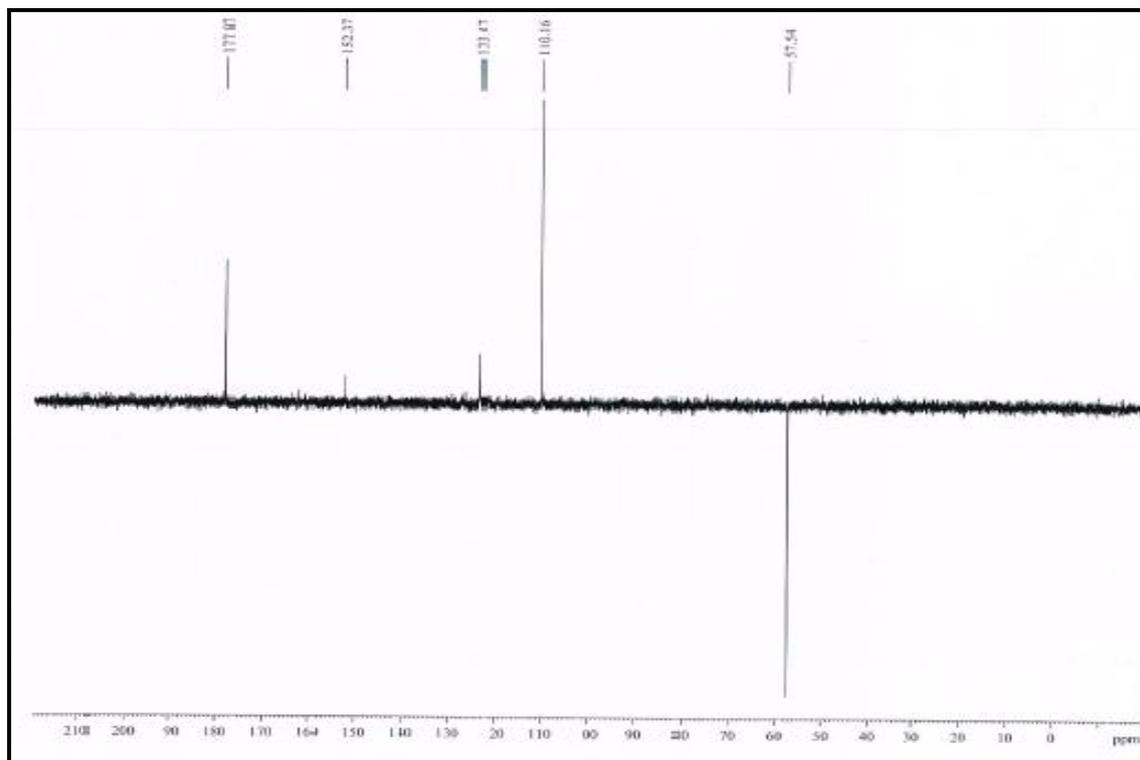


Figura 11 - Espectro de RMN $2\text{D}^1\text{H}$, ^{13}C -HSQC de **HS-1** (CDCl_3 , 125 x 75 MHz).

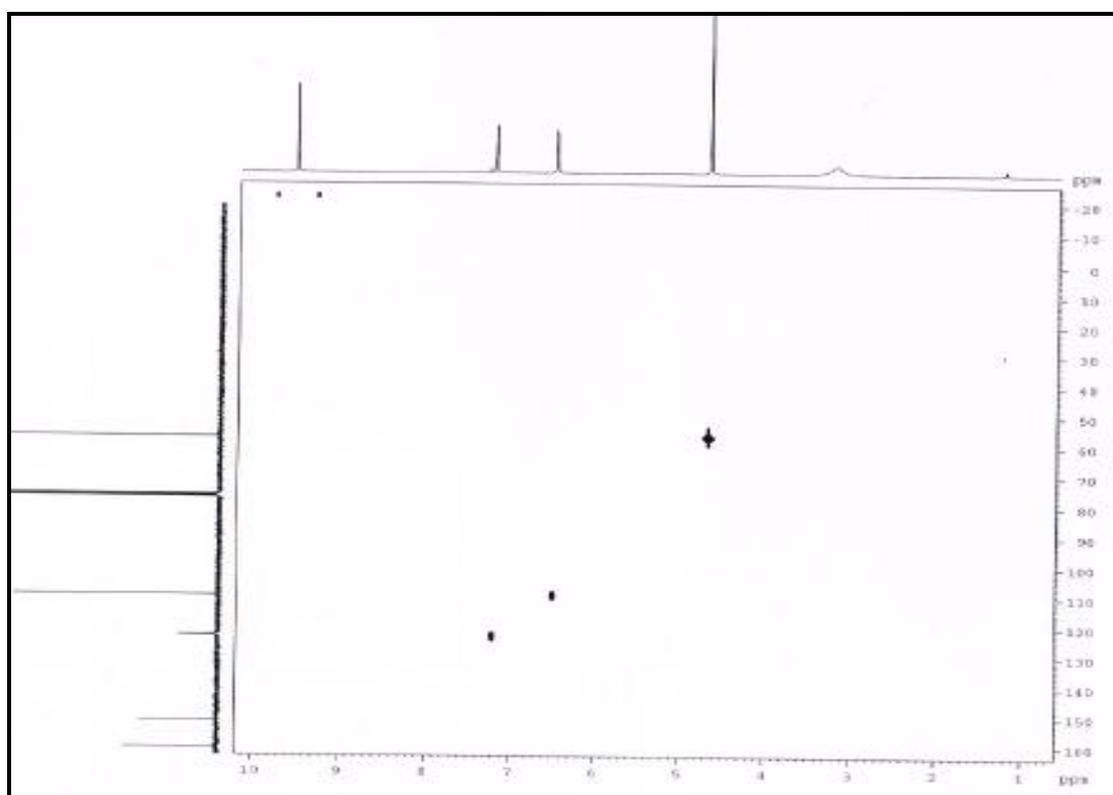
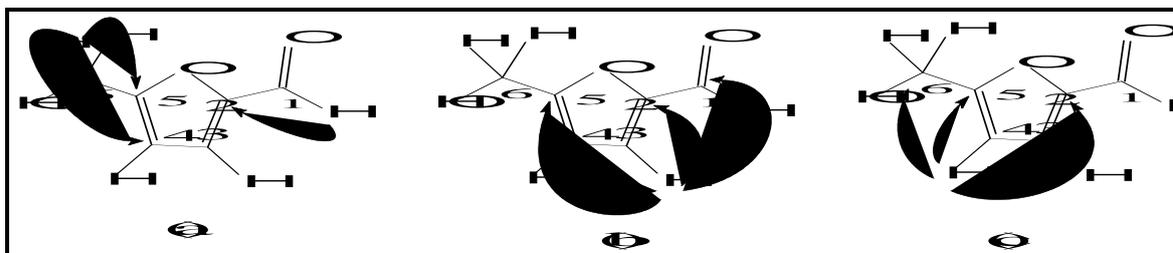
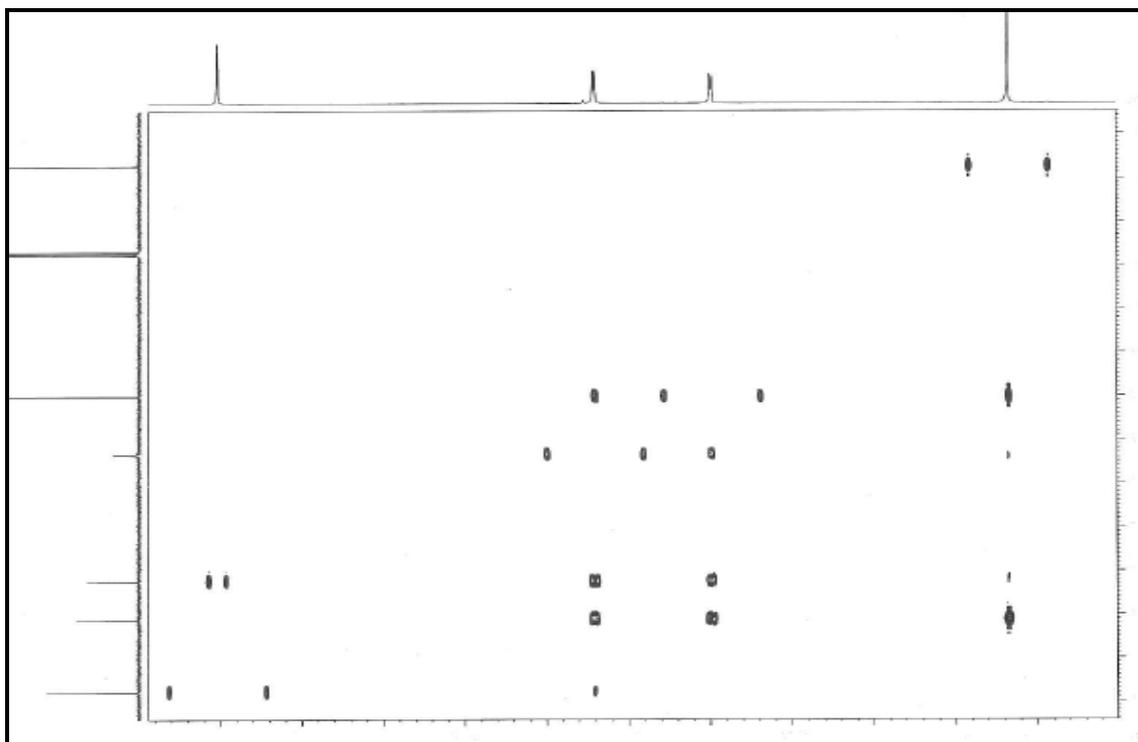


Figura 12 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de **HS-1** (CDCl_3 , 125 x 75 MHz).



4.1.3 Determinação estrutural de HS-2

O composto denominado **HS-2** foi isolado da fração n-BuOH (Fluxograma 1, p. 124), oriunda da partição líquido-líquido do extrato etanólico. Este composto foi obtido como um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 184,2 – 185,3 e rotação específica $[\alpha]_D^{20} = +0,036$ (MeOH, c 0,016).

O espectro de absorção no infravermelho (Figura 13, p. 43) mostrou uma banda em 3309 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O-H, bandas em 1746 e 1721 cm^{-1} associada à vibração de deformação axial de ligação C=O, bandas em 1618 , 1599 e 1514 característicos de deformação axial de ligação C=C de anel aromático, além de bandas em 1187 , 1170 , 1106 e 1093 características de ligação C-O (PAIVA *et al.*, 2010).

O espectro de massa de alta resolução de **HS-2** (Figura 14, p. 43), obtido por ionização por *electrospray*, no modo negativo, exibiu o pico em m/z 255,0544, correspondente a molécula desprotonada $[M-H]^-$ (calculado m/z 255,0540), conduzindo à fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_7$.

O espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD – Figura 15, p. 44) mostrou sinais em δ 6,66 (d, $J = 8,3$ Hz) e 7,06 (d, $J = 8,3$ Hz) compatíveis com um anel *p*-substituído e sinais em δ 4,44 (s) e 3,00 (m). O espectro RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD – Figura 16, p. 44), mostrou nove linhas espectrais, entre as quais os sinais em δ 174,0 e 175,0 referente a C=O de ácido carboxílico, corroborando com o infravermelho. Os sinais observados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C de **HS-2** foram compatíveis com aqueles descritos na literatura para o ácido piscidico (TAKAHIRA *et al.*, 1998) (Tabela 5, p. 42).

Diante das informações fornecidas pelos espectros foi possível estabelecer a estrutura do composto denominado **HS-2**, como ácido piscidico. Este composto foi previamente isolado de *Cimicifuga simplex* (TAKAHIRA *et al.*, 1998), porém conforme levantamento bibliográfico, está sendo registrado pela primeira vez no gênero.

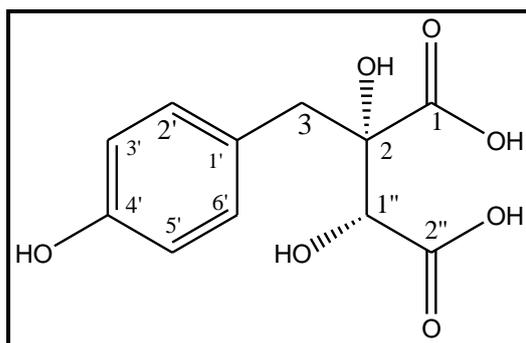


Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz), CD_3OD de **HS-2**.

C	HSQC		HSQC* Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	174,0**	-	174,8	-
1'	128,4	-	128,1	-
1''	77,1	4,44 (s)	76,6	4,55 (s)
2	81,6	-	81,4	-
2''	175,0**	-	176,1	-
3	41,9	3,00 (m)	41,9	2,97 (m)
4'	157,3	-	156,5	-
3'/5'	132,7	6,66 (d, $J = 8,3$ Hz)	132,1	6,72 (d, $J = 7,9$ Hz)
2'/6'	115,8	7,06 (d, $J = 8,3$ Hz)	116,2	7,04 (d, $J = 7,9$ Hz)

* ^1H e ^{13}C 400 MHz e 100 MHz, CD_3OD (TAKAHIRA *et al.*, 1998); ** δ_{C} obtido através da projeção do espectro de HMBC.

Figura 13 – Espectro de absorção na região do infravermelho de **HS-2**.

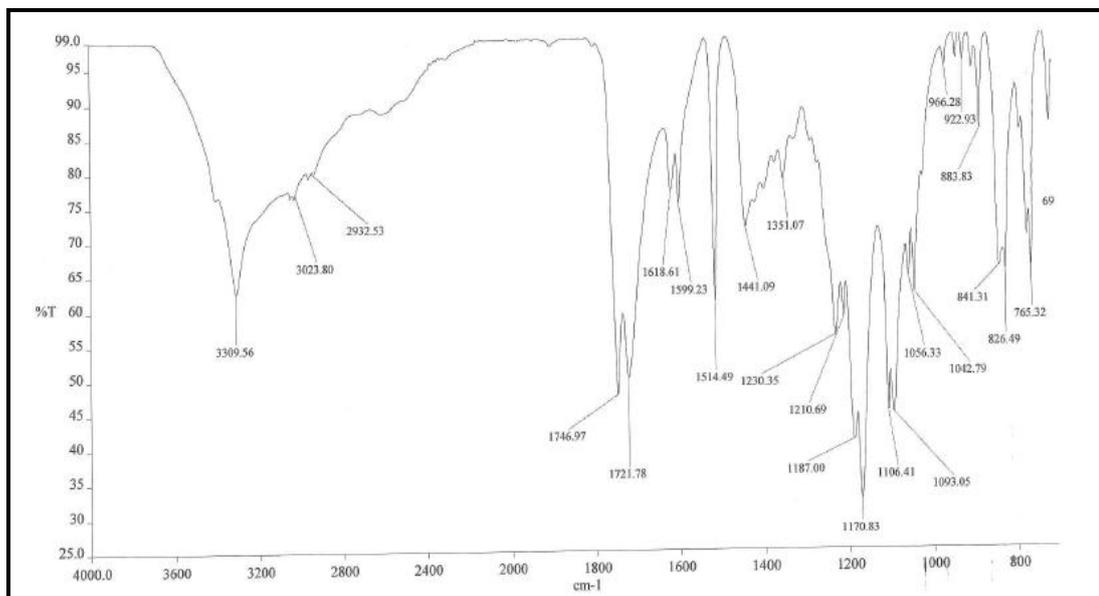


Figura 14 –Espectro de massa de alta resolução de **HS-2**, obtido por ESI no modo negativo.

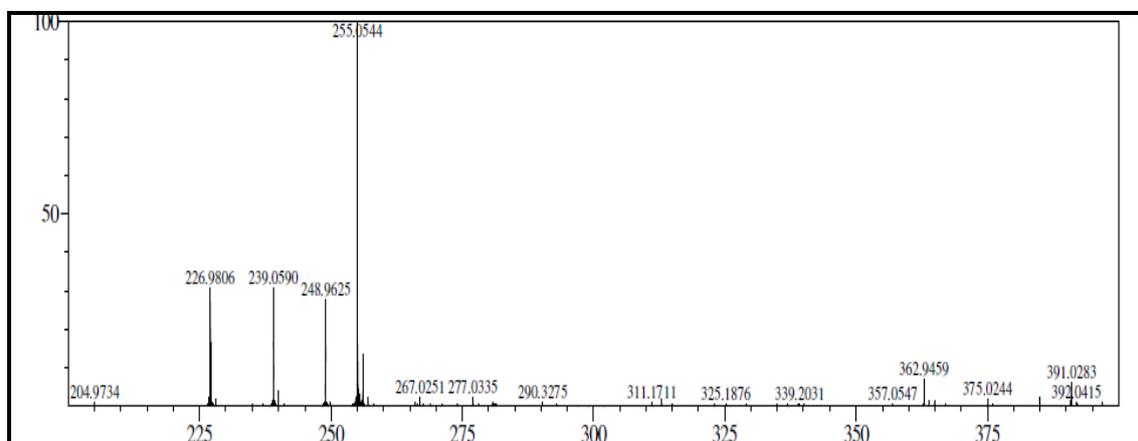


Figura 15 - Espectro de RMN ^1H de **HS-2** (CD_3OD , 300 MHz).

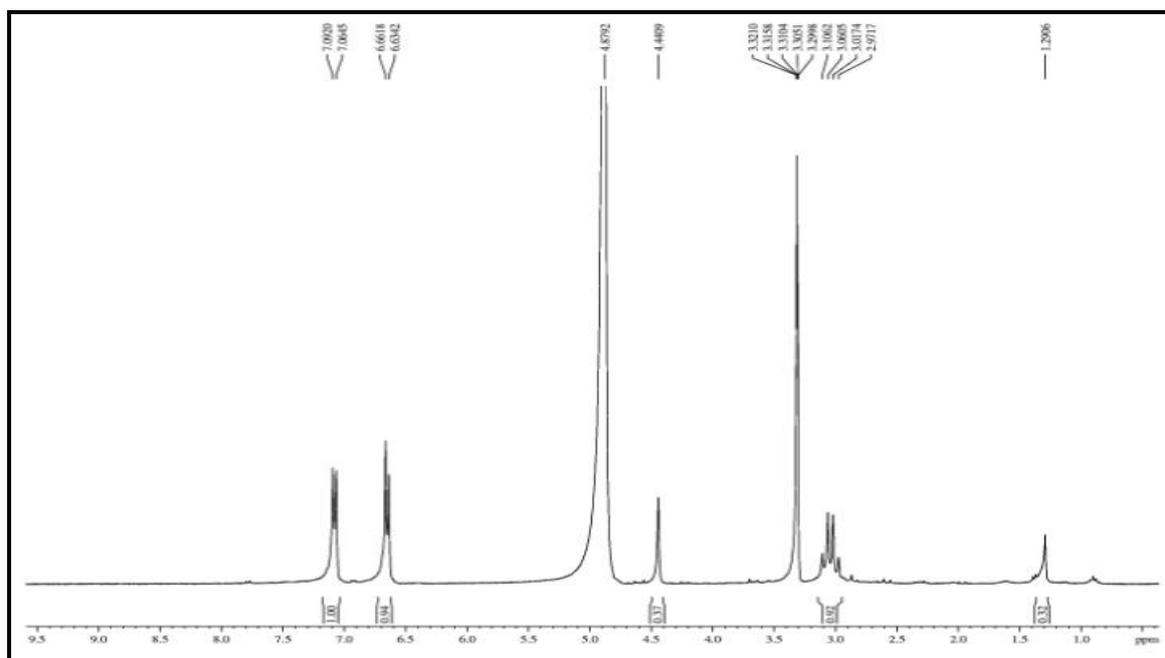
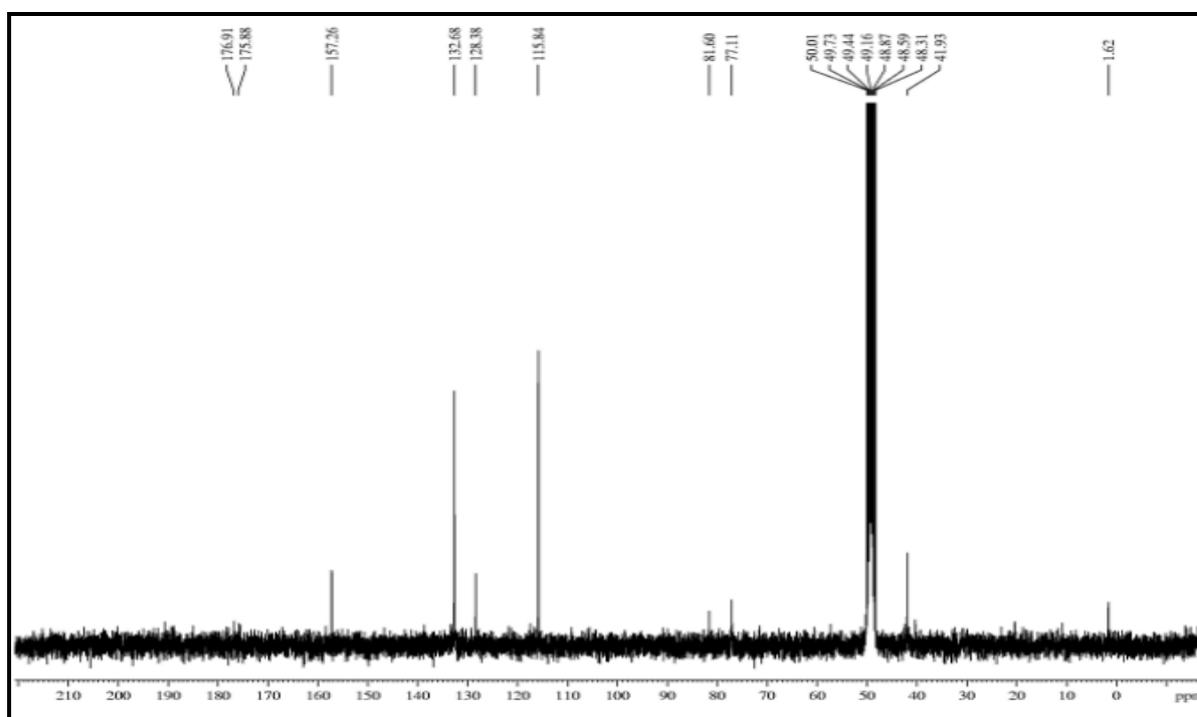


Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C de **HS-2** (CD_3OD , 75 MHz).



4.1.4 Determinação estrutural de HS-3

O composto denominado **HS-3**, também isolado da fração n-BuOH da partição líquido-líquido do extrato etanólico (Fluxograma 1, p. 124), foi obtido como um sólido branco com ponto de fusão na faixa 161,1 – 162,0, com rotação óptica de $[\alpha]_D^{20} = -0,045$ (MeOH, c 0,011).

O espectro de absorção no infravermelho (Figura 17, p.46) mostrou ser semelhante ao composto **HS-2**, isto é, absorções em 3309, 1746, 1721 correspondentes as funções O-H e C=O, bem como bandas características de C=C de aromáticos em 1618, 1599 e 1514 e bandas de estiramentos da ligação C-O em 1187, 1170 (PAIVA *et al.*, 2010).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz; Piridina- d_5 - Figuras 18 e 19, p. 47) mostraram-se semelhantes aos do composto **HS-2**. A análise comparativa dos dados espectrais de **HS-3** (Tabela 6, p. 46) com aqueles de **HS-2** (Tabela 5, p. 42) revelou que as principais diferenças residem no sinal de carbono sp^3 não oxigenado em δ 45,7 (C-3) no espectro de RMN ^{13}C , e nos sinais de hidrogênio em δ 3,26 (d, H-1a'') e 3,61 (d, H-1b'') de **HS-3**, referentes a um grupo CH_2 adicional, apontando a ausência de grupo hidroxila em C-1'' na estrutura de **HS-3** e, portanto, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_6$, a qual foi deduzida a partir do espectro de massa de alta resolução obtido por ionização por *electrospray* e no modo negativo, o qual exibiu o pico correspondente a molécula desprotonada $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 239,0581 (calculada m/z 239,0561) (Figura 20, p.48).

A reunião desses dados e comparação com aqueles descritos na literatura (Simmler *et al.*, 2011) permitiu estabelecer a estrutura de **HS-3** como o (-) ácido eucômico, previamente isolado da espécie de *Vanda teres*, no entanto, levantamento bibliográfico revelou que este composto está sendo registrado pela primeira vez no gênero.

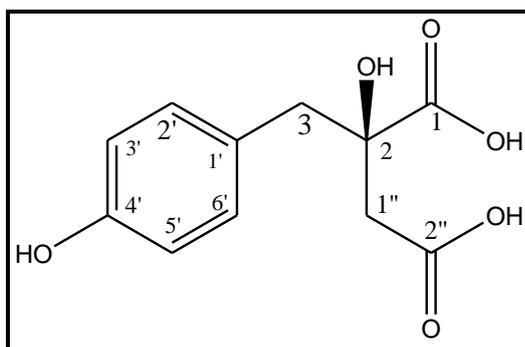


Tabela 6 - Dados de RMN ^1H 500 MHz, ^{13}C 100 MHz, Piridina- d_5 e HS-3.

C	HSQC		HSQC* Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	174,3	-	174,9	-
1'	127,9	-	127,9	-
1''	44,7	a 3,26 (d, $J = 15,8$ Hz) b 3,61 (d, $J = 15,8$ Hz)	44,1	a 4,00 (d, $J = 16,0$ Hz) b 4,33 (d, $J = 16,0$ Hz)
2	76,9	-	77,0	-
2''	178,5	-	178,3	-
3	45,7	a 3,42 (d, $J = 13,6$ Hz) b 3,54 (d, $J = 13,6$ Hz)	45,5	a 4,29 (d, $J = 13,7$ Hz) b 4,38 (d, $J = 13,7$ Hz)
4'	158,1	-	157,5	-
3'/5'	116,1	7,61 (d, $J = 8,3$ Hz)	115,9	8,11 (d, $J = 8,5$ Hz)
2'/6'	132,8	8,74 (d, $J = 8,3$ Hz)	132,8	8,50 (d, $J = 8,5$ Hz)

*(SIMMLER, et al., 2011) ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) MeOD

Figura 17 - Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-3.

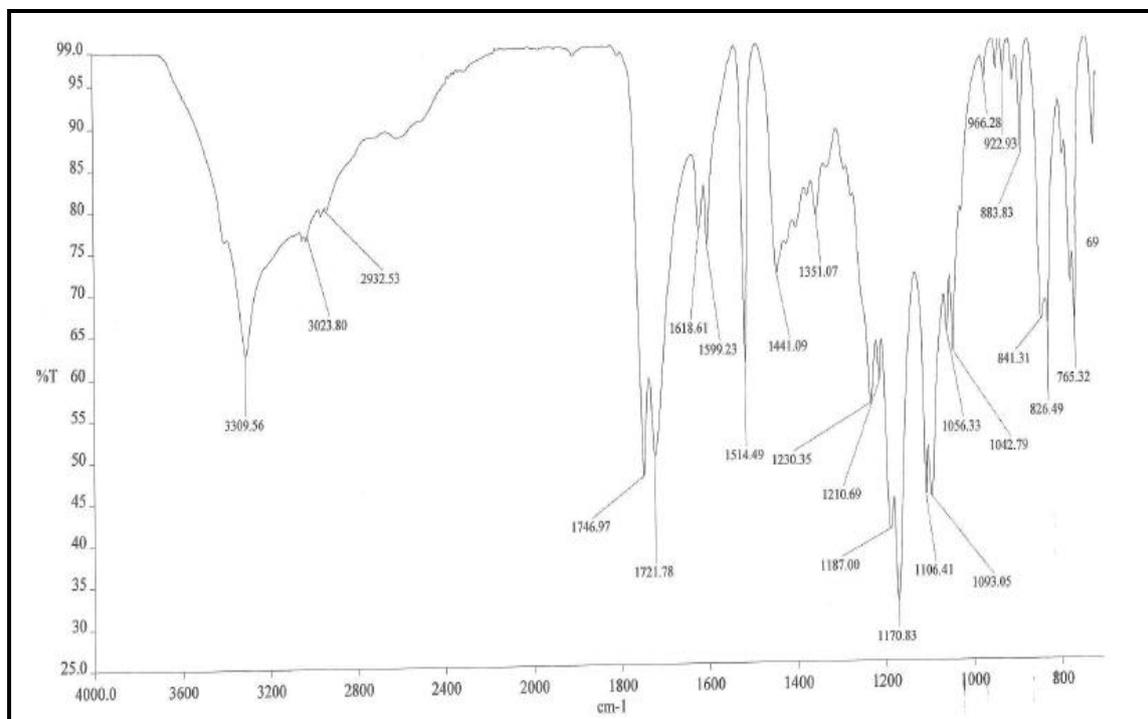


Figura 18 - Espectro de RMN ^1H de HS-3 (Piridina- d_5 , 300 MHz).

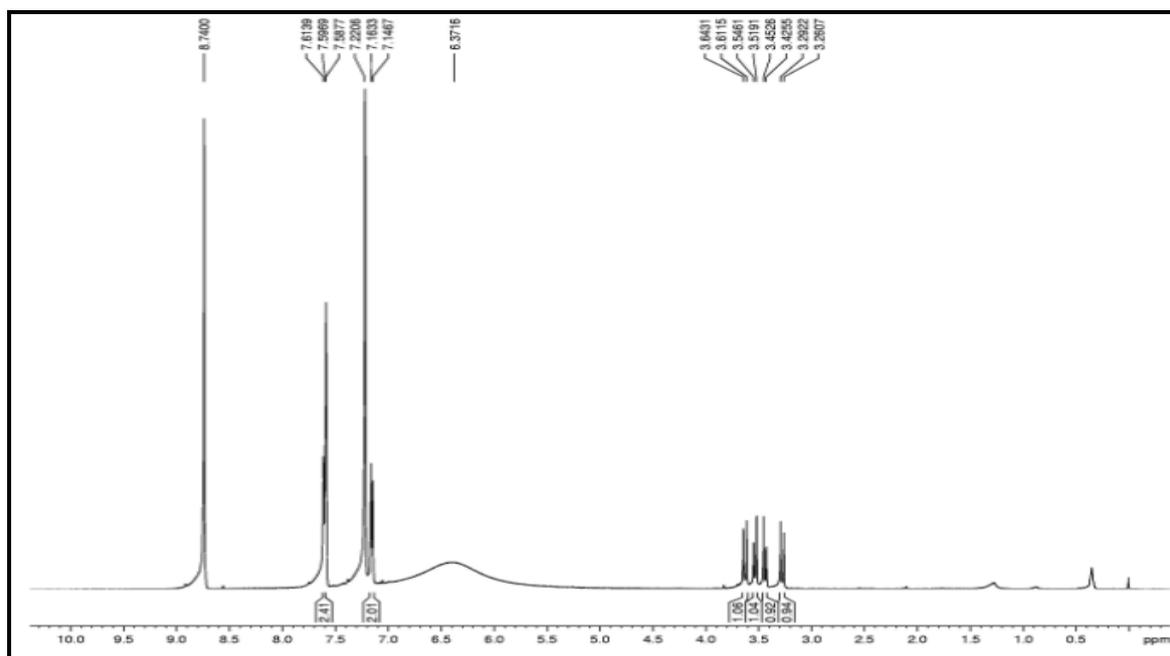


Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C de HS-5 (Piridina- d_5 , 125 MHz).

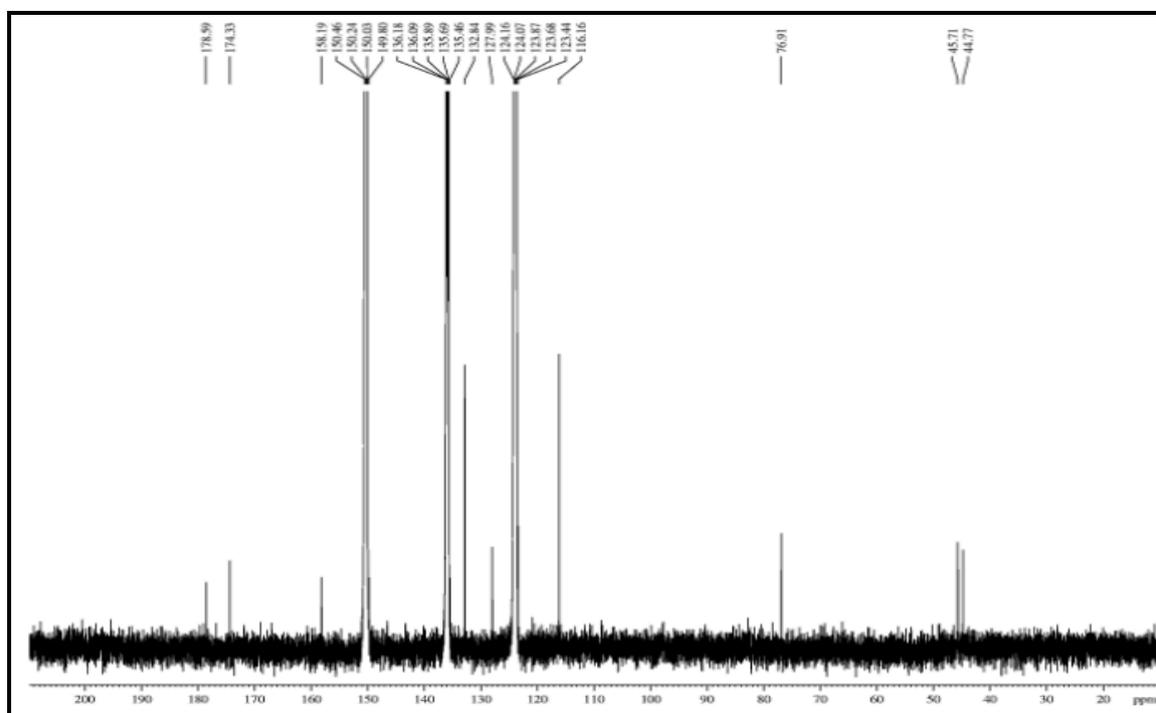
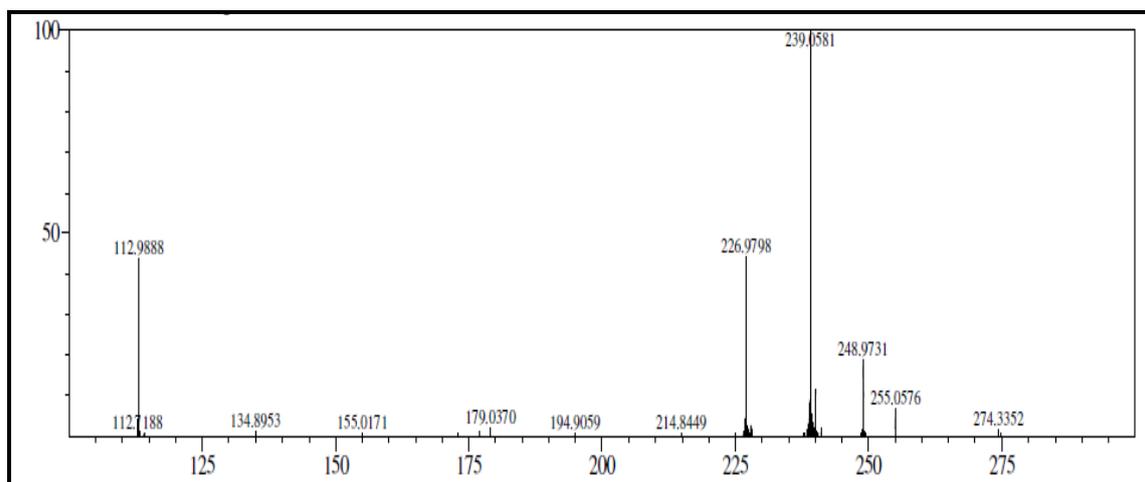


Figura 20 - Espectro de massa de alta resolução de **HS-3**, obtido por ESI no modo negativo.

4.1.5 Determinação estrutural de HS-4

O composto denominado de **HS-4**, foi isolado a partir de um sólido formado durante o processo cromatográfico da fração acetato de etila (Fluxograma 1, p. 124), oriundo da partição líquido-líquido do extrato EtOH, o qual foi submetido a purificação em CLAE. **HS-4** apresentou ponto de fusão na faixa de 245,3 – 245,9 e rotação óptica de $[\alpha]_D^{20} = 0,016$ (MeOH, c 0,014)

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 21, p. 57) mostrou uma banda larga em 3402 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O-H, absorção em 1689 cm^{-1} de vibração de deformação axial de C=O, banda em 1571 cm^{-1} referente a estiramento C=C de olefinas, absorções em 1497 , 1447 e 1423 cm^{-1} associadas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático, assim como bandas em 1275 , 1081 compatível com ligações C-O (PAIVA *et al.*, 2010).

O espectro de massa de alta resolução de **HS-4** (Figura 22, p. 51), obtido por ionização por *electrospray*, no modo positivo, exibiu um pico em m/z 308,0707, correspondente a molécula protonada $[M + H]^+$ e indicando a fórmula molecular $C_{14}H_{13}NO_7$ (calculada 308,0770), a qual apresenta IDH igual a 8.

O espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6 , Figura 23, p. 51) apresentou sinal em δ 9,57 (s) característico de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio bem como sinais na região de carbono sp^2 em δ 6,85 (H-10) e 6,15 (H-1) característicos de hidrogênio aromático e

hidrogênio olefina, respectivamente, além de um sinal com integração para dois hidrogênios em δ 6,03 (2H) característico de hidrogênios geminais de carbono dioxigenado. Adicionalmente foram observados três sinais indicativos de hidrogênios oxigenados em δ 4,02 (H-2), 3,79 (H-4) e 3,70 (H-3) e um sinal em δ 13,25 (s), indicativo de hidrogênio de um grupamento OH envolvido em ligação de hidrogênio.

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, Figura 24, p. 52) apresentou treze linhas espectrais, das quais nove foram correspondentes a carbonos sp^2 . Destes, seis [δ 129,2 (C-6a), 168,9 (C-7), 152,3 (C-8), 144,8 (C-9), 95,8 (C-10) e 132,1 (C-10a)] foram compatíveis com um anel aromático contendo três carbonos oxigenados (C-7, C-8 e C-9), um carbono metínico não-oxigenado (C-10) e um não-hidrogenado (C-10a). Os demais sinais de carbonos sp^2 [133,4 (C-10b) e 124,7 (C-1)] correspondem a dois carbonos olefínicos. Estes dados espectroscópicos estão em consonância com um alcalóide de esqueleto isoquinolínico (GIORDANI *et al.*; 2011). Com base nas informações apresentadas acima e comparação com dados de RMN ^1H e ^{13}C registrados na literatura (Tabela 7) (EVIDENTE *et al.*, 1991) foi possível afirmar que **HS-4** tratava-se de um alcaloide isoquinolínico conhecido como narciclasina, previamente isolado da espécie de *Narcissus tazetta* L. (CERIOTTI, *et al.*; 1967) no entanto, levantamento bibliográfico revelou que este composto está sendo registrado pela primeira vez no gênero. Embora o carbono C-6 ($\sim \delta$ 172), correspondente a carbonila não tenha sido observado. Esse fato pode ser justificado devido ao carbono carbonílico apresentar maior tempo de relaxação.

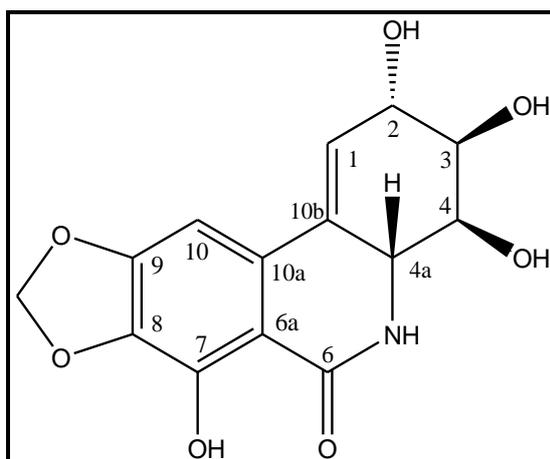


Tabela 7 – Dados de RMN ^1H 500 MHz ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6 de HS-4.

C	HSQC		HSQC* Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	124,7	6,15 (sl)	124,7	6,15 (ddd, $J = 1,0, 2,4$)
2	69,1	4,02 (sl)	69,1	4,01 (ddd, $J = 2,4, 1,2$)
3	72,3	3,70 (sl)	72,3	3,69 (ddd, $J = 2,4$)
4	68,8	3,79 (dd, $J = 8,3;$ 1,4)	68,8	3,78 (dd, $J = 8,5$)
4a	52,9	4,20 (d, $J = 8,2$)	52,8	4,18 (dl)
6	-	-	172,1	-
6a	129,2	-	129,2	-
7	168,9	-	168,9	-
8	152,3	-	152,3	-
9	144,8	-	144,8	-
10	95,8	6,85 (s)	95,7	6,84 (s)
10a	132,1	-	132,1	-
10b	133,4	-	133,3	-
-CH₂-O	102,0	6,08 (d, $J = 1,8$)	102,0	6,09 (d, $J = 1,2$)
HN-5	-	7,88 (s)	-	7,88 (s)
HO-7	-	13,25 (s)	-	13,24 (s)

* ^1H 500 MHz e ^{13}C e 67,92 MHz, DMSO- d_6 (EVIDENTE *et al.*, 1991)

Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-4.

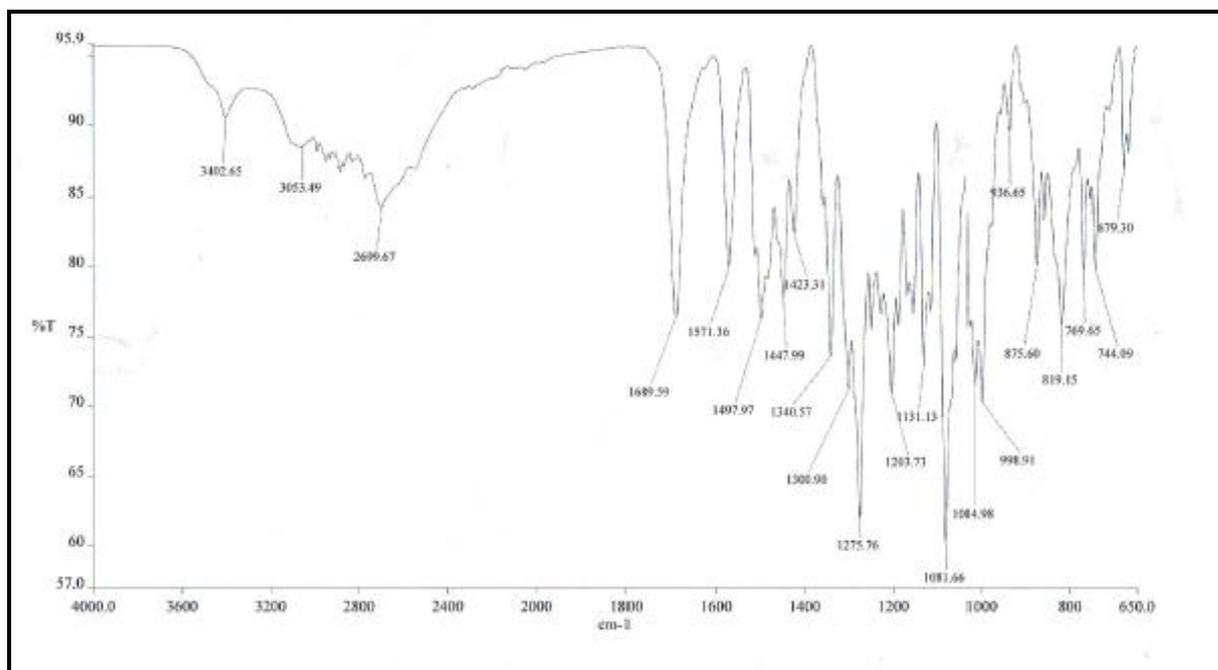


Figura 22 - Espectro de massa de alta resolução de **HS-4**, obtido por ESI no modo positivo.

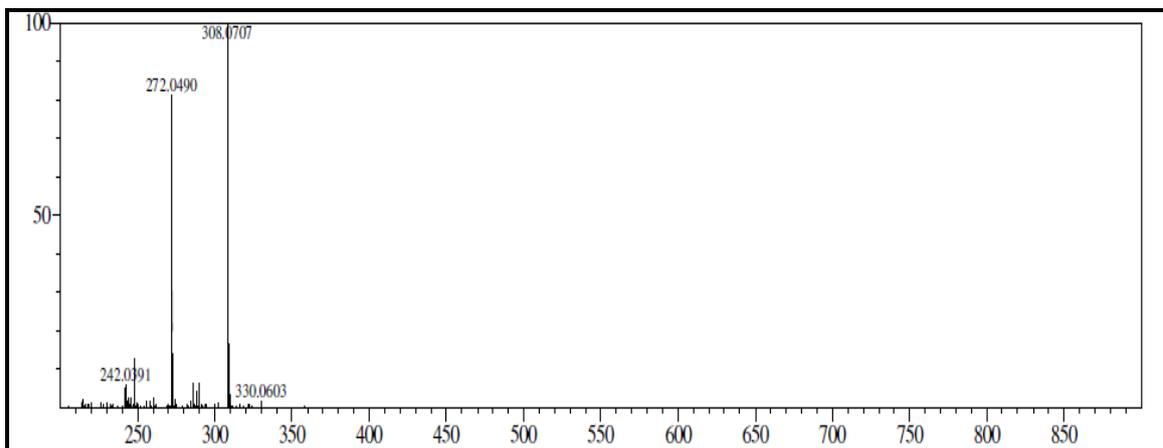


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H de **HS-4** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz).

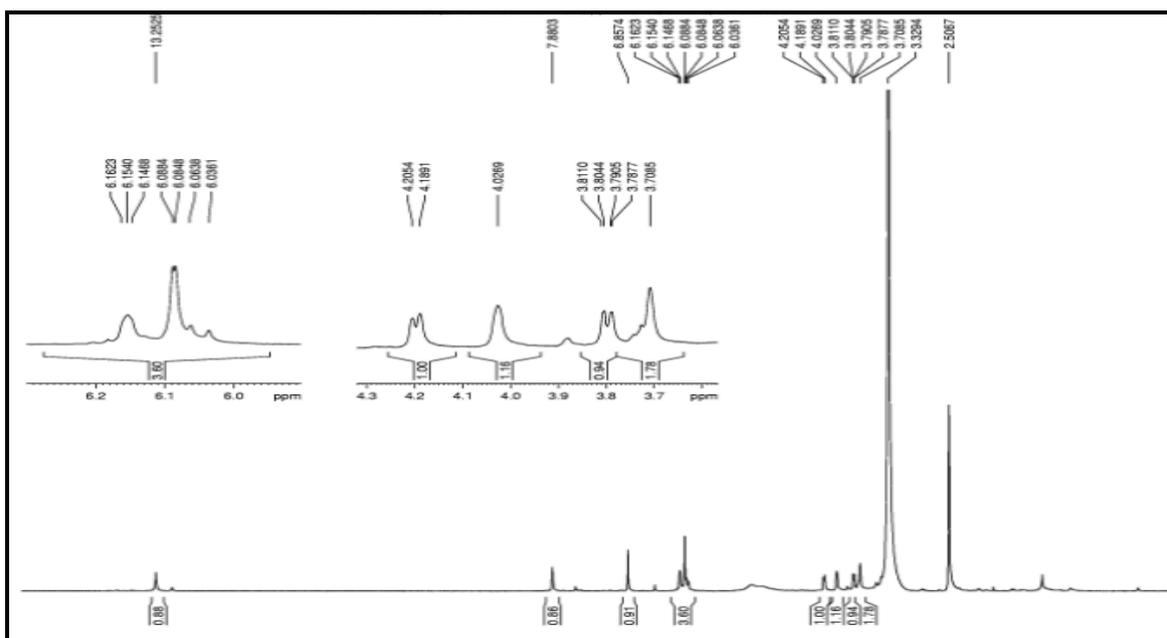
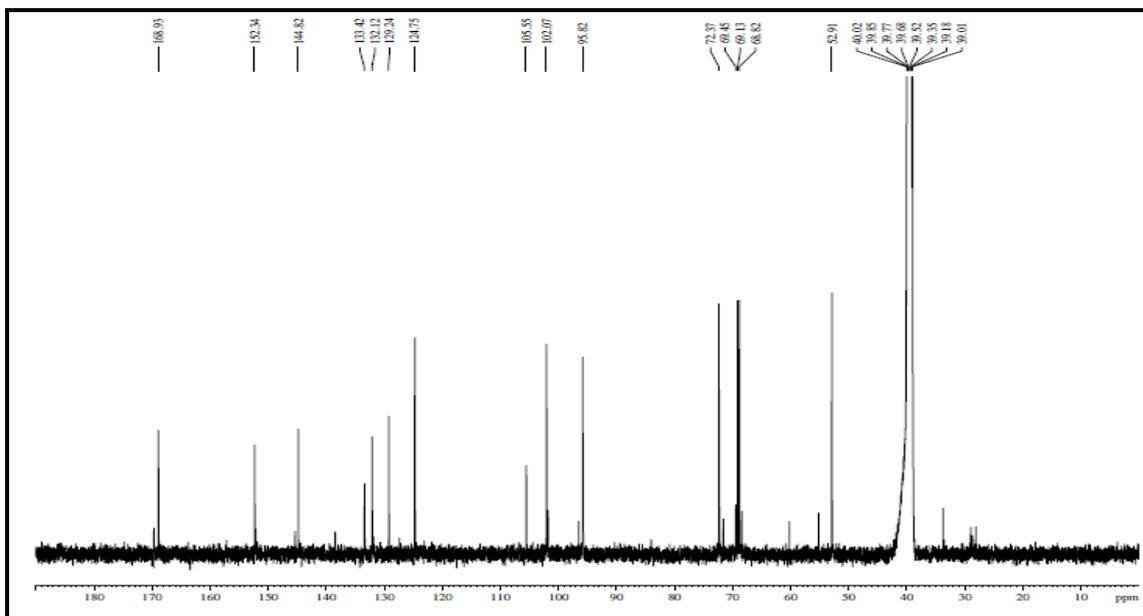


Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C de **HS-4** (DMSO- d_6 , MHz).

4.1.6 Determinação estrutural de HS-5

O composto denominado HS-5, um sólido branco, com ponto de fusão 230-233°C e rotação óptica de $[\alpha]_D^{20} = +0,036$ (MeOH, c 0,014), foi isolado a partir da fração alcaloídica, obtida com acetato de etila (Fluxograma 2, p. 125)

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 27, p. 57) mostrou uma banda larga em 3314 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O-H, absorção em 1665 cm^{-1} referente a estiramento C=C de olefinas, absorções em 1589, 1514 e 1440 cm^{-1} associadas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático, assim como uma banda em 838 cm^{-1} compatível com deformação angular fora do plano de ligação C-H de anel aromático (PAIVA *et al.*, 2010).

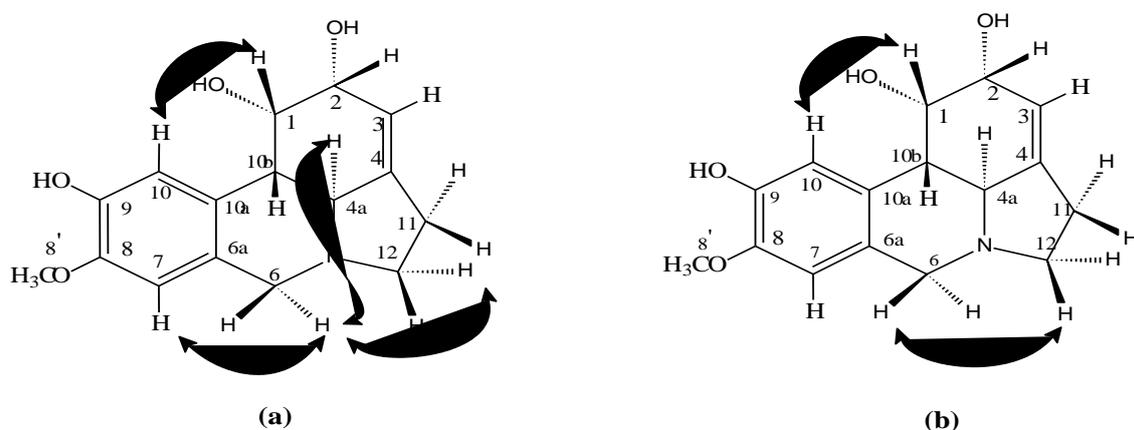
O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD – Figura 29, p. 58) apresentou sinais em δ 6,76 (s, H-7) e 6,88 (s, H-10) referentes a hidrogênios aromáticos, *para*-posicionados, além de um sinal em δ 5,60 (s, H-3) o qual infere uma ligação dupla trissubstituída, dois dubletos em δ 4,16 (d, $J = 13,7$; H- α) e 3,75 (d, $J = 13,7$; H- β) correspondentes aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos 2H-6, entre o grupo amino e o anel aromático. A blindagem do hidrogênio β , em relação ao α , se deve à presença do par de elétrons do nitrogênio, o qual mantém uma relação *cis* entre o par de elétrons livre do nitrogênio e o hidrogênio β . Dois

dubletos em δ 2,76 (H-10b) e 3,12 (H-4a), com constante de acoplamento de 11 Hz, característicos de união *trans* entre os anéis B e C de um sistema tetracíclico. Adicionalmente, exibiu hidrogênios metínicos oxigenados em δ 4,49 (s, H-1) e 4,18 (d, $J = 1,6$ Hz, H-2), além de um singlete em δ 3,80 (O-CH₃), característico de um grupo metoxila. Estes sinais estão de acordo com os dados descritos previamente para o alcalóide isoquinolínico, denominado pseudolicorina (LLABRÉS *et al.*; 1986).

O espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD – Figura 32, p. 59) exibiu dezesseis linhas espectrais, as quais, ao comparar com o carbono DEPT 135 (Figura 31, p. 59) exibiu três carbonos metilênicos, dois deles nitrogenados em δ 54,98 (C-12) e 56,95 (C-6), um metílico em δ 56,7 (C-8), sete carbonos metínicos, entre os quais, um carbono metínico nitrogenado em δ 62,8 (C-4a) e cinco carbonos não-hidrogenados. Estes dados espectroscópicos são compatíveis com aqueles da pseudolicorina (LLABRÉS *et al.*; 1986). Essa proposta estrutural foi confirmada através das correlações observadas no espectro HMBC (Figura 33, p. 60) entre o hidrogênio em δ 6,76 (s, H-7) com o carbono em δ 56,95 (C-6), do hidrogênio em δ 6,88 (s, H-10) com carbono em δ 43,5 (C-10b), bem como a correlação do hidrogênio em δ 5,60 (s, H-3) com os carbonos em δ 62,8 (C-4a) e 73,0 (C-2), além da correlação do sinal δ 3,8 (s) com o carbono δ 148,0 (C-8).

No espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY (Figura 34, p. 61) de **HS-5** foram observados os acoplamentos dos hidrogênios em δ 2,67/2,63 (2H-11) com os hidrogênios em δ 3,40/2,71 (2H-12), os quais no espectro de HSQC (Figura 35, p. 62) mostraram correlações com os carbonos em δ 29,5 e 54,9, respectivamente, configurando um sistema isolado de dois carbonos metilênicos e corroborando a proposta estrutural.

As interações espaciais observadas no espectro NOESY (Figura 36, p. 63) acoplamentos dipolares importantes estão ilustrados na Figura 35, justificando a atribuição da estereoquímica dos demais centros estereogênicos presentes na molécula, igual àquela estabelecida para a pseudolicorina. A análise desses dados permitiu identificar o composto **HS-5** como sendo um análogo da pseudolicorina.

Figura 25 - Estrutura tridimensional de **HS-5**, destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY.

A análise do espectro de massa de alta resolução de **HS-5** (Figura 28, p. 57), obtido por ionização por *electrospray* (IES), mostrou o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 290,1365, indicando a fórmula molecular $C_{16}H_{19}NO_4$ (calculada 290,1387; erro= 1,03 ppm), assim como os fragmentos observados na própria fonte foram de extrema importância para elucidação estrutural de **HS-5**. Este espectro apresentou picos em m/z 272,1276 e 254,1181 referentes à perda de duas moléculas de água no composto, e o pico em m/z 228,0955, compatíveis com a eliminação de H_2 (anel A) e a perda de $C_2H_2O_2$ através de rearranjo retro Diels Alder do anel C, ilustrados na (Figura 26, p. 55).

Diante das informações obtidas dos espectros de RMN 1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, IV e EMAR e comparação com dados da literatura levaram a concluir que **HS-5** tratava-se de metabólito secundário da classe isoquinolínico, inédito na literatura.

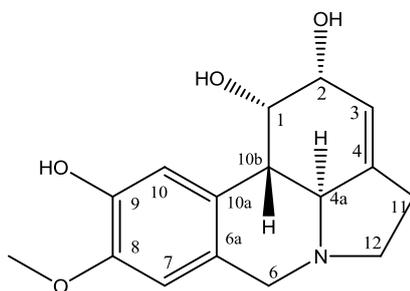


Figura 26 – Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais $[M+H]^+$ registrados no espectro de massa (EM/EM-IES) de **HS-5**.

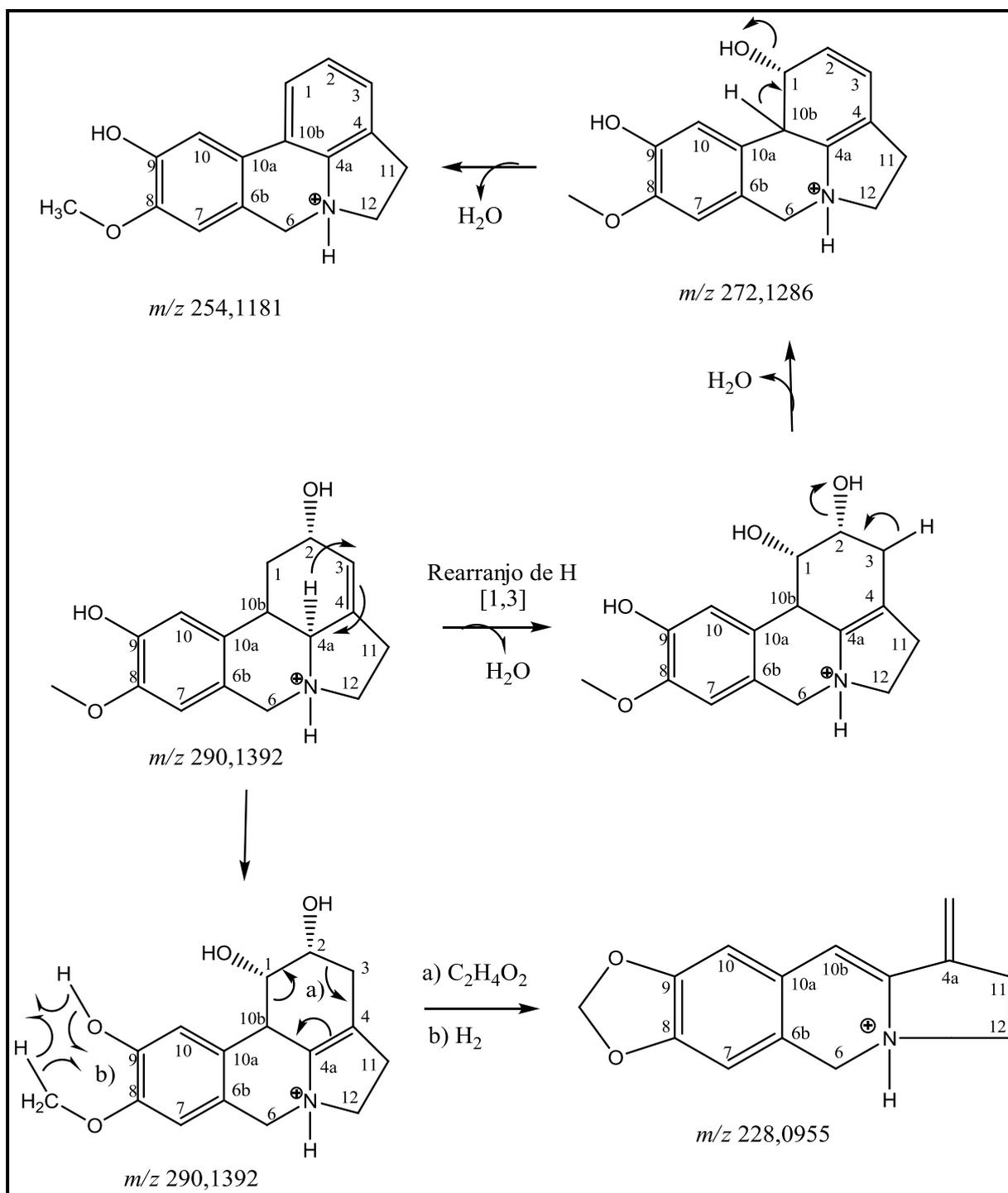


Tabela 8 - Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) do composto **HS-5**.

C	HSQC		Lit*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1	70,7	4,49 (sl)	71,7	4,85 (sl)
2	71,8	4,18 (d, $J = 1,6$)	73,0	4,50 t (1,6)
3	118,6	5,60 (s)	120,4	5,60 t (2,4)
4	141,7	-	142,4	-
4a	61,4	3,12 (d, $J = 10,9$)	62,8	3,02 (d, $J = 11,2$)
6	56,4	a 4,16 (d, $J = 13,7$)	56,9	3,68 (d, $J = 14,4$)
		b 3,75 (d, $J = 13,7$)		4,16 (d, $J = 14,4$)
6a	127,3	-	128,9	-
7	110,5	6,76 (s)	112,0	6,71 (s)
8	146,2	-	148,0	-
9	145,1	-	147,1	-
10	111,3	6,88 (s)	112,9	6,89 (s)
10a	126,5	-	127,0	-
10b	43,5	2,76 (d, $J = 11,0$)	40,5	-
11	28,3	a 2,67 (m)	29,5	2,6 – 2,7 (m)
		b 2,63 (m)		-
12	53,9	a 3,40 (m)	54,9	2,6 – 2,7 (m)
		b 2,71 (m)		3,37 (dd, 9,6; 2,4)
H₃CO-8	56,1	3,88 (s)	56,7	3,84 (s)

* (LLABRÉS *et al.*; 1986) ^1H (100 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$.

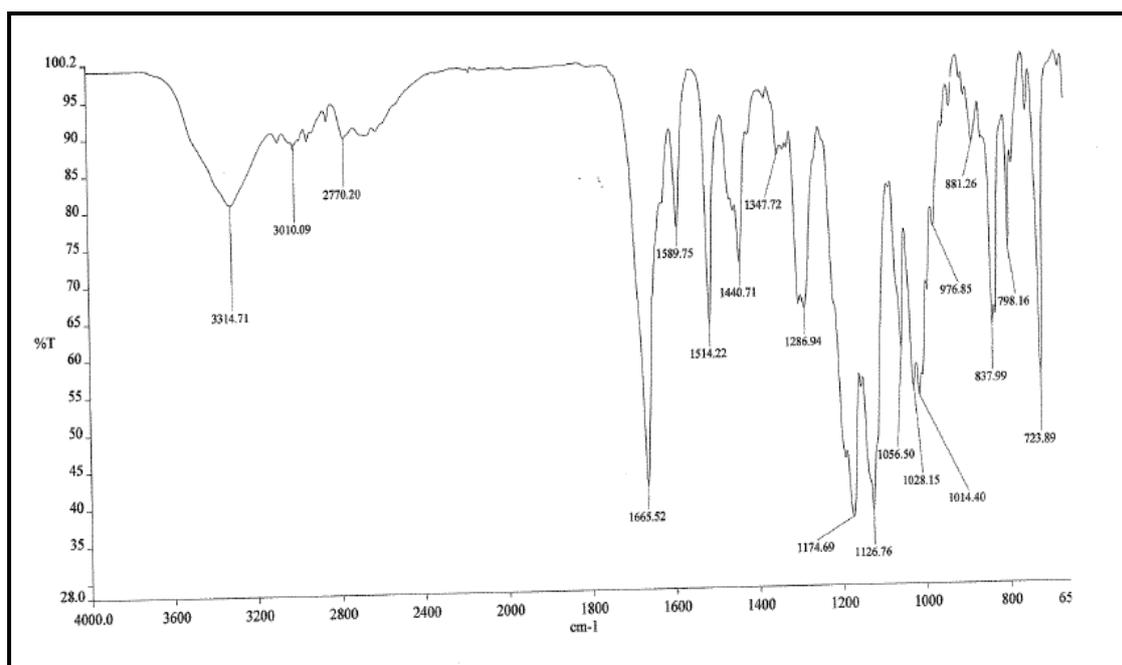
Figura 27 - Espectro de absorção na região do infravermelho de **HS-5**.

Figura 28 - Espectro de massa de alta resolução de HS-5, obtido por IES no modo positivo.

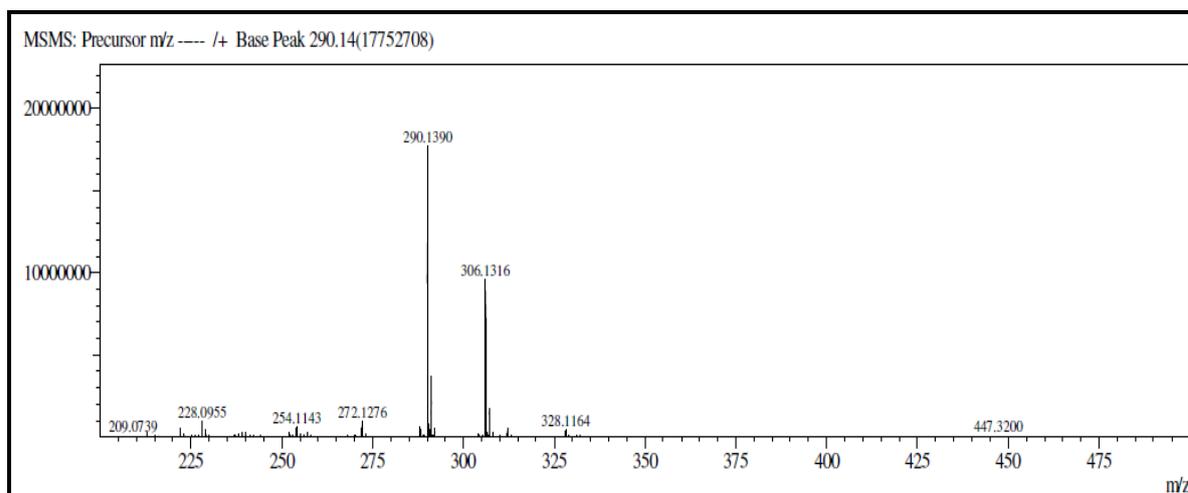


Figura 29 - Espectro de RMN ¹H de HS-5 (CD₃OD, 500 MHz).

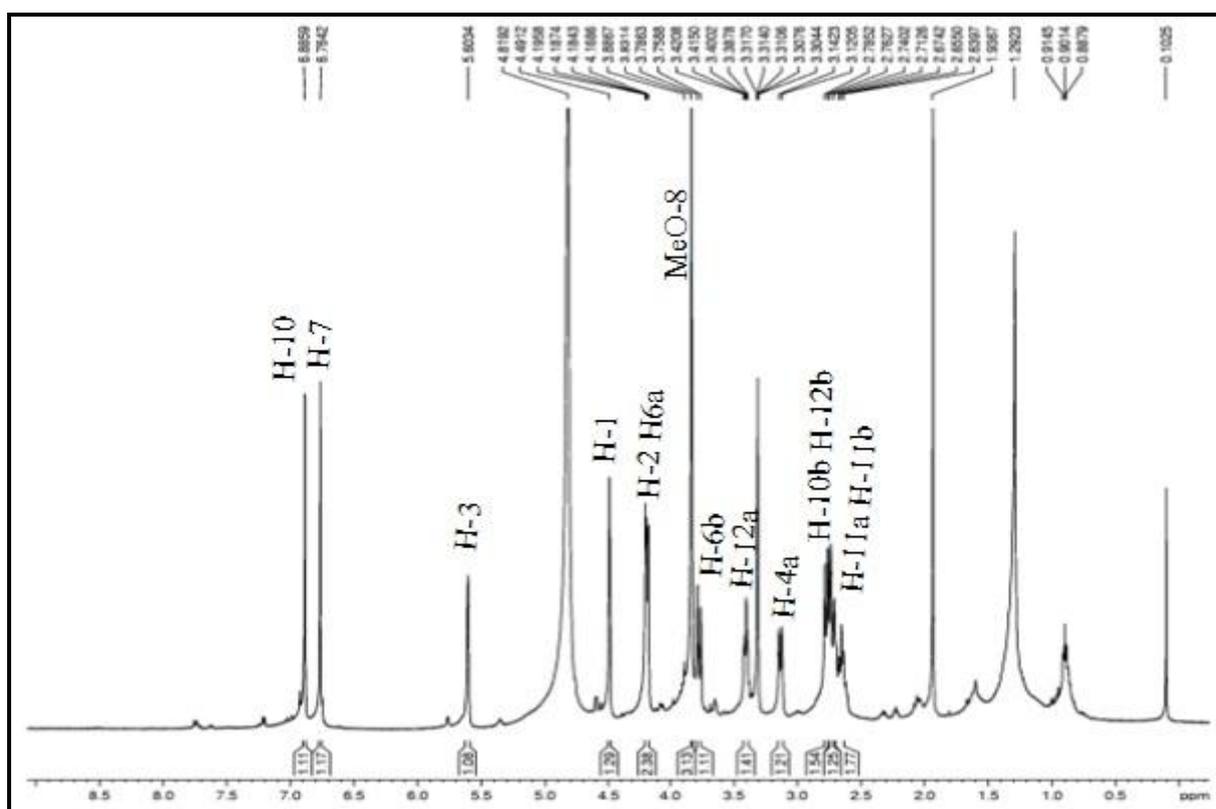


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN ^1H de HS-5 (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 5,7 e 2,5 ppm.

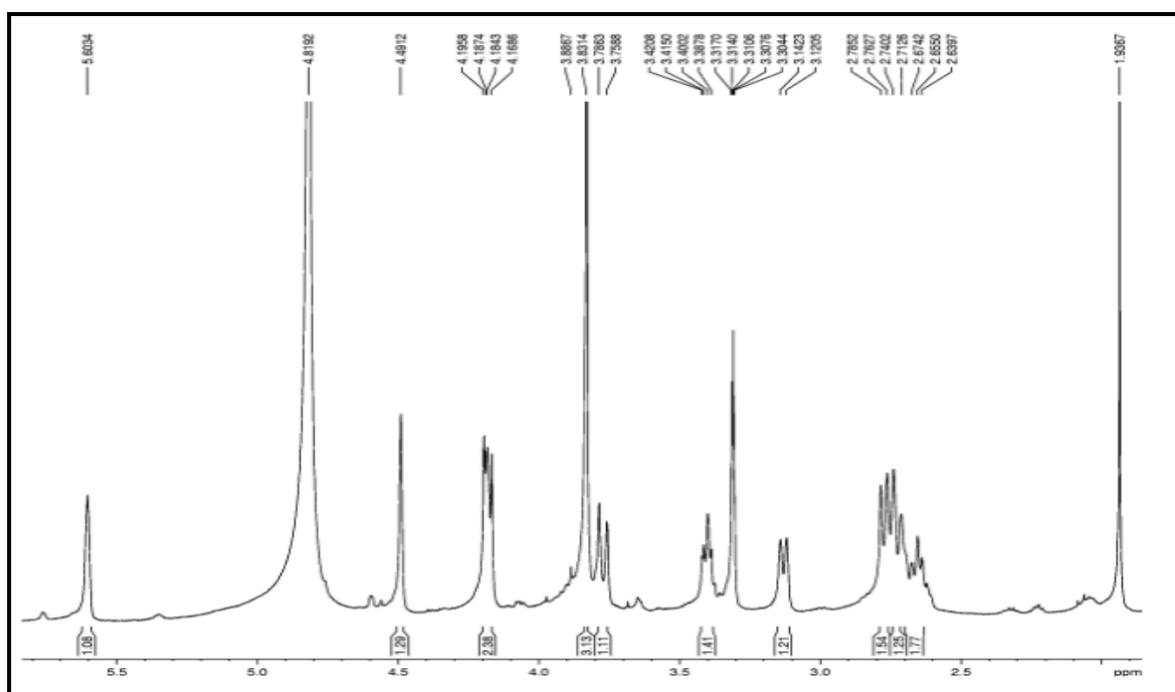


Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 de HS-5 (CD_3OD , 125 MHz).

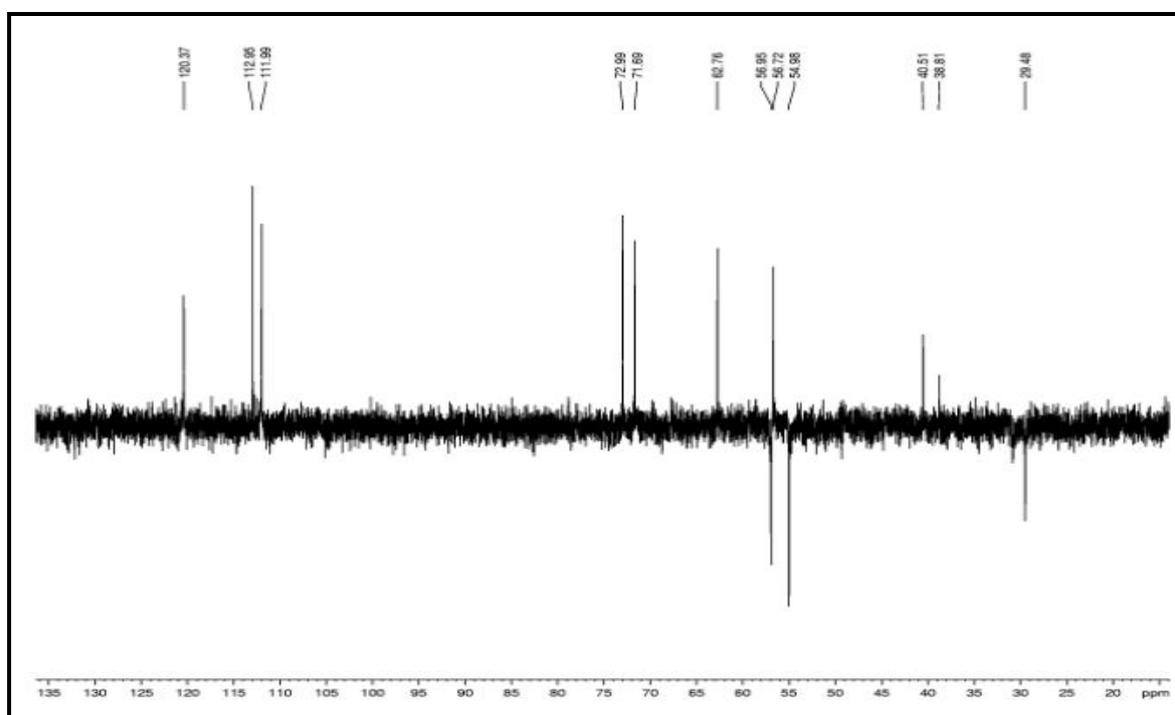


Figura 32 - Espectro de RMN ^{13}C de **HS-5** (CD_3OD , 125 MHz).

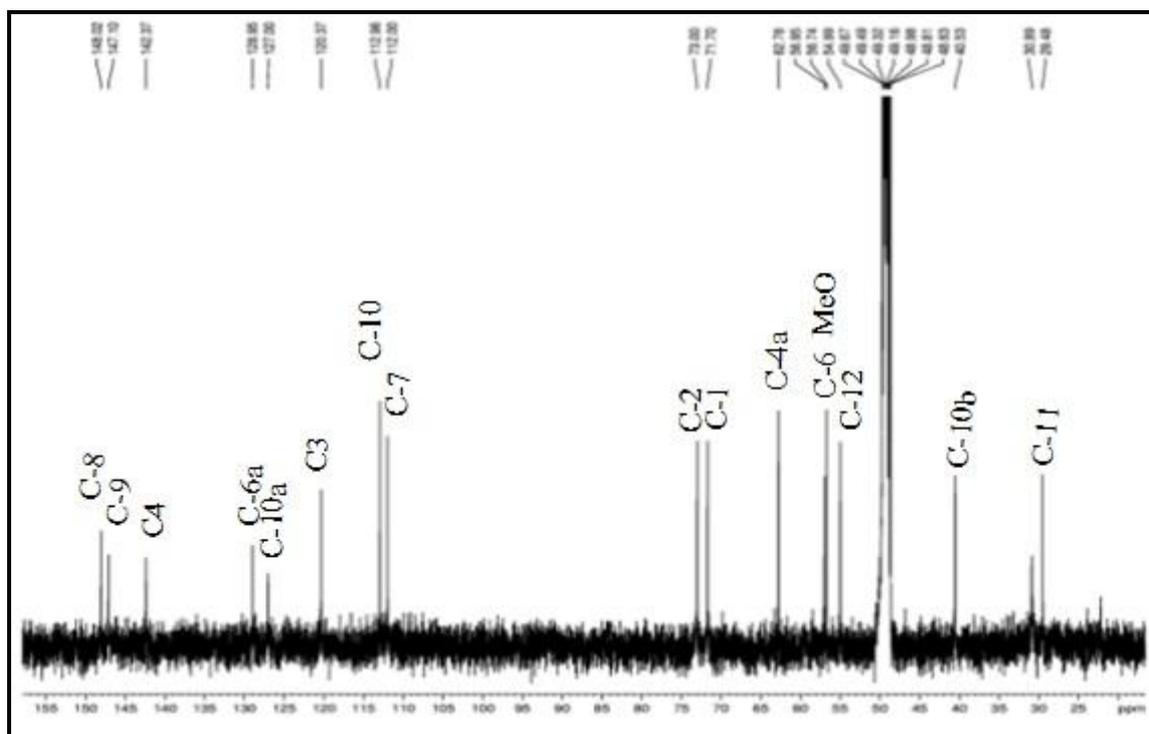


Figura 33 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de **HS-5** (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

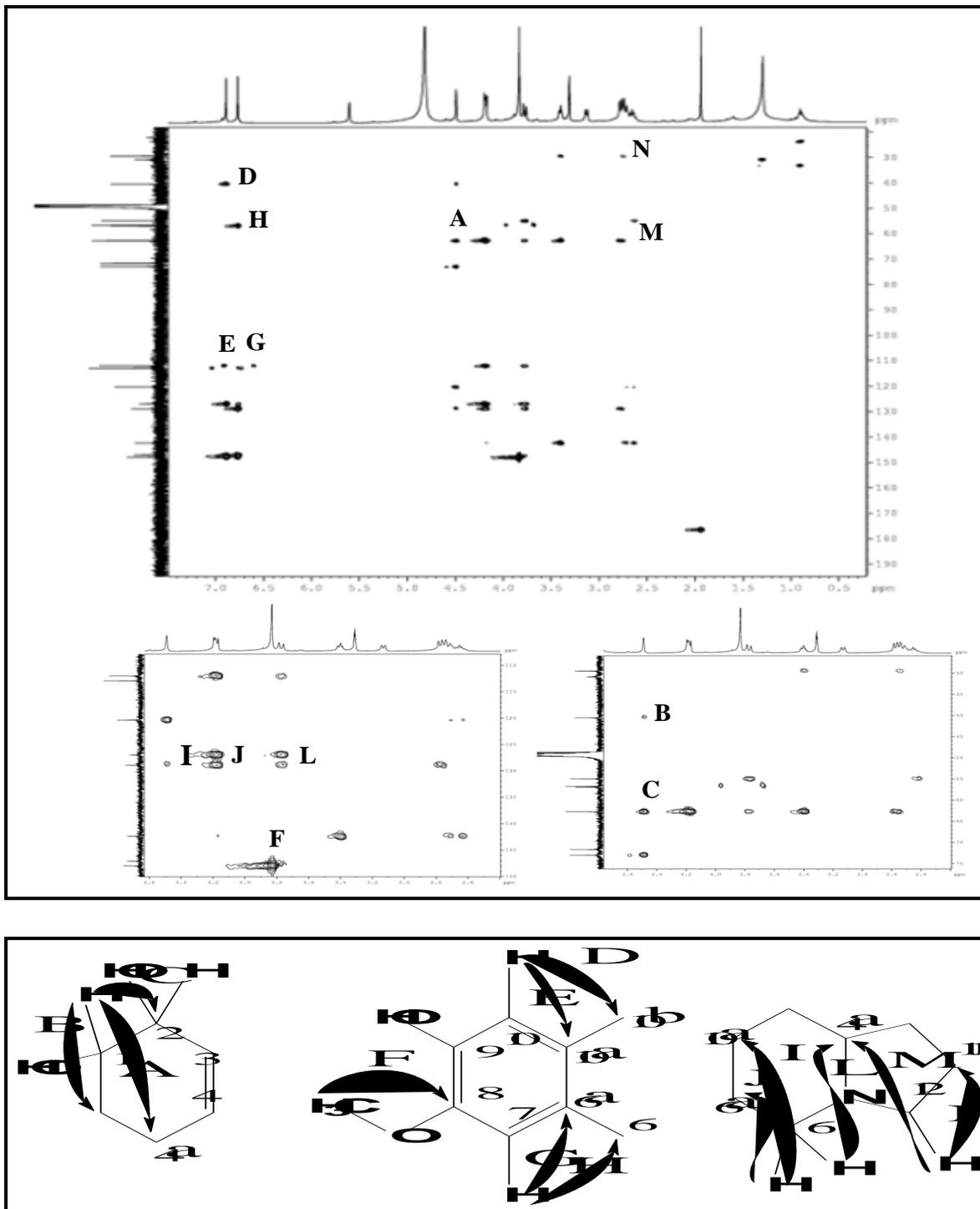


Figura 34 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de **HS-5** (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.

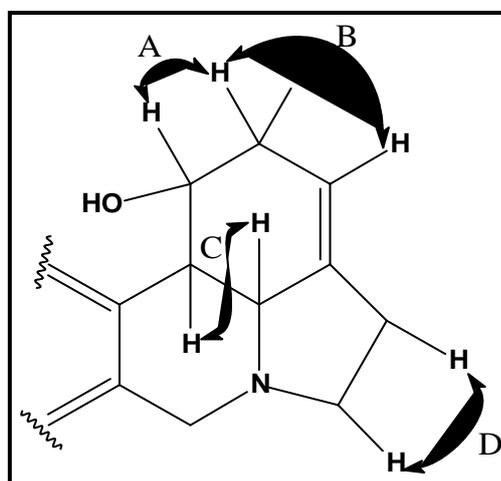
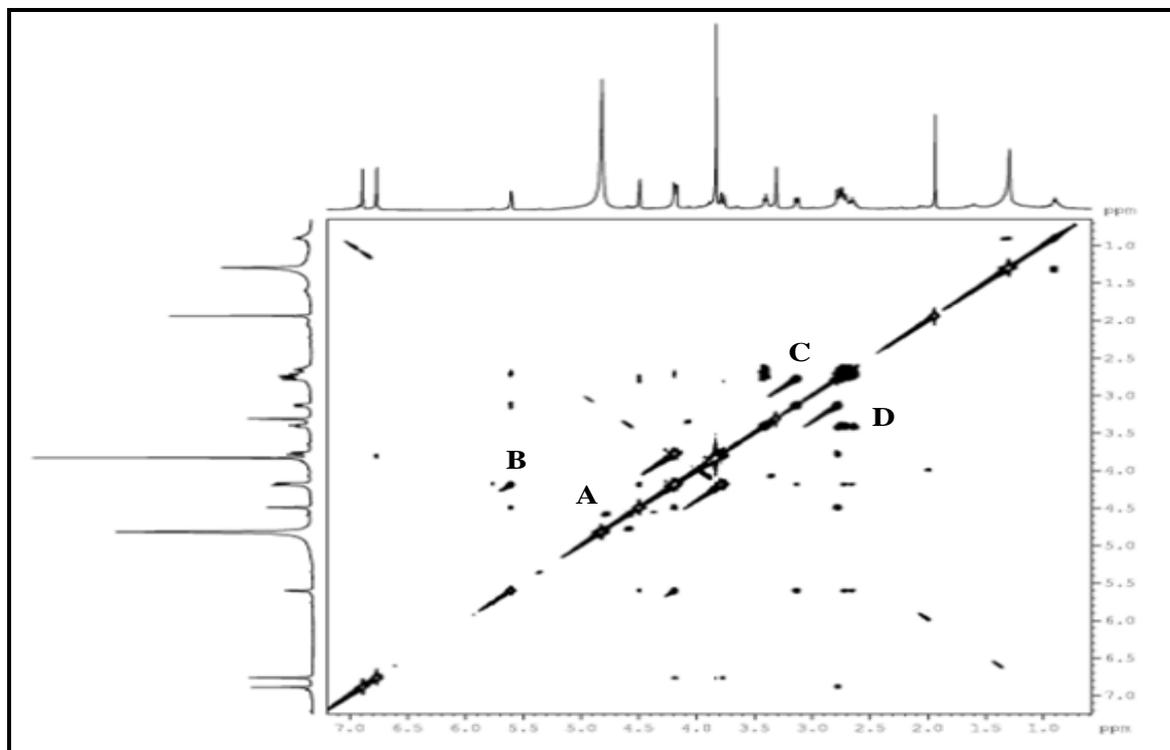


Figura 35 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de **HS-5** (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

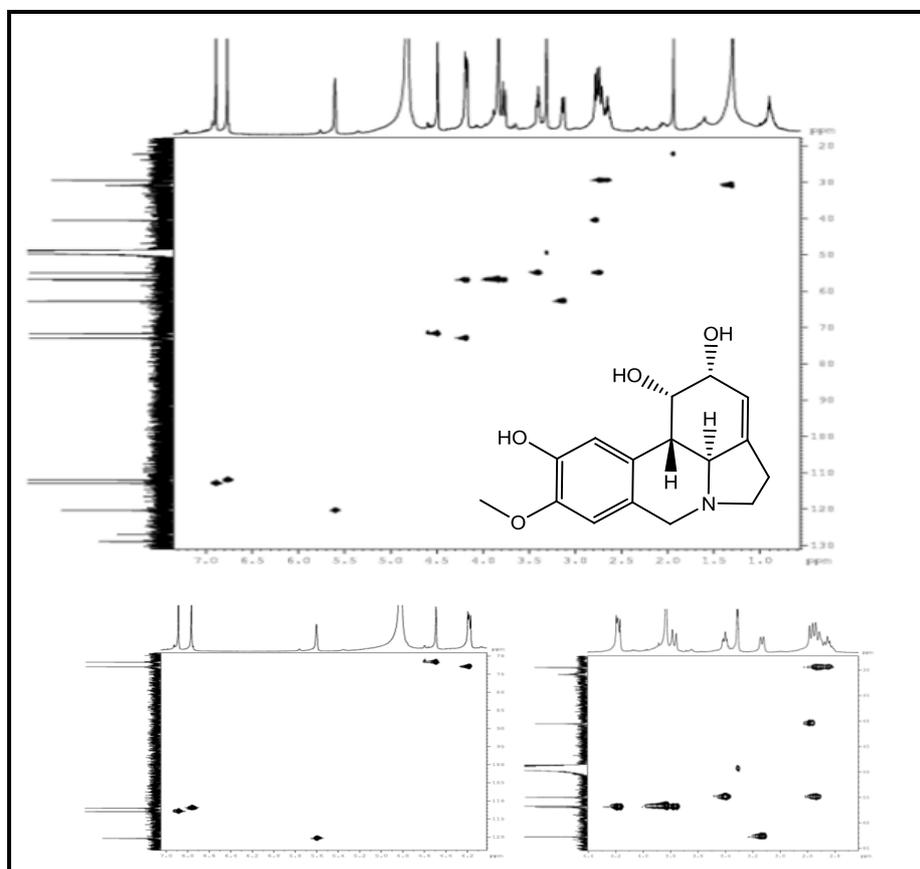
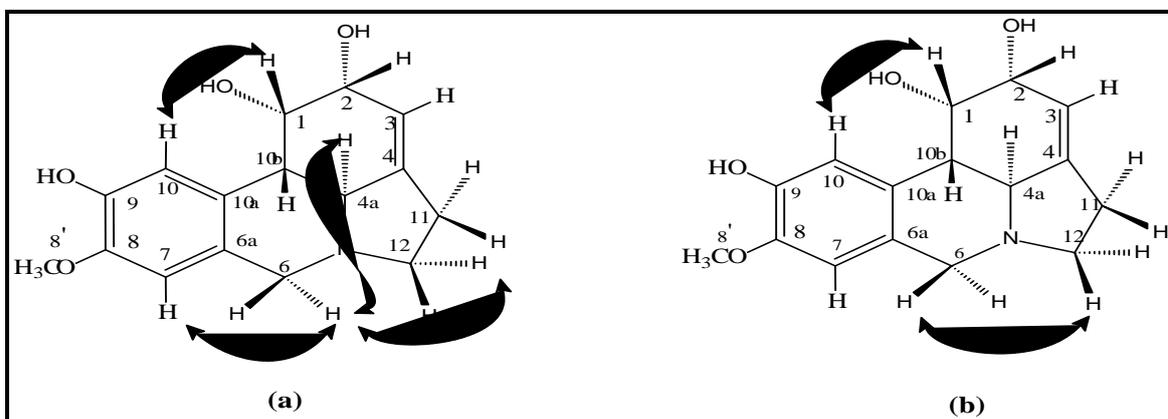
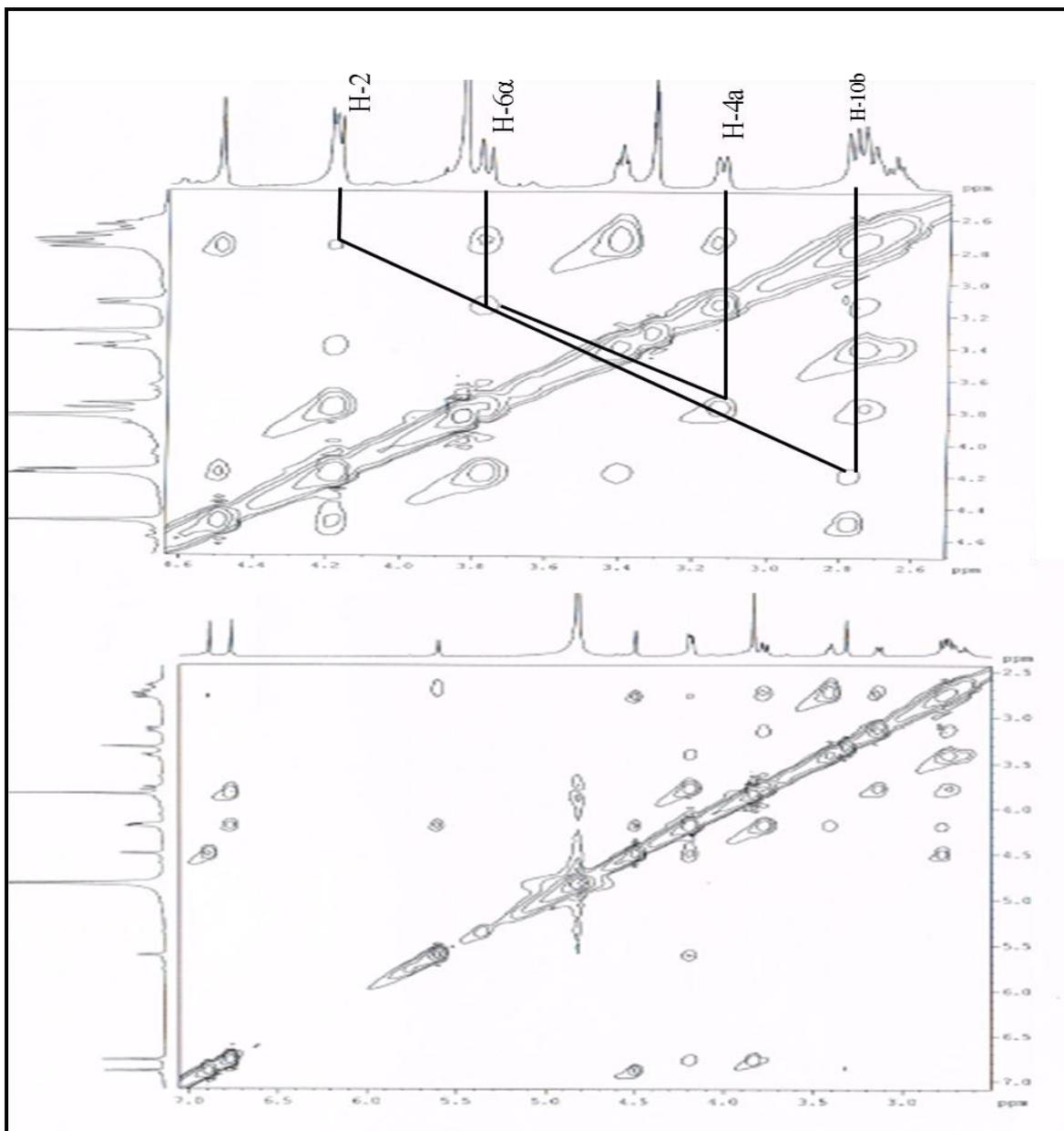


Figura 36 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de **HS-5** (CD_3OD , 500 x 500 MHz) e expansão.



4.1.7 Determinação estrutural de HS-6

O composto **HS-6**, um sólido branco, com ponto de fusão 252,3- 252,8 °C e rotação óptica de $[\alpha]_D^{20} = + 40,2$ (MeOH, *c* 0,14), foi isolado a partir da fração alcaloídica, obtida da fração acetato de etila (Fluxograma 2, p. 125).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 39, p. 68) mostrou uma banda em 3461 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O-H, uma banda em 1719 cm^{-1} de vibração de deformação axial de C=O, evidenciando a existência de uma carbonila conjugada, uma banda de deformação axial em 1673 cm^{-1} indicando ligação C=C de olefina, bandas esqueléticas em 1597, 1523 e 1447 cm^{-1} de anel aromático, além de estiramentos em 1172 e 1132 cm^{-1} característicos de ligação C-O (PAVIA, 2010).

O espectro de massa de alta resolução de **HS-6** (Figura 40, p. 68), obtido por ionização por *electrospray* e no modo positivo, exibiu um pico em m/z 334,1272 correspondente a molécula protonada $[M + H]^+$, conduzindo à fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_6$ (calculado m/z 334,1285), a qual apresenta 9 graus de instauração.

O espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD – Figura 41 e 42, p. 69) exibiu sinais na região de aromático em δ 7,30 (s, H-7) e 7,57 (s, H-10), compatíveis com dois hidrogênios *para*-posicionados, um singlete em δ 5,96 (H-3), o qual foi inferido a uma ligação dupla trissubstituída, bem como dois singletos intensos em δ 2,62 e 3,94 correspondentes a grupos metílicos ligados a nitrogênio (CH_3-N) e oxigênio (CH_3-O), respectivamente, sugerindo um alcalóide isoquinolínico do tipo homolicorina (BASTIDA *et al.*, 1988). Adicionalmente, foi observado um singlete em δ 4,61 (s, H-1), o qual apresentou correlação com o sinal de carbono em δ 83,4 (C-1) no espectro HSQC (Figura 45, p. 71), além de uma série de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 .

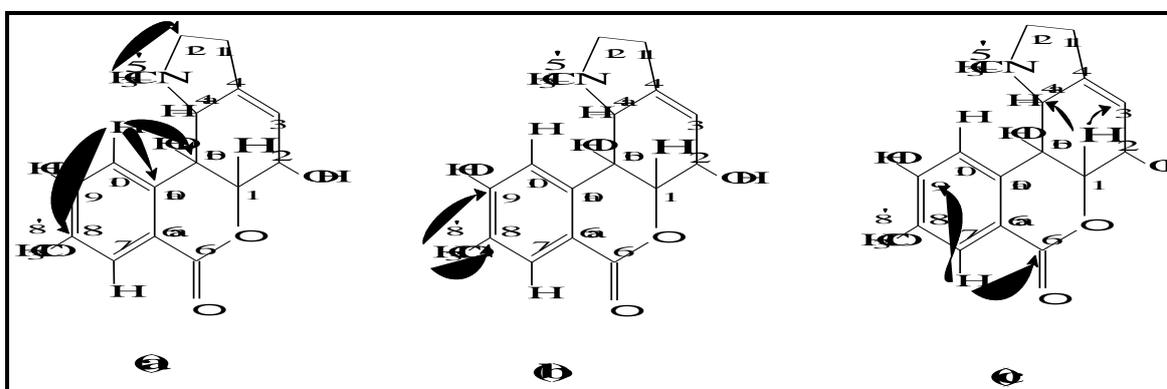
O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD – Figura 43 e 44, p. 70) exibiu dezessete linhas espectrais, correspondentes a dois carbonos metílicos, um dos quais compatível com uma metoxila, dois carbonos metilênicos, seis carbonos metínicos e sete carbonos não-hidrogenados, quando comparado com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 44, p. 70). Os sinais em δ 112,3 (C-10), 114,3 (C-7), 115,3 (C-6a), 135,5 (C-10a), 150,1 (C-9), 154,5 (C-8) e 165,4 (C-6), sugerem uma lactona conjugada a um anel aromático, corroborando com o

espectro de IV. Esses sinais são característicos dos anéis A e B de alcaloide isoquinolínico e de esqueleto homolicorínico (BASTIDA, *et al.*; 1988).

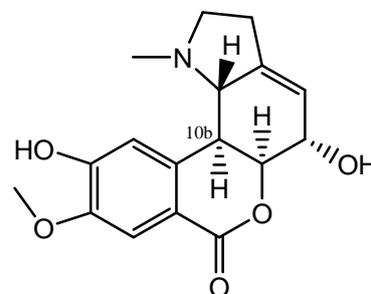
Através do espectro de COSY (Figura 46, p. 72) foram observados os acoplamentos dos hidrogênios em δ 2,80/2,91 (2H-11) com os hidrogênios em δ 3,31/3,75 (2H-12), os quais no espectro HSQC mostraram correlações com os carbonos em δ 28,2 e 57,7, respectivamente, configurando um sistema isolado de dois carbonos metilênicos. Adicionalmente foram observados acoplamentos entre o sinal em δ 5,96 (H-3) com o hidrogênio em δ 4,07 (H-2), bem como os acoplamentos em W entre H-3 e H-4a (δ 4,36), assim como de H-3 com H-1 (δ 4,61).

A proposta estrutural final foi confirmada através das correlações observadas no espectro HMBC (Figura 47, p. 73) entre os sinais dos hidrogênios em δ 7,30 e 7,57 (H-7 e H-10) com os carbonos em δ 165,5 (C-6) e δ 67,3 (C-10b). Assim como, as correlações entre o sinal em δ 5,96 (H-3) com δ 68,1 (C-4a) 72,3 (C-2), 123,7 (C-3) e 140,3 (C-4), confirmaram a presença de uma ligação dupla entre os carbonos C-3 e C-4. Verificou-se também a correlação dos hidrogênios metílicos em δ 2,62 (3H) com o sinal em δ 57,7 (C-11), indicando a presença de um grupo metílico ligado ao átomo de nitrogênio. A metoxila foi posicionada no C-8 com base na correlação entre os hidrogênios em 3,94 (3H) com o sinal de carbono em δ 150,1 (C-9).

Figura 37 - Importantes correlações a longa distância (^1H - ^{13}C), observadas no espectro bidimensional HMBC do composto **HS-6**.

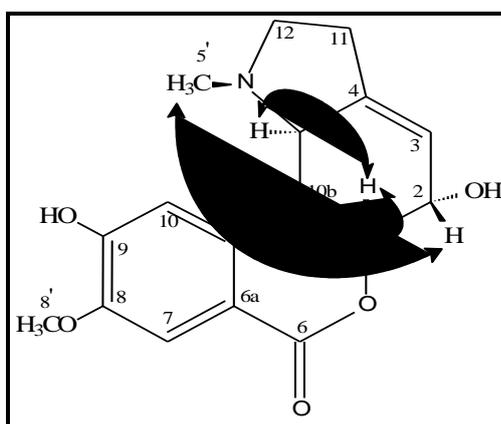


Os dados discutidos foram semelhantes àqueles descritos para o composto conhecido como homolicorina (BASTIDA *et al.*, 1988). A principal diferença foi observada no sinal em δ 67,3 (C-10b), que quando comparado com o valor de deslocamento químico atribuído a este mesmo carbono δ 40,0 (C-10b) na homolicorina, mostrou uma desblindagem da ordem de $\Delta\delta$ 27,3 ppm, para **HS-6**. Esta diferença foi compatível com a presença de uma hidroxila no C-10b.



A estereoquímica relativa dos estereocentros do referido composto foi estabelecida através do espectro NOESY (Figura 48, p. 74). O NOE observado entre os hidrogênios em δ 2,62 (CH₃-N) e 4,07 (H-2), indicaram que esses hidrogênios se encontram β -posicionados, e portanto, em consonância com a homolicorina. As interações espaciais observadas entre o hidrogênio em δ 4,61 (H-1) com os hidrogênios em δ 4,36 (H-4a) e 6,7 (10b-OH), foram indispensáveis para a atribuição da orientação α da hidroxila ligada ao C-10b.

Figura 38 - Estrutura tridimensional de **HS-6**, com setas duplas mostrando os acoplamentos dipolares detectados no experimento NOESY.



A reunião dos dados acima discutidos permitiu afirmar que **HS-6** se tratava do alcaloide isoquinolínico 10 α -hidroxi-homolicorina. Um minucioso levantamento bibliográfico revelou que este composto está sendo registrado pela primeira vez.

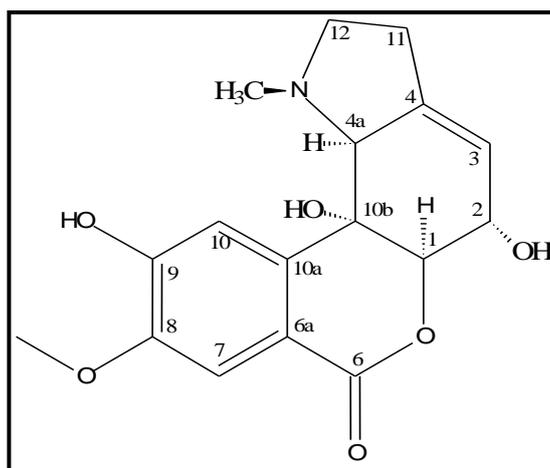


Tabela 9 – Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CD_3OD de **HS-6**.

C	HSQC		HSQC* Lit.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	83,4	4,61 (s)	83,6	4,63 (dd, $J = 3,6; 1,6$)
2	72,3	4,07 (s)	70,8	4,32 (m)
3	123,7	5,96 (s)	118,4	5,74 (m)
4	140,3	-	145,2	-
4a	68,1	4,36 (s)	67,6	2,5 (m)
6	165,5	-	165,8	-
6a	115,3	-	116,4	-
7	114,3	7,30 (s)	116,4	7,0 (s)
8	154,5	-	145,2	-
9	150,1	-	151,6	-
10	112,3	7,57 (s)	111,9	7,56 (s)
10a	135,5	-	138,4	-
10b	67,3	-	40,0	-
11	28,2	α 2,91 (m)	28,3	2,5 (m)
		β 2,80 (m)		
12	57,7	α 3,75 (m)	56,7	α 3,23 (m)
		β 3,31 (m)		β 2,36 (m)
5'-H₃C-N	43,4	2,62 (s)	43,4	2,14 (s)
8'-H₃CO	56,8	3,94 (s)	55,8	3,98 (s)

* (BASTIDA *et al.*, 1988) ^1H (200 MHz) e ^{13}C (100 MHz) (CDCl_3).

Figura 39 – Espectro de absorção na região do infravermelho de HS-6.

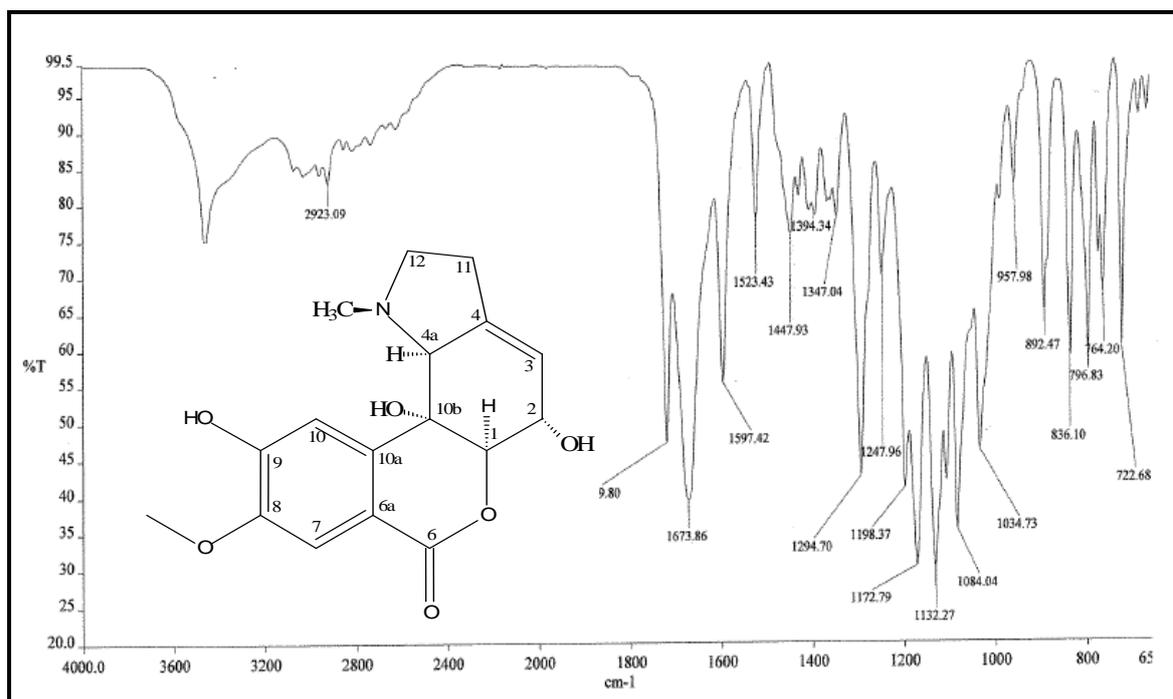


Figura 40 – Espectro de massa de alta resolução de HS-6, obtido por IES no modo positivo.

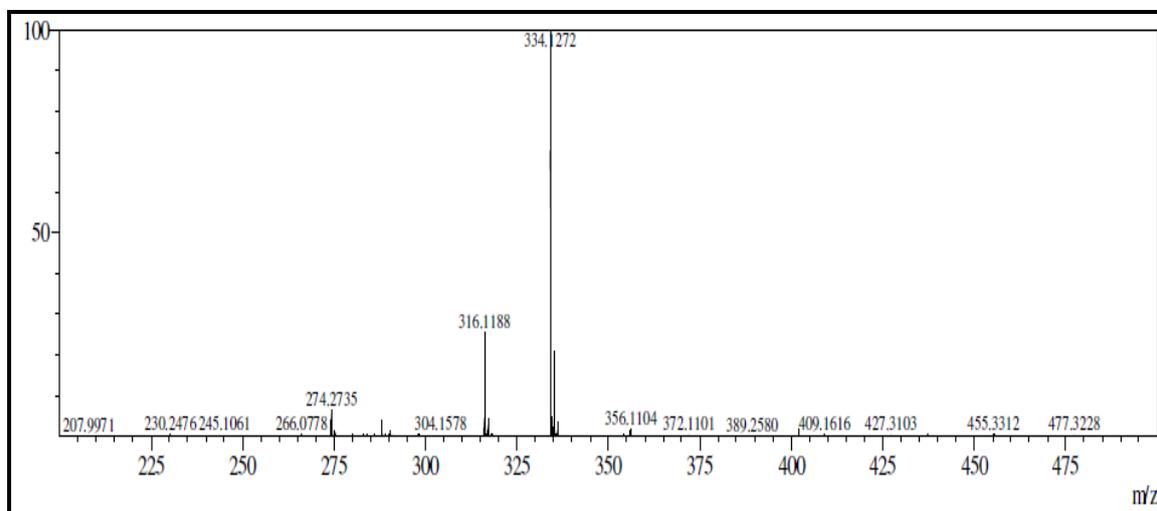


Figura 41 – Espectro de RMN ^1H de HS-6 (CD_3OD , 500 MHz).

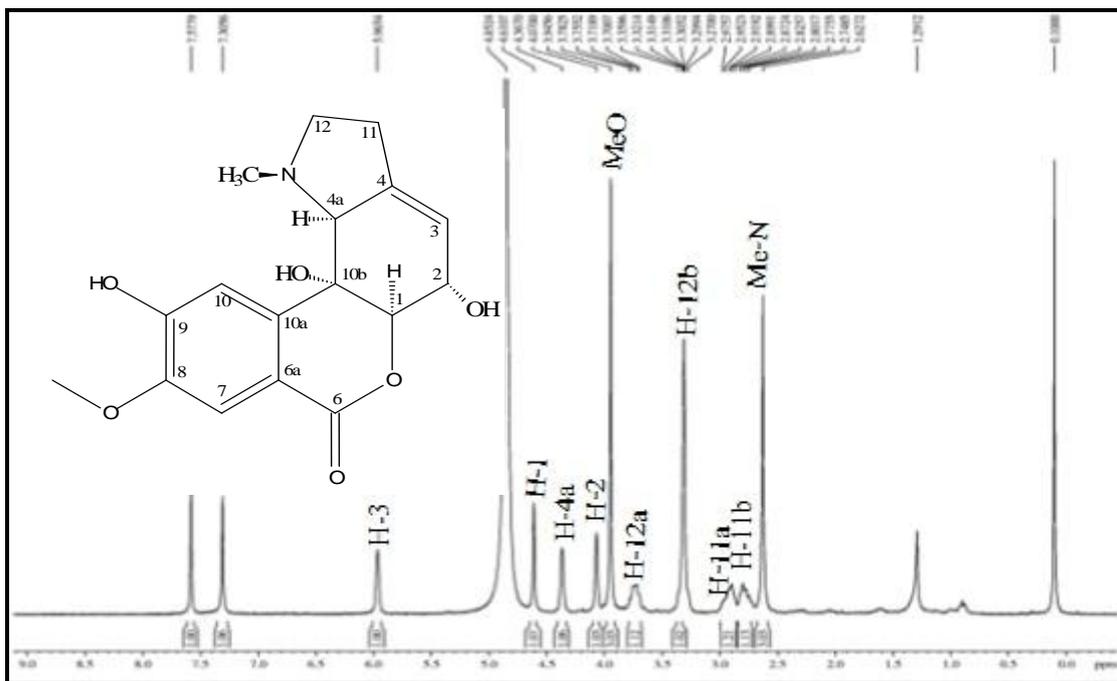


Figura 42 - Espectro de RMN ^1H -expansão (MeOD, 500 MHz) de HS-6.

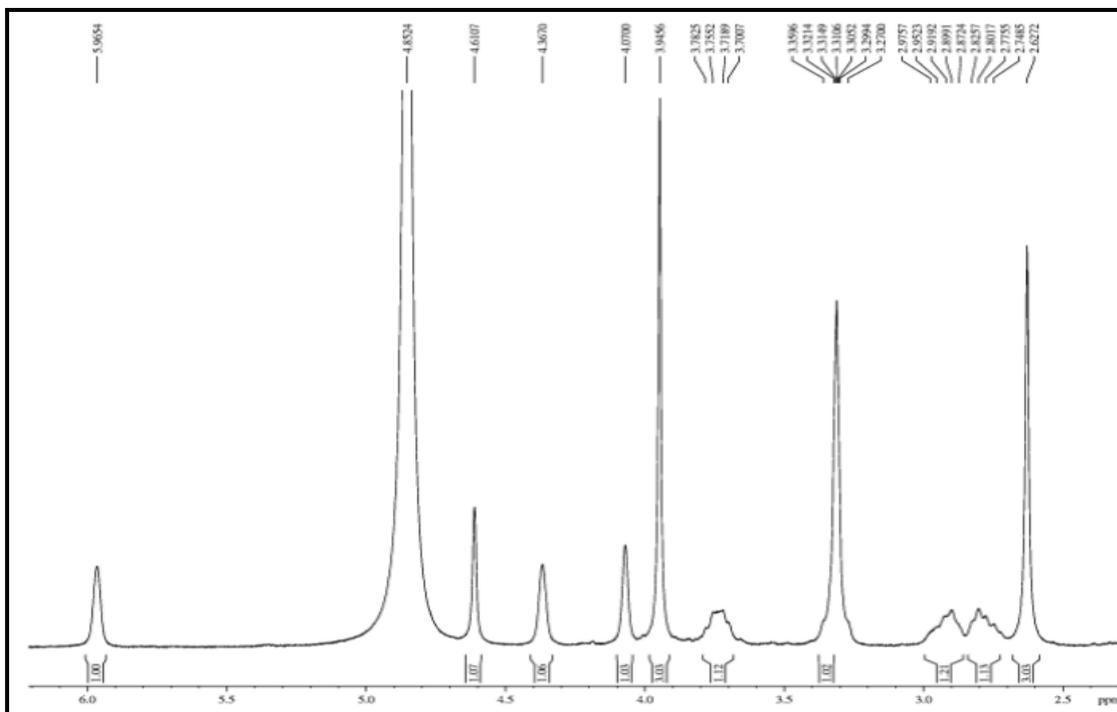


Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz) de HS-6.

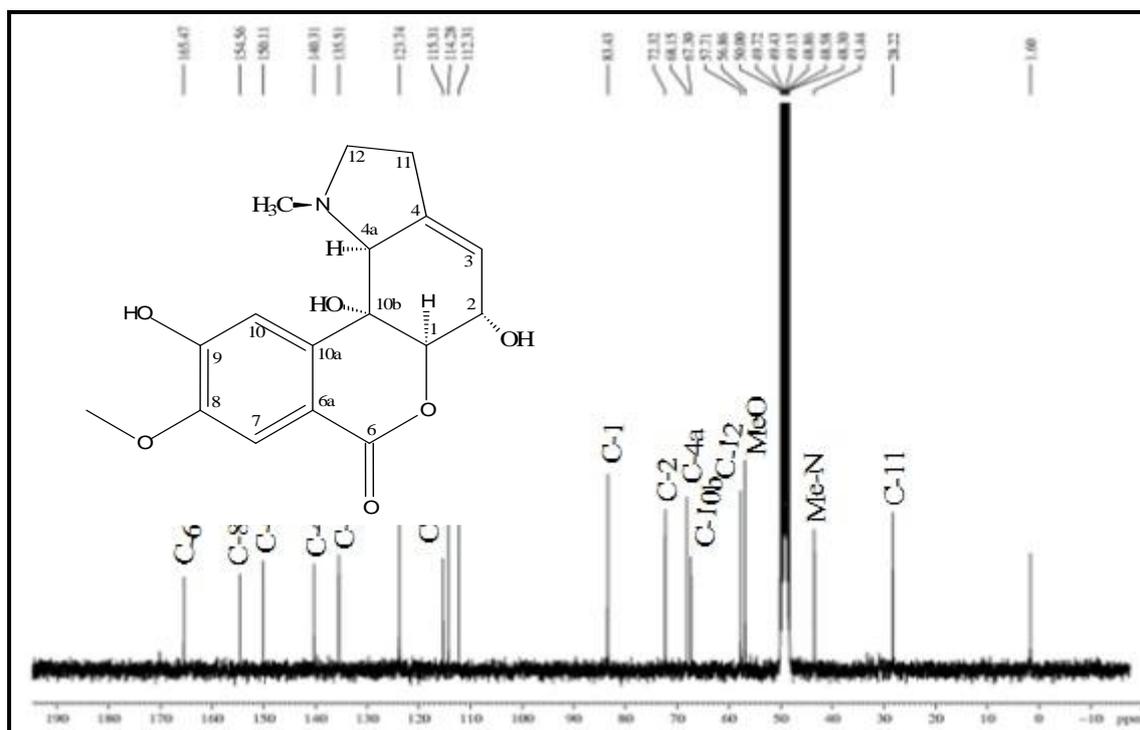


Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (MeOD, 125 MHz) de HS-6.

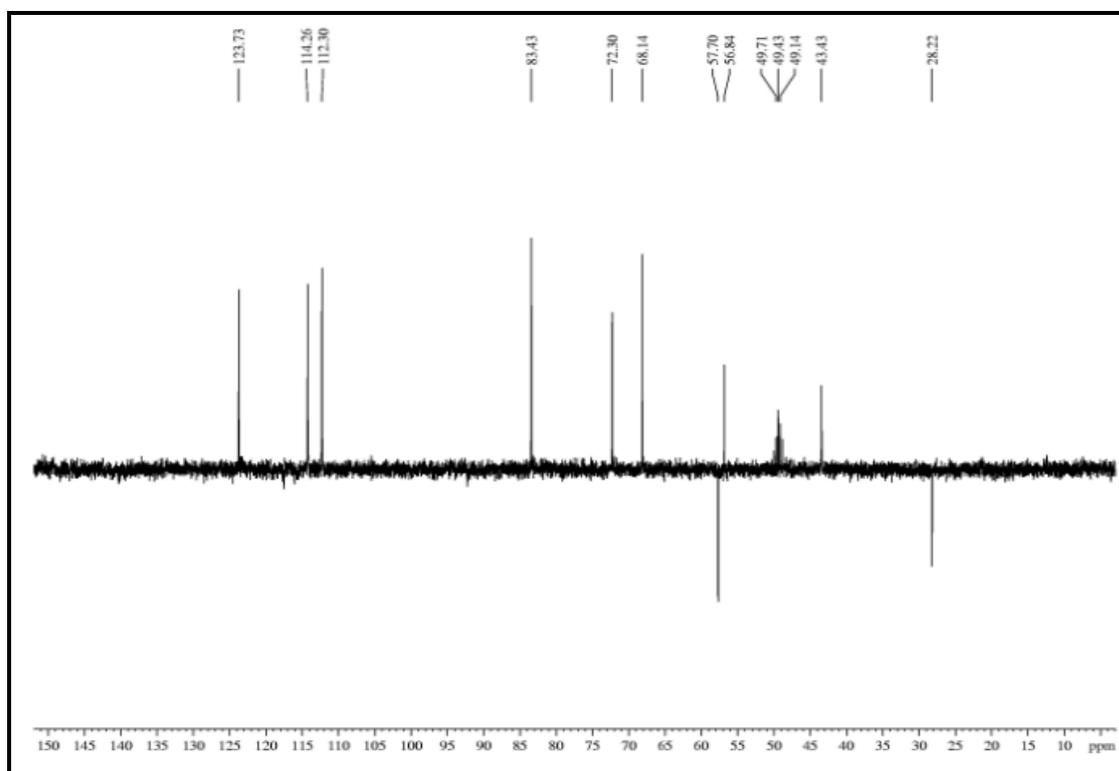


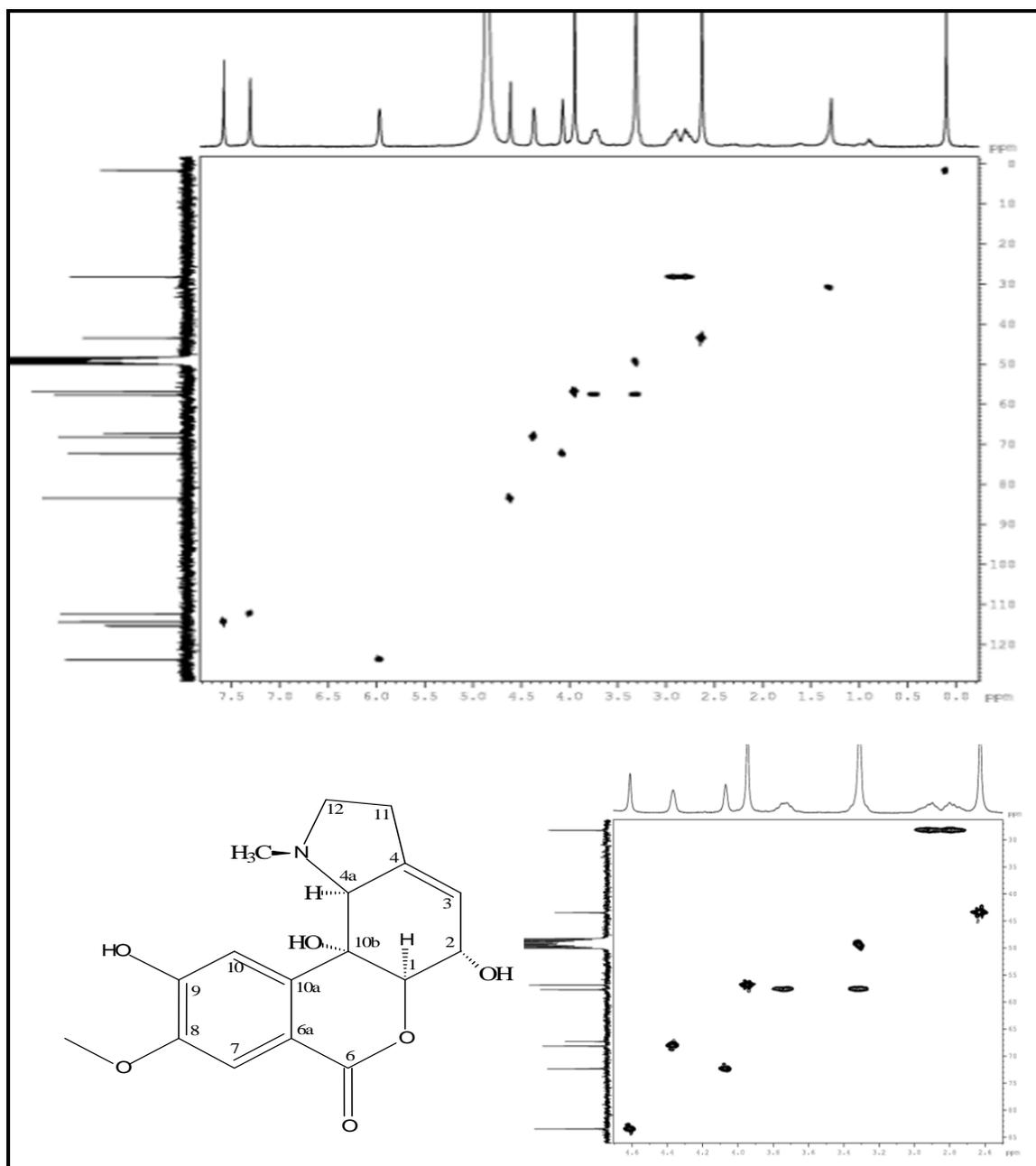
Figura 45 - Espectro de RMN-HSQC (MeOD, 125 x 500 MHz) de **HS-6**.

Figura 46 - Espectro de RMN-COSY (MeOD, 500 x 500 MHz) de **HS-6**.

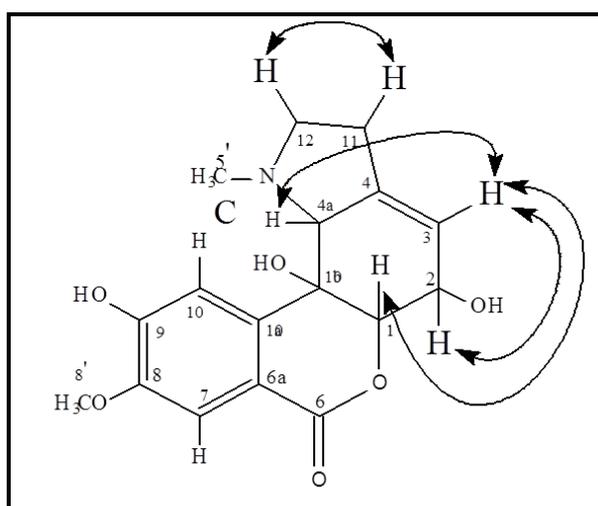
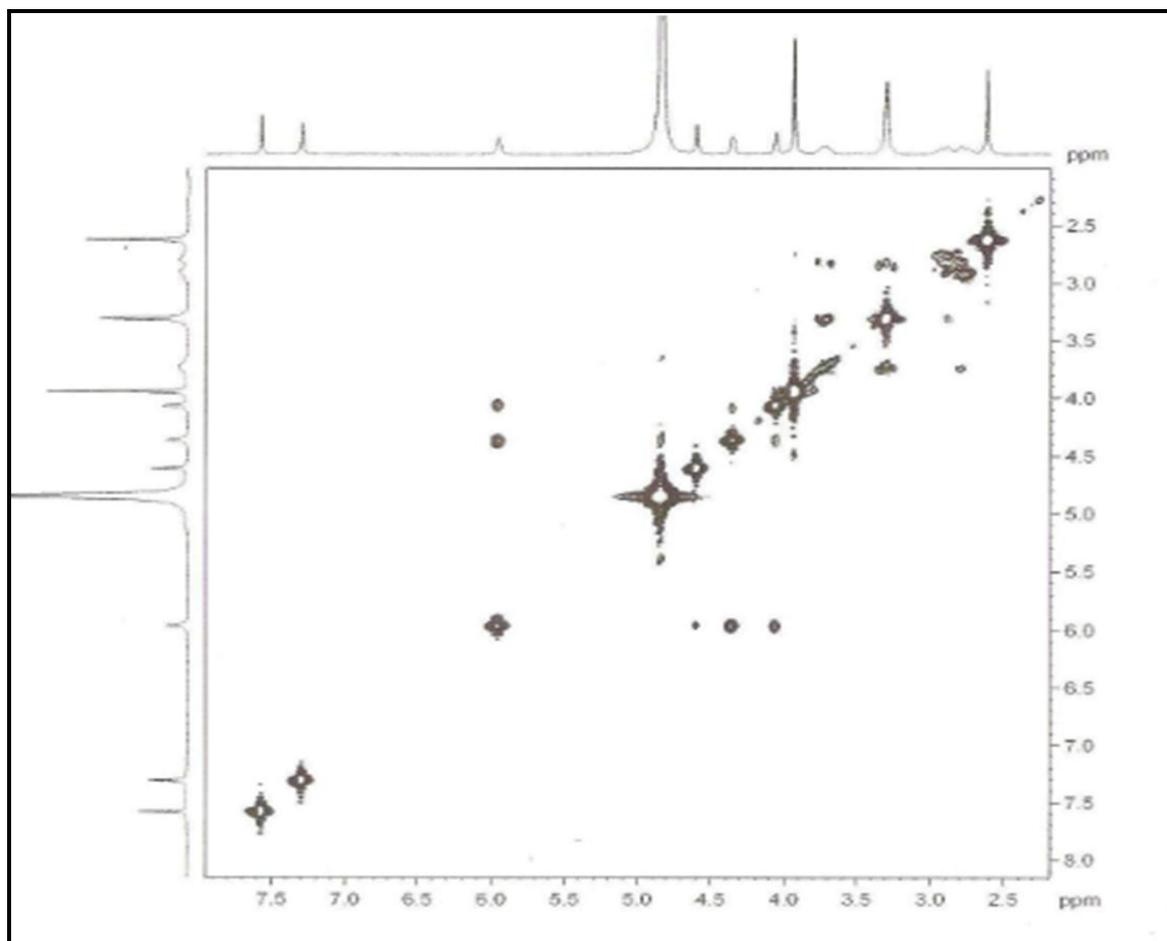


Figura 47 - Espectro de RMN-HMBC (MeOD, 125 x 500 MHz) de HS-6.

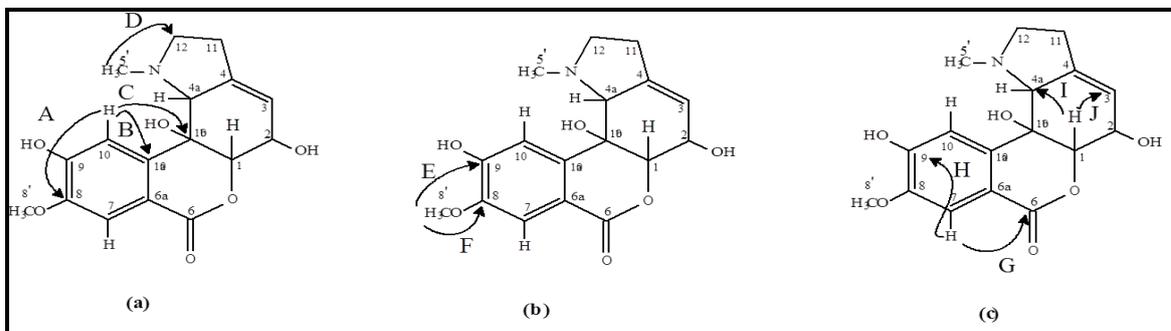
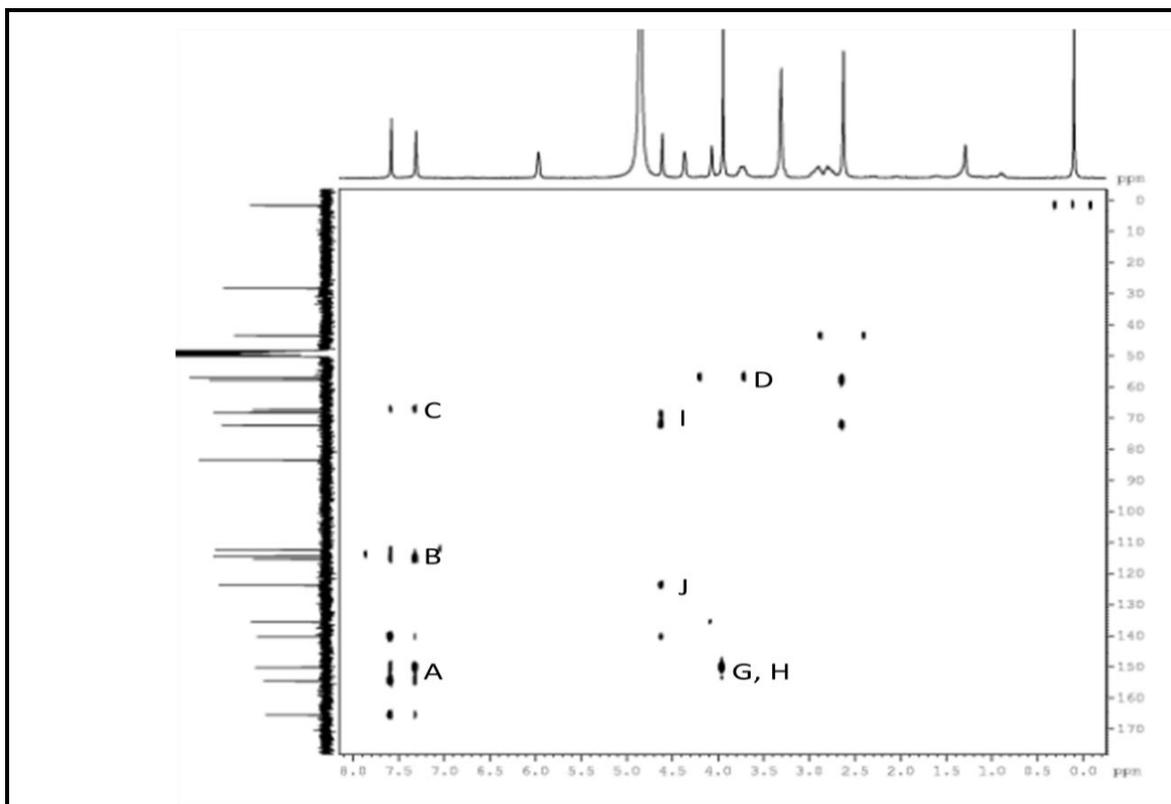
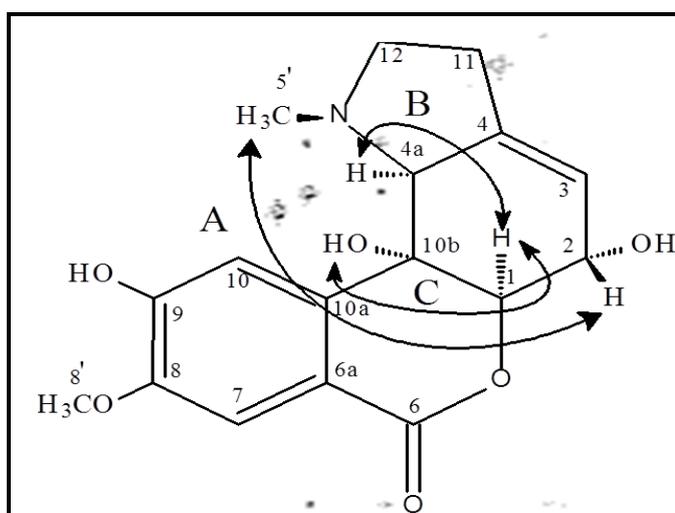
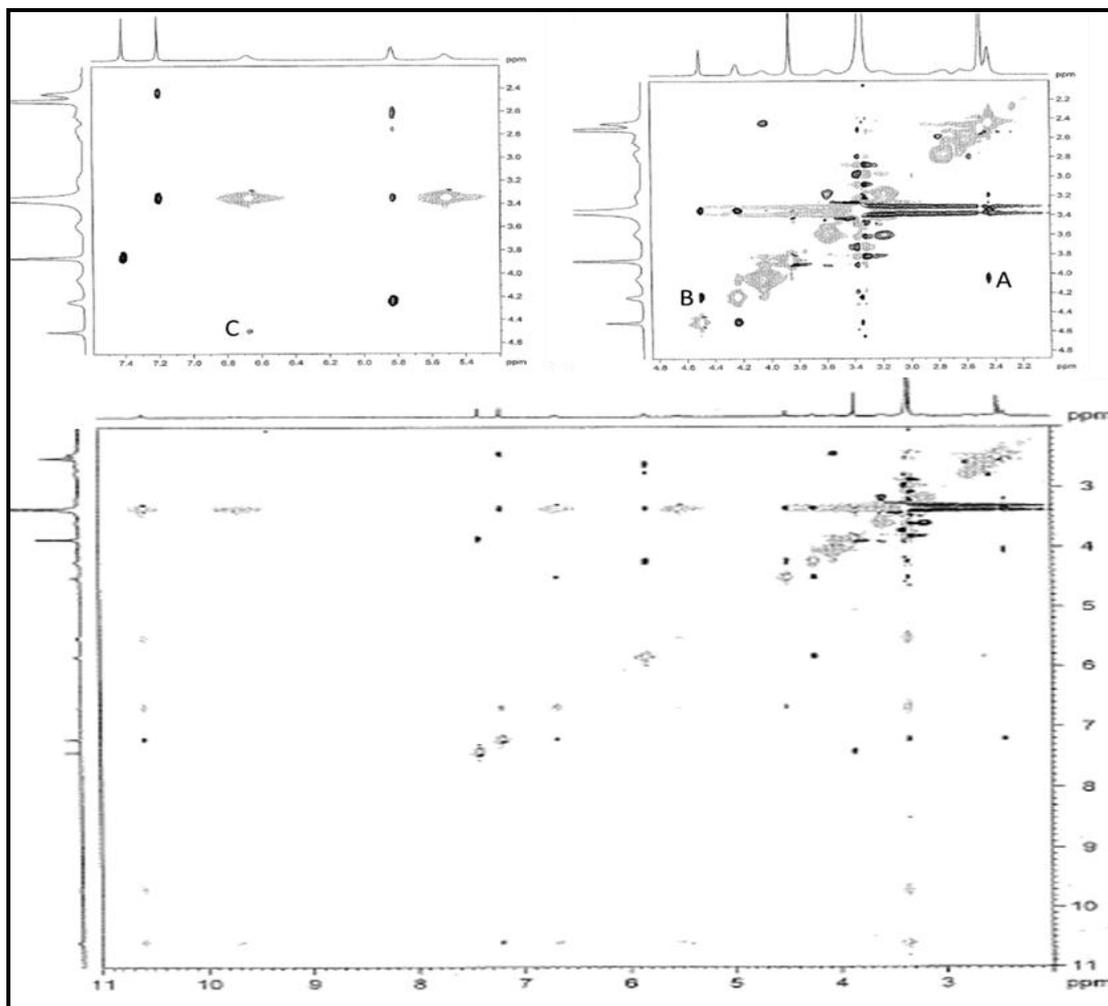


Figura 48 - Espectro de RMN-NOESY (DMSO-d₆, 500 x 500 MHz) de HS-6.



4.1.8 Determinação estrutural de HS-7

HS-7 foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt, rica em alcaloides, usando Sephadex LH-20, cartucho SPE-C18 e purificação em CLAE. Este composto apresentou-se como uma resina amarela, com rotação óptica $[\alpha]_D^{20} = -39,4$ (MeOH, c 0,11).

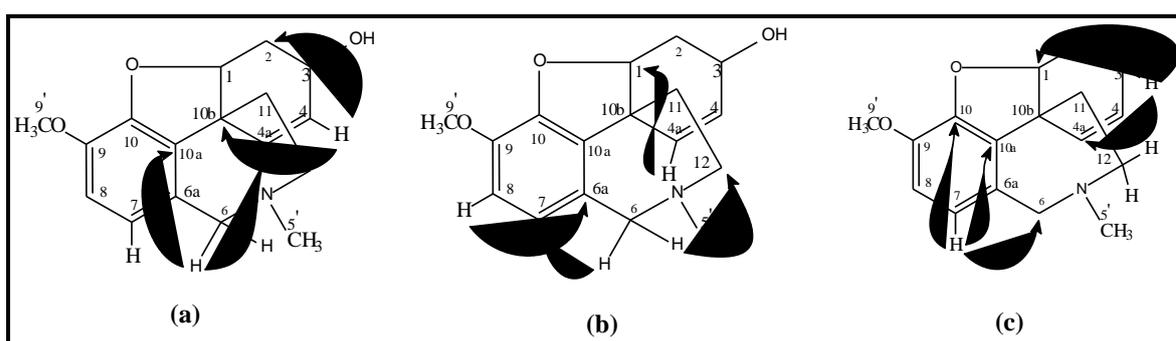
O espectro de massa de alta resolução (Figura 51, p.79), obtido por ionização por *electrospray*, no modo positivo, exibiu o pico do íon correspondente a molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 288,1576, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_3$ (calculada 288,1594), a qual apresenta 8 graus de insaturação.

O espectro de RMN de 1H de **HS-7** (Figura 52 e 53, p. 79 e 80) apresentou sinais em três regiões bem distintas. A primeira foi composta por sinais com deslocamentos e multiplicidades típicas de hidrogênios aromáticos e olefínicos, três dubletos em δ 6,76 ($J = 8,2$, H-8), 6,66 ($J = 8,15$, H-7) e 6,14 ($J = 10,25$, H-4a) e um dublodublete em δ 5,95 ($J = 10,2$ e 4,65, H-4). O segundo bloco foi composto por sinais com deslocamentos típicos de hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados e oxigenados sendo um simpleto em δ 4,56 (H-1) e cinco dubletos em δ 4,18 ($J = 15,00$, H-6 α), 3,76 ($J = 15,00$, H-6 β), 4,16 ($J = 5,35$, H-3), 3,36 ($J = 14,15$, H-12 α), 3,12 ($J = 12,00$, H-12 β) e o terceiro, composto pelos sinais em δ 2,51 (d, H-2 α) 2,14 (H-2 β e H-11 β) e 1,71 ($J = 13,95$, H-11 α) referentes a quatro hidrogênios diastereotópicos, assim como um sinal em 2,47 (s, 3H-5') correspondente a um grupo metila ligado a um átomo de nítrogênio.

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD – Figura 54 e 55, p. 80 e 81) exibiu dezesseis linhas espectrais. A comparação deste com o espectro de RMN DEPT 135° permitiu identificar quatro carbonos não-hidrogenados [δ 147,9 (C-9); 145,9 (C-10); 134,5(C-10a); 128,2 (C-6a); 48,0 (C-10b)], oito carbonos metínicos [δ 128,8 (C-4a); 128,3 (C-4); 123,4 (C-7); 113,4 (C-8); 89,1 (C-1); 61,4 (C-3)]; e quatro carbonos metilênicos [δ 62,6 (C-6); 56,8 (C-12); 35,5 (C-11); 31,6 (C-2)]. A análise destes dados mostraram semelhantes aqueles da galantamina, alcaloides do tipo isoquinolínico já descrito na literatura. (JOHN WILEY&SONS, 2006).

Esta hipótese estrutural foi confirmada através da análise dos espectros de RMN bidimensionais. O espectro COSY de **HS-7** (Figura 57, p. 83), mostrou os acoplamentos geminais entre os hidrogênios δ 4,18 (H-6 α) com 3,76 (H-6 α e H-6 β); 3,36 (H-12 α) com 3,12 (H-12 α e H-12 β); 1,71 com 2,08 (H-11 α e H-11 β); 2,51 com 2,14 (H-2 α e H-2 β). O espectro exibiu ainda acoplamentos escalares entre os hidrogênios em δ 2,08 (H-11 α) e 3,36 (H-12 α); 1,71 (H-11 β) e 3,12 (H-12 β), assim como, do hidrogênio em δ 4,56 (H-1) com os hidrogênios diastereotópicos em δ 2,14 (H-2 α) e 2,51 (H-2 β). Adicionalmente foram observados acoplamentos do hidrogênio em δ 4,16 (H-3) com o hidrogênio em δ 2,51 (H-2 α), 2,14 (H-2 β) e 5,95 (H-4), e deste último com o hidrogênio em δ 6,14 (H-4a). Estes acoplamentos, em conjunto com as correlações a uma ligação exibidas pelo espectro HSQC (Figura 52) foram importantes para atribuições inequívocas dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios e carbonos (Tabela 10). O espectro HMBC de **HS-7** (Figura 54) mostrou correlações entre o hidrogênio em δ 3,76 (H-6 β) com os carbonos em δ 56,8 (C-12); 123,4 (C-7); 128,8 (C-4a) e 134,5 (C-10a); correlações entre o hidrogênio em δ 4,16 (H-3) com os carbonos em δ 89,1 (C-1) e 128,8 (C-4a). Outras importantes correlações foram observadas para o hidrogênio em δ 6,76 (H-7) com os carbonos em δ 62,6 (C-6); 134,5 (C-10a) e 145,9 (C-10), do hidrogênio em δ 5,95 (H-4) com os carbonos em δ 31,6 (C-2) e 48 (C-10b), bem como do hidrogênio em δ 6,14 (H-4a) com o carbono em δ 89,1 (C-1).

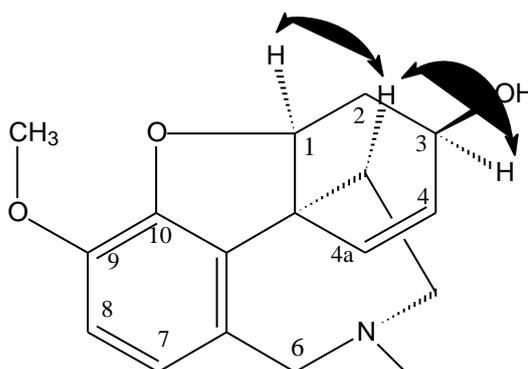
Figura 49 - Importantes correlações a longa distancia ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC de **HS-7**.



As interações espaciais observadas no espectro NOESY (Figura 59, p. 85) entre o hidrogênio em δ 4,56 (H-1) com 2,08 (H-11 α); 4,16 (H-3) com 2,08 (H-11 α) corroboraram a configuração relativa inferida para os centros estereogênicos existentes na molécula. Com base nas interações espaciais observadas e, aliado à comparação com dados de RMN descritos na literatura para a galantamina (JOHN WILEY & SONS, 2006), determinou-se as posições

α para os hidrogênios H-1 e H-3, assim como para os dois grupos metilênicos (C-11 e C-12) a qual fazem parte do *N*-heterocíclico (Figura 50).

Figura 50 - Estrutura tridimensional de **HS-7**, destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY.



A estrutura da substância **HS-7**, foi estabelecida após análise dos dados espectrométricos e comparação como dados de RMN de ^1H e ^{13}C descritos na literatura (Tabela 10, p. 78) (JOHN WILEY&SONS, 2006), como sendo o alcaloide galantamina, o qual foi previamente isolado de *Narcissus spp.*, *Leucojumaestivum* e *Galanthusworonowii* (RUSSO *et al.*; 2013), sendo de caráter inédito na espécie estudada.

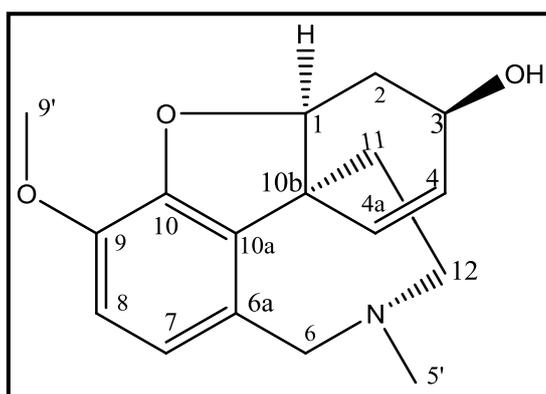


Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **HS-7** (500 e 125 MHz, CD_3OD), e acoplamentos observados no espectro HMBC.

C	HSQC		Lit*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	89,1	4,56 (s)	88,3	4,59 (m)
2	31,6	α 2,51 (m) β 2,14 (m)	33,8	α 2,66 dddd ($J = 15,7; 3,5; 1,7; 1,3$) β 1,99ddd ($J = 15,7; 5,0; 2,5$)
3	61,4	4,16 (m)	61,7	4,12 (m)
4	128,3	5,95 (dd, $J = 10,25; J = 4,45$)	127,4	5,98 ddd ($J = 10,4; 5,0 1,3$)
4a	128,8	6,14 (d, $J = 10,25$)	126,6	6,05 dd ($J = 10,4; J = 1,6$)
6	62,6	α 4,18 (d, $J = 14,9$) β 3,76 (d, $J = 14,9$)	60,3	α 4,07 d ($J = 15,0$) β 3,66 dd ($J = 15,0; 1,2$)
6a	128,2	-	129,2	-
7	123,4	6,66 (d, $J = 8,2$)	121,7	6,64 d ($J = 8,2$)
8	113,4	6,76 (d, $J = 8,2$)	111,0	6,60 d ($J = 8,2$)
9	145,9	-	143,8	-
10	147,9	-	145,6	-
10a	134,5	-	132,8	-
10b	48,0	-	47,9	-
11	35,5	α 2,08 (d, $J = 13,9; J = 2,75$) β 1,71 (dd, $J = 14,12; J = 2,65$)	33,6	2,06 ddd ($J = 13,7; 12,8; 3,2$) 1,55 ddd ($J = 13,7; 4,0; 1,9$)
12	56,8	α 3,36 (d, $J = 13,15$) β 3,12 (d, $J = 14,12$)	53,5	3,24 ddd ($J = 14,4; 12,8; 1,9$) 3,03 ddd ($J = 14,4; 4,0; 3,2$)
H ₃ C-N	43,1	2,47 (s)	41,8	2,38 (s)
H ₃ C-O	55,3	3,79 (s)	55,6	3,81 (s)

**Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 JohnWiley& Sons (2006)

Figura 51 – Espectro de massa de alta resolução de HS-7, obtido por IES no modo positivo.

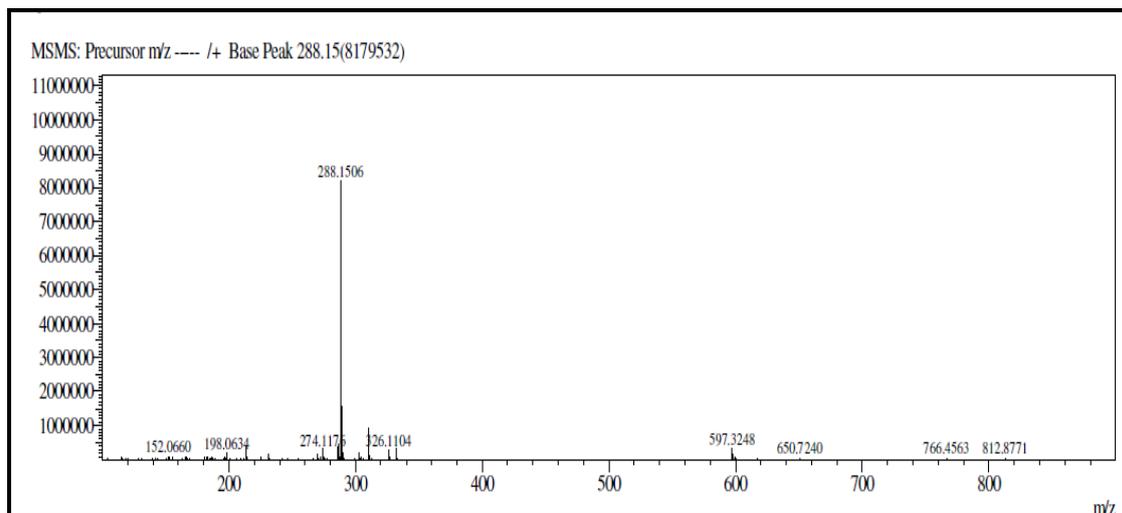


Figura 52 – Espectro de RMN ¹H de HS-7 (CD₃OD, 500 MHz).

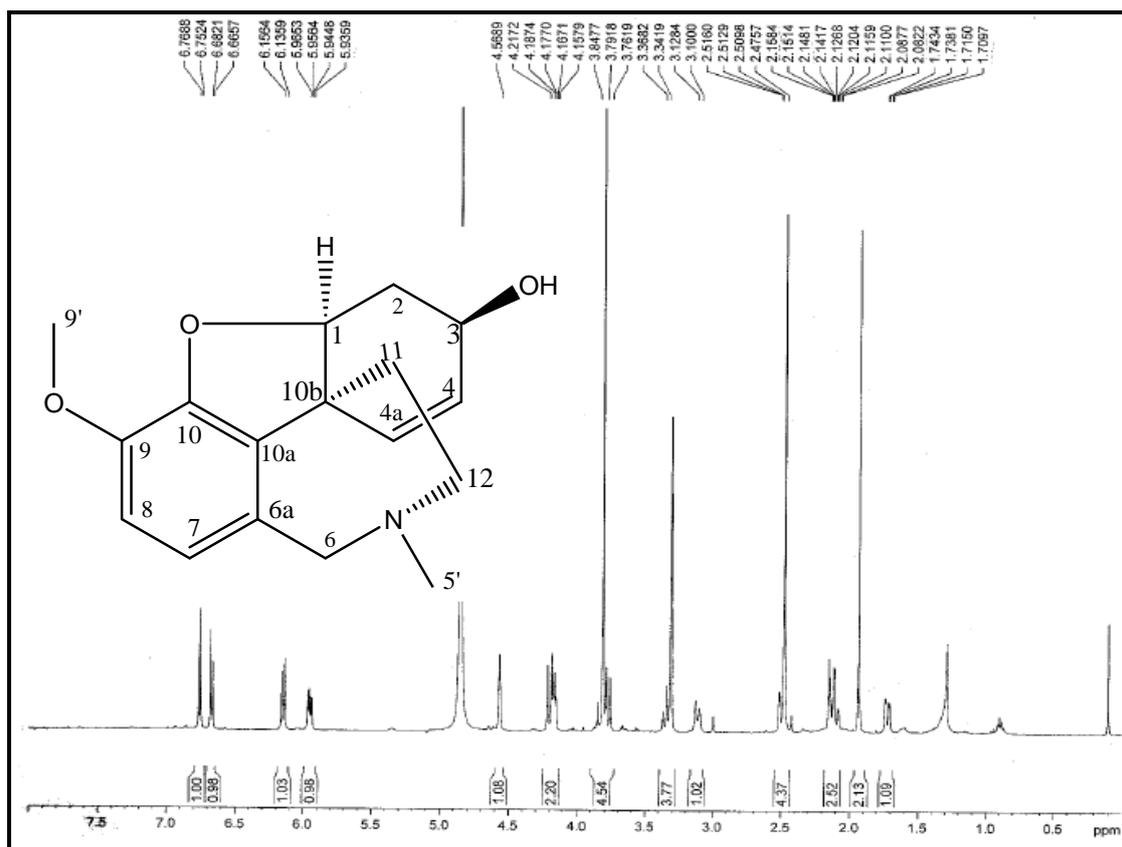


Figura 53 - Espectro de RMN ¹H-expansão (MeOD,500 MHz) de HS-7.

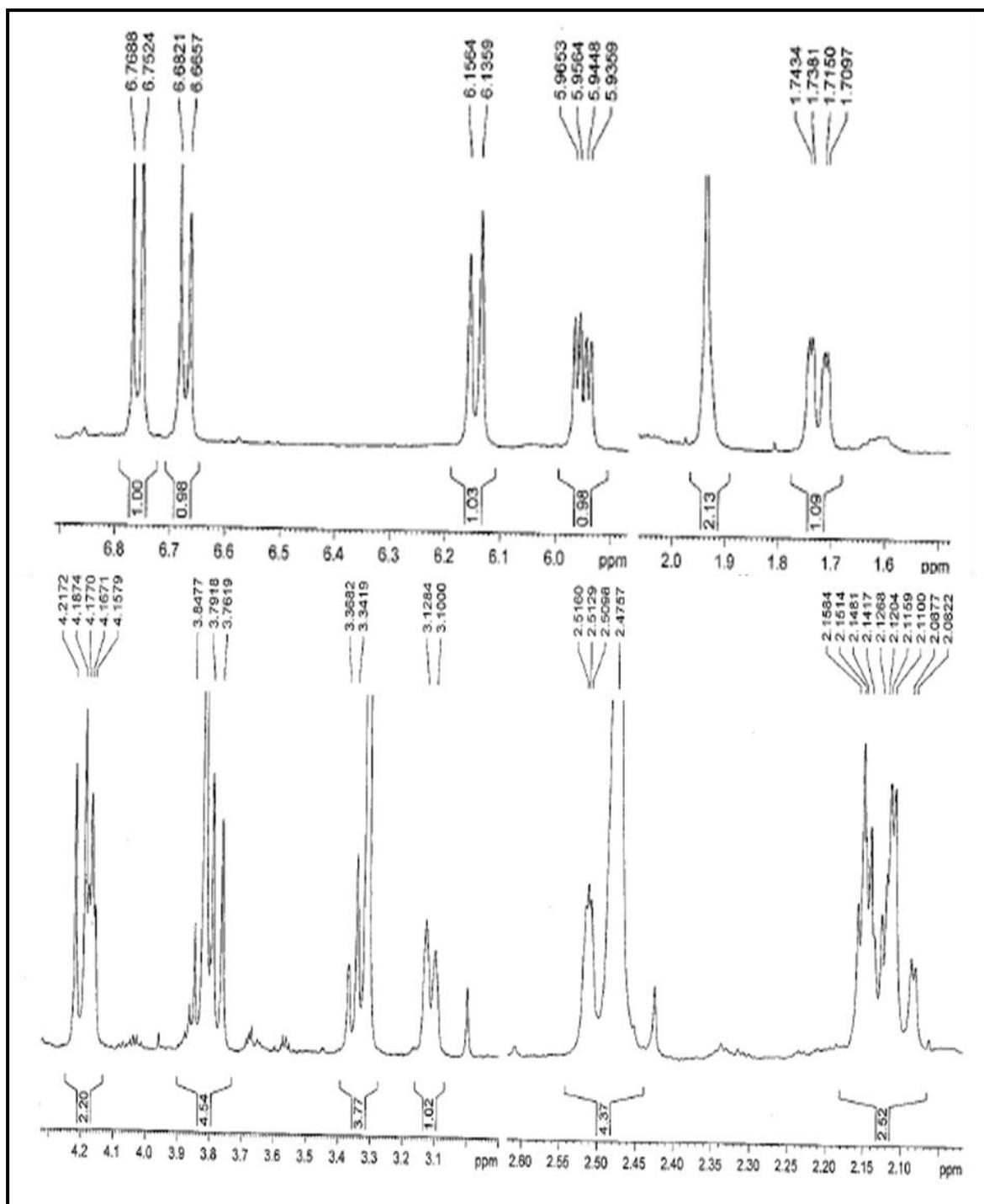


Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C -CPD (MeOD, 125 MHz) de HS-7.

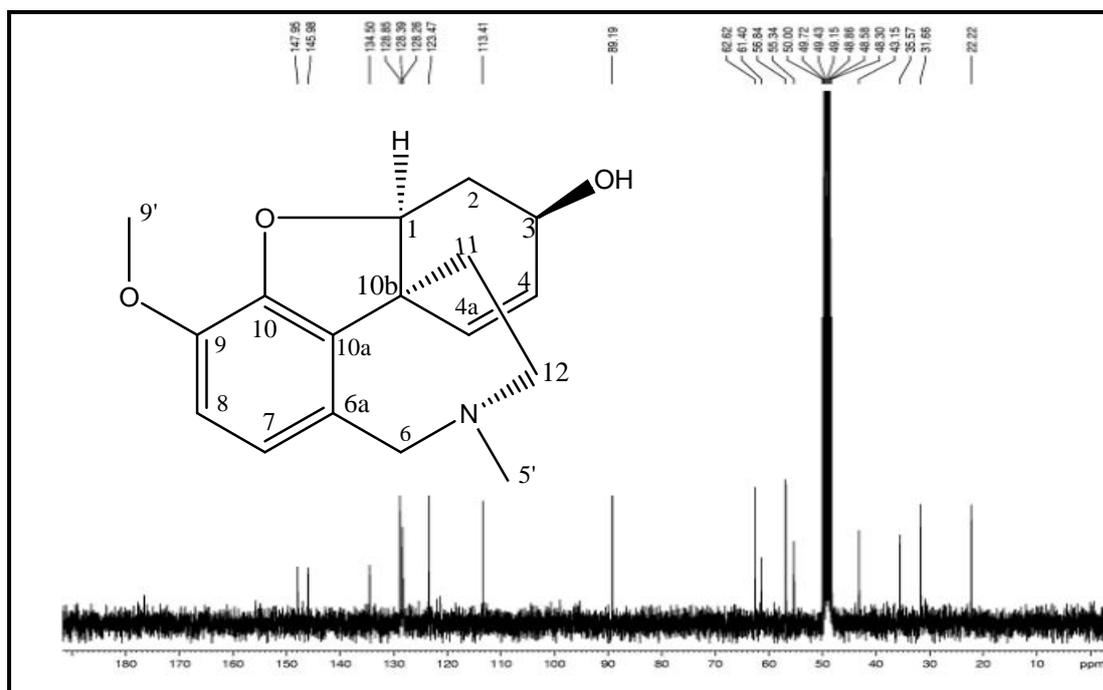


Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (MeOD, 125 MHz) de HS-7.

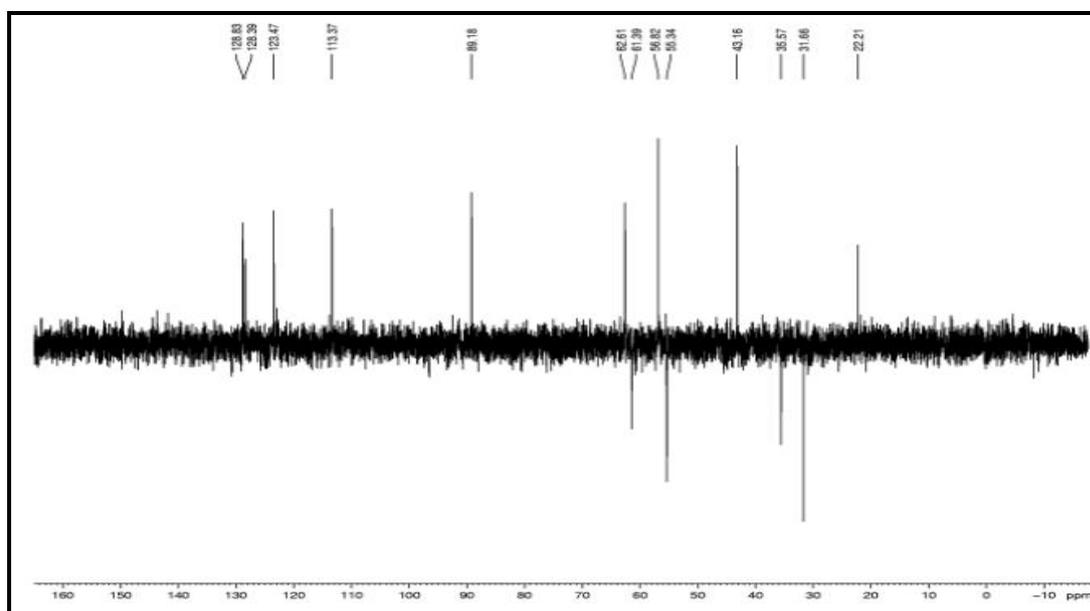


Figura 56 -Espectro de RMN-HSQC (MeOD, 125 x 500 MHz) de HS-7.

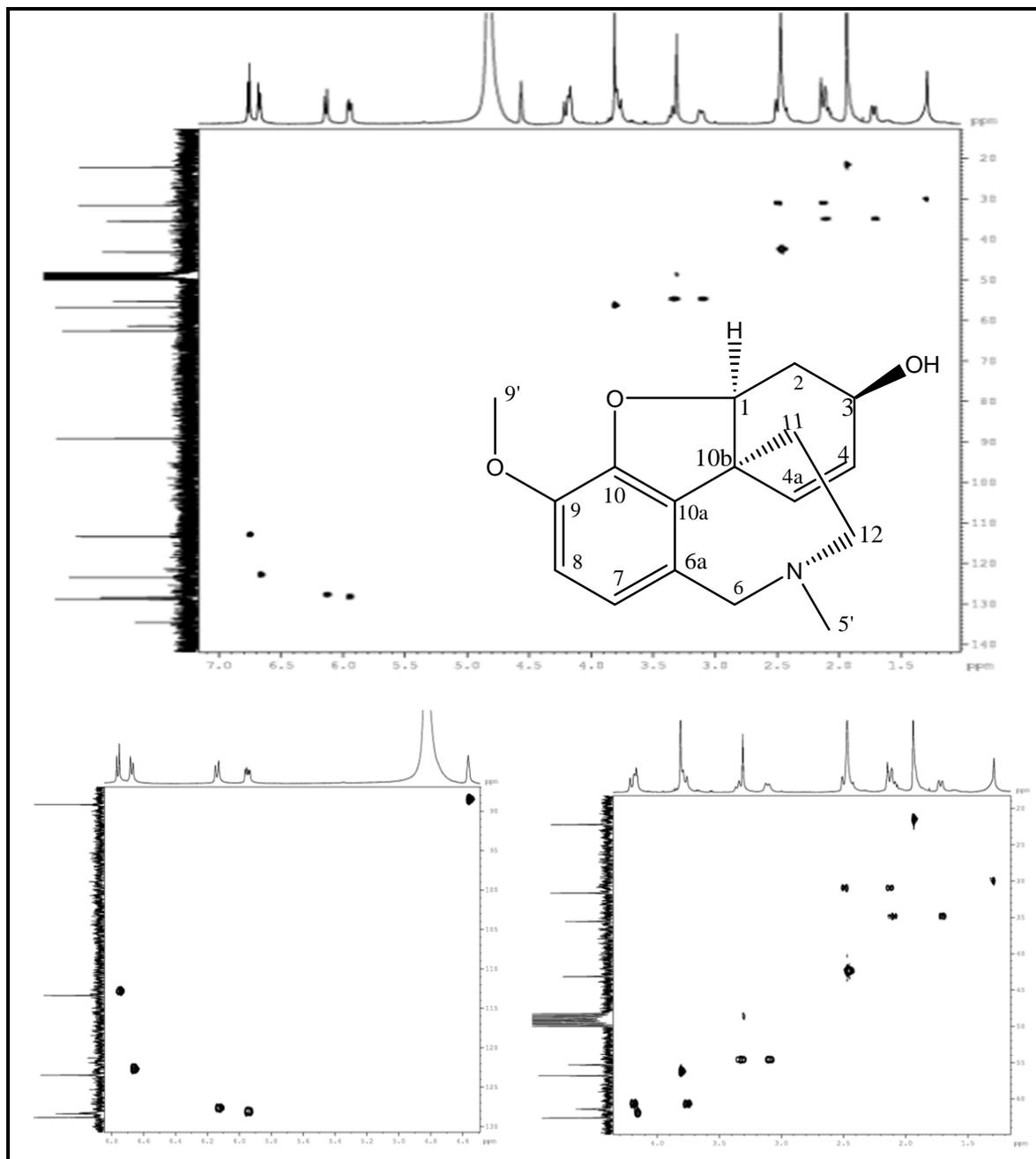


Figura 57 - Espectro de RMN 2D¹H, ¹H-COSY de **HS-7** (CD₃OD, 500 x 500 MHz)

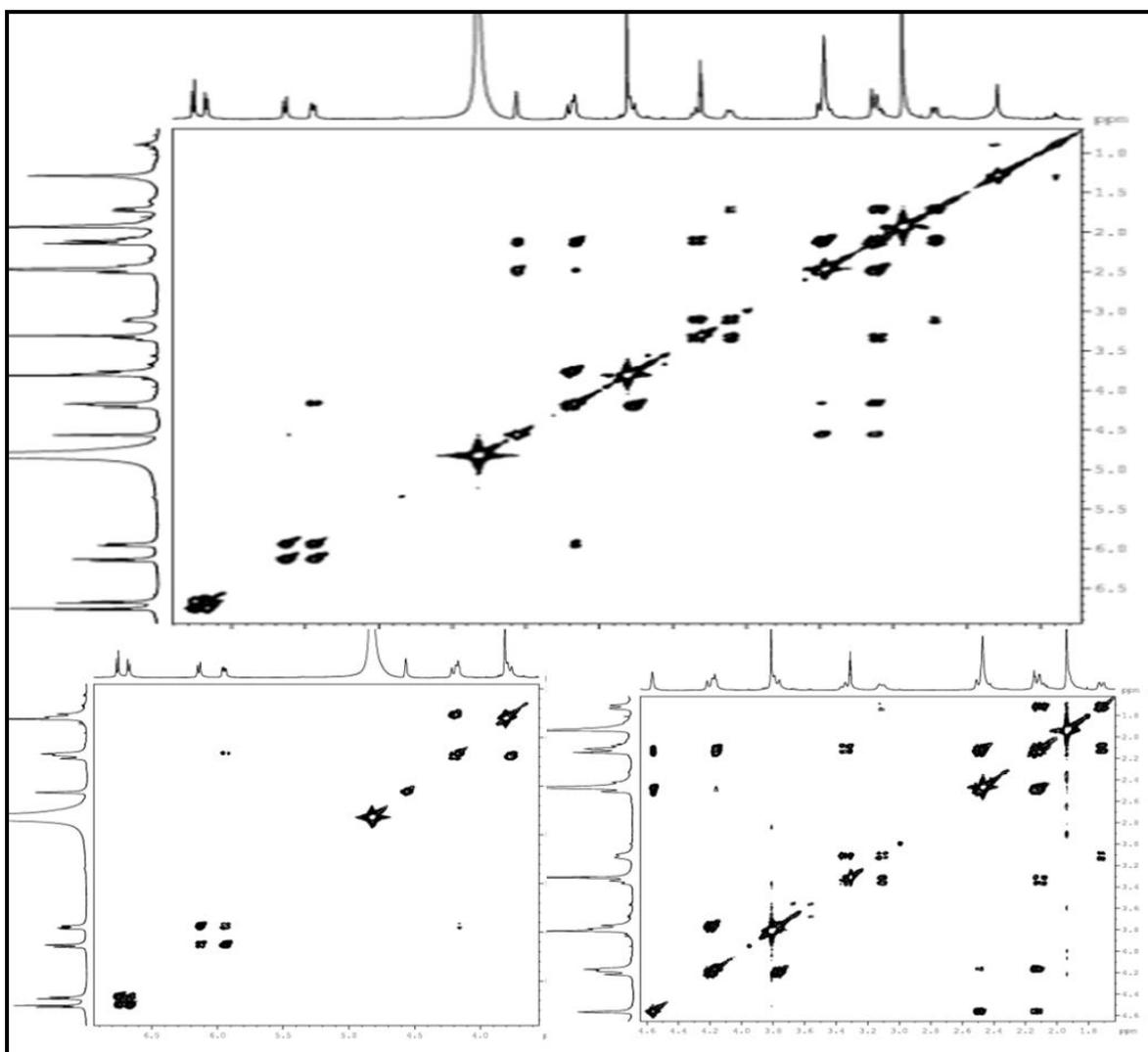


Figura 58 - Espectro de RMN-HMBC (MeOD, 125 x 500 MHz) de HS-7.

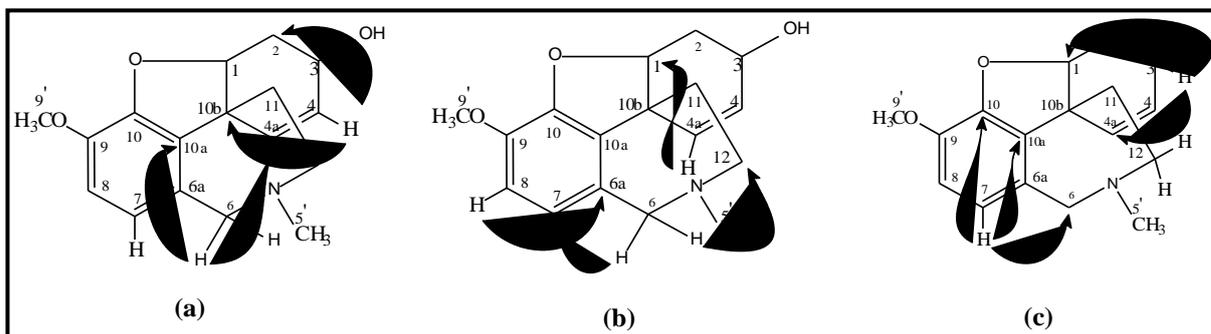
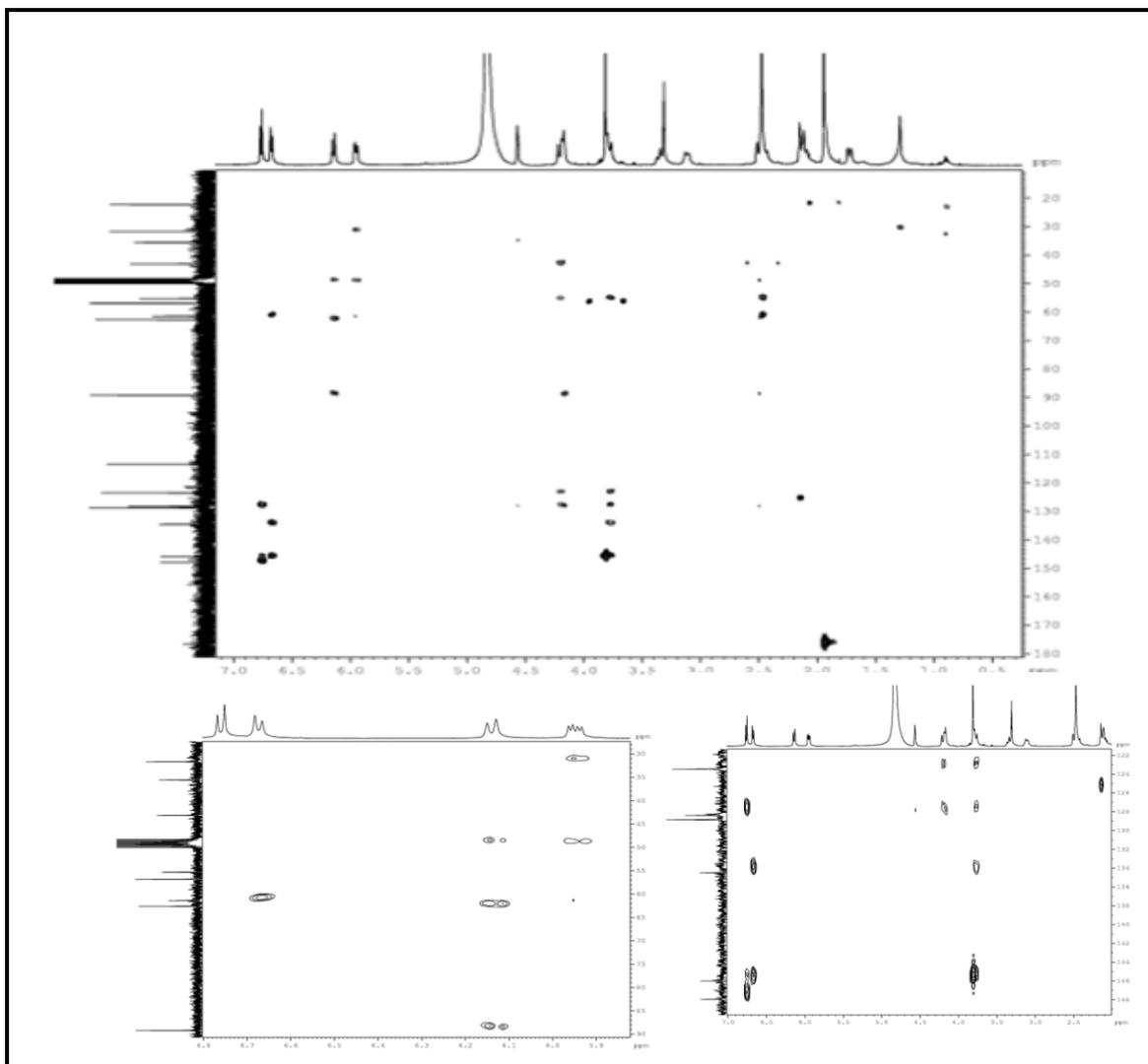
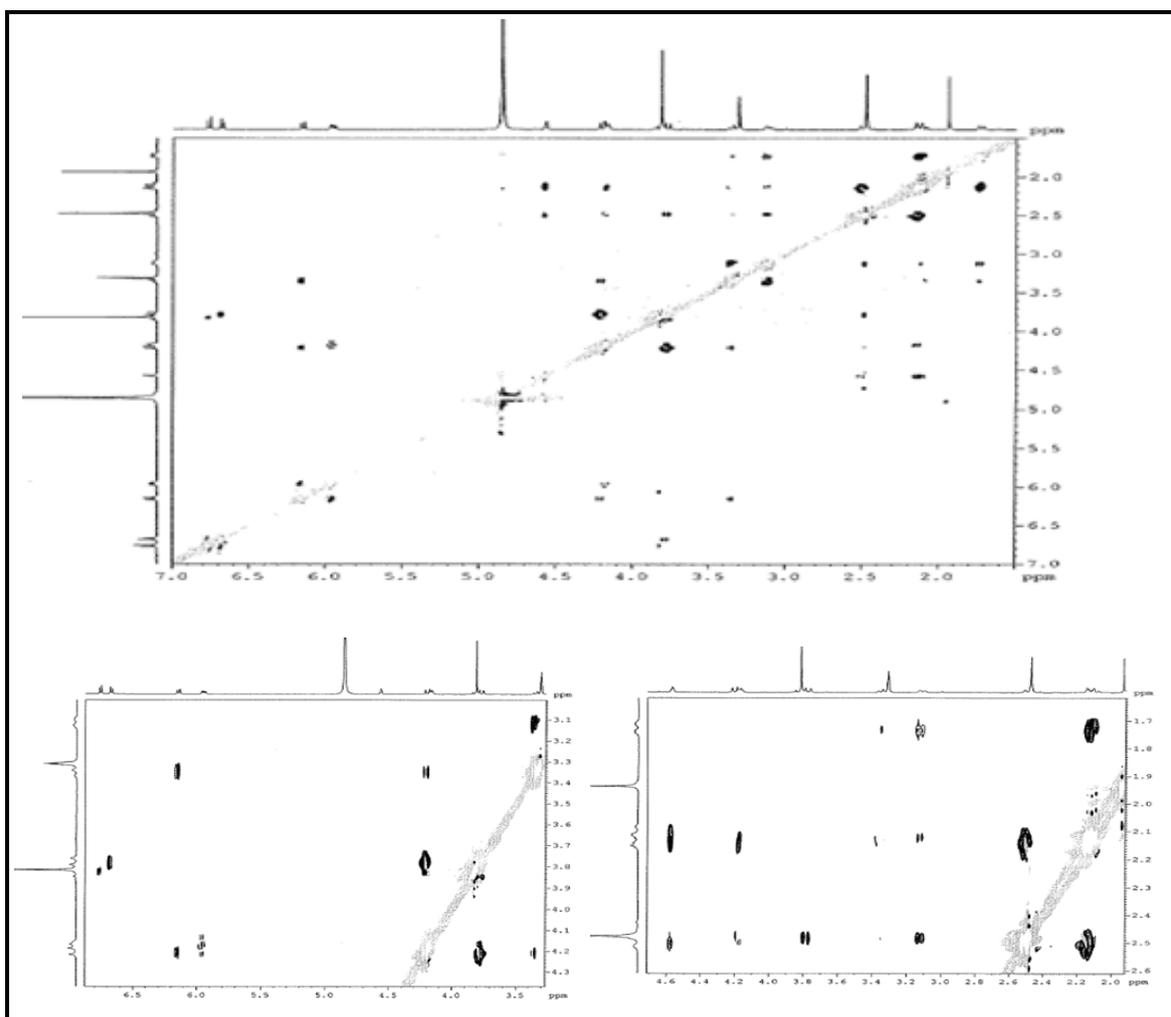


Figura 59 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de **HS-7** (CD_3OD , 500 x 500 MHz)

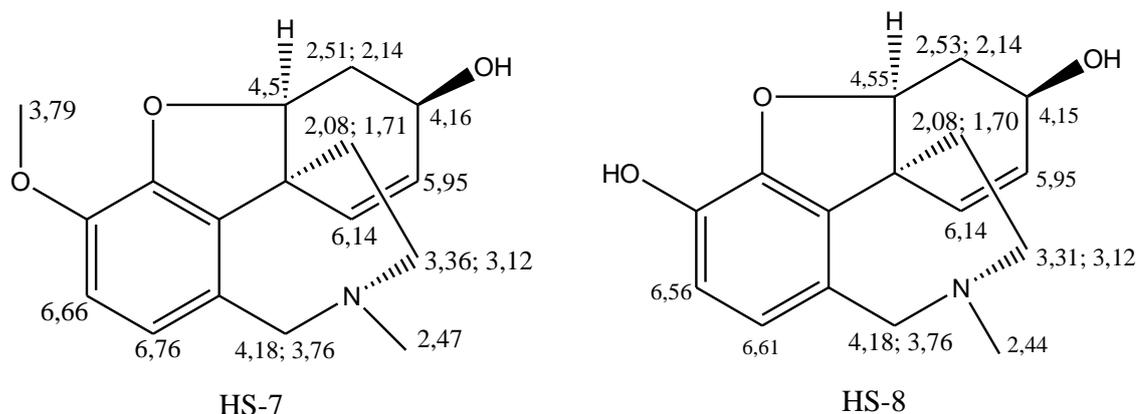


4.1.9 Determinação Estrutural de HS-8

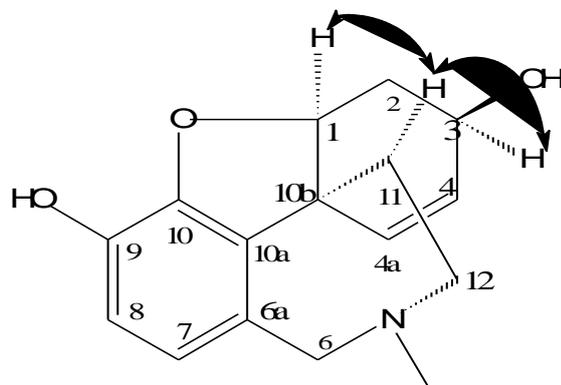
Sucessivas cromatografias, incluindo SPE-C18 da fração solúvel em MeOH forneceu **HS-8** (4,5 mg), que apresentou-se na forma de uma resina amarela, com $[\alpha]_D^{20} = -0,084$ (c 0,16, MeOH).

Os espectros de RMN de ^1H de **HS-8** (Figura 63, p. 89) mostrou-se semelhante ao composto **HS-7**. A análise comparativa dos deslocamentos químicos de ^1H , (Tabela 11, p.88) aponta que os dois compostos diferem pela ausência de um simpleto em δ 3,79, atribuído aos hidrogênios de uma metoxila. Esta informação aliada ao espectro de massa de alta resolução (Figura 62, p. 89), obtido por ionização por *electrospray* (IES), no modo positivo, o qual exibiu o íon correspondente a molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 274,1439, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ (calculada 274,1444) revelaram que o composto em questão tratava-se da sanguinina (KOBAYASHI *et al.*, 1991).

Figura 60 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H dos compostos **HS-7** e **HS-8** (CD_3OD , 500 MHz).



A estereoquímica relativa do composto foi estabelecida a partir da análise do espectro de RMN $2\text{D}^1\text{H}$, ^1H -NOESY de **HS-8** (Figura 64, p. 90) o qual exibiu interações espaciais do hidrogênio em δ 2,08 (H-11 α) com 4,55 (H-1) e 2,14 (H-3). Com base nestes dados e aliado à comparação com informações da literatura (KOBAYASHI *et al.*, 1991) determinou-se as posições α para os hidrogênios H-1 e H-3.

Figura 61 - Estrutura tridimensional de **HS-8**, destacando os acoplamentos dipolares vistos no espectro NOESY.

Este metabólito secundário trata-se de um alcaloide da classe isoquinolínica, conhecido como sanguinina, que foi previamente isolado dos bulbos de *Lycoris sanguinea* (ABDALLAH 1994), no entanto, é inédito no gênero.

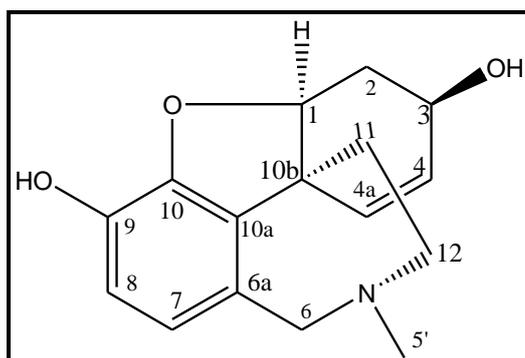


Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **HS-8** (300 e 75 MHz, CD_3OD).

C	δ_{C} ***	HSQC	δ_{C}	HSQC Lit*
		δ_{H}		δ_{H}
1	88,0	4,55 (sl)	88,9	4,56 (m)
2	30,0	α 2,53 (m) β 2,14 (dd, $J = 13$; $J = 5,4$ Hz)	31,5	α 2,03 (m) β 2,59 (m)
3	61,0	4,15 (sl)	61,7	4,18 (m)
4	127,0	5,95 (dd, $J = 16,75$; $J = 8,1$ Hz)	128,3	5,99 (d, $J = 10,5$)
4a	127,0	6,14 (d, $J = 17,1$ Hz)	128,7	6,08 (d, $J = 10,5$)
6	60,0	α 4,18 (d, $J = 14,5$ Hz) β 3,76 (d, $J = 14,5$ Hz)	61,6	α 3,92 (d, $J = 15,0$) β 4,04 (d, $J = 15,0$)
6a	126,0	-	127,9	
7	123,0	6,61 (d, $J = 13,5$ Hz)	123,2	6,43 (d, $J = 8,0$)
8	115,0	6,56 (d, $J = 13,5$ Hz)	116,8	6,72 (d, $J = 8,0$)
9	147,0	-	146,6	
10	142,0	-	142,3	
10a	133,0	-	134,3	
10b	48,0	-	48,1	
11	34,0	α 2,08 (dd, $J = 13,6$; $J = 5,4$ Hz) β 1,70 (dd, $J = 14,0$; $J = 3,2$ Hz)	35,6	α 1,77 (m) β 1,83 (m)
12	54,0	α 3,31 * β 3,12 (d, $J = 14,0$ Hz)	55,3	α 3,22 (m) β 3,35 (m)
H₃C-N 5'	43,0	2,44 (s)	43,2	-

*Sinal sobreposto pelo sinal do solvente

** Dados de RMN ^1H , ^{13}C CD_3OD 200 MHz (KOBAYASHI *et al.*, 1991)

***Dados de carbono foram obtidos pela projeção do espectro de HSQC e HMBC (Figura 65 e 66, p. 91 e 92).

Figura 62 - Espectro de massa de alta resolução de **HS-8**, obtido por ESI, no modo positivo.

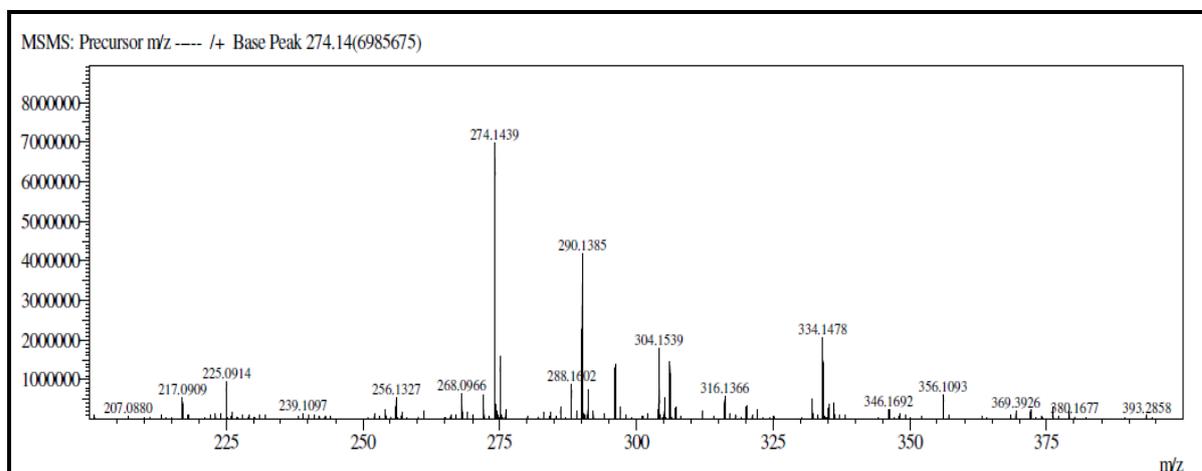


Figura 63 - Espectro de RMN ^1H de **HS-8** (CD_3OD , 500 MHz).

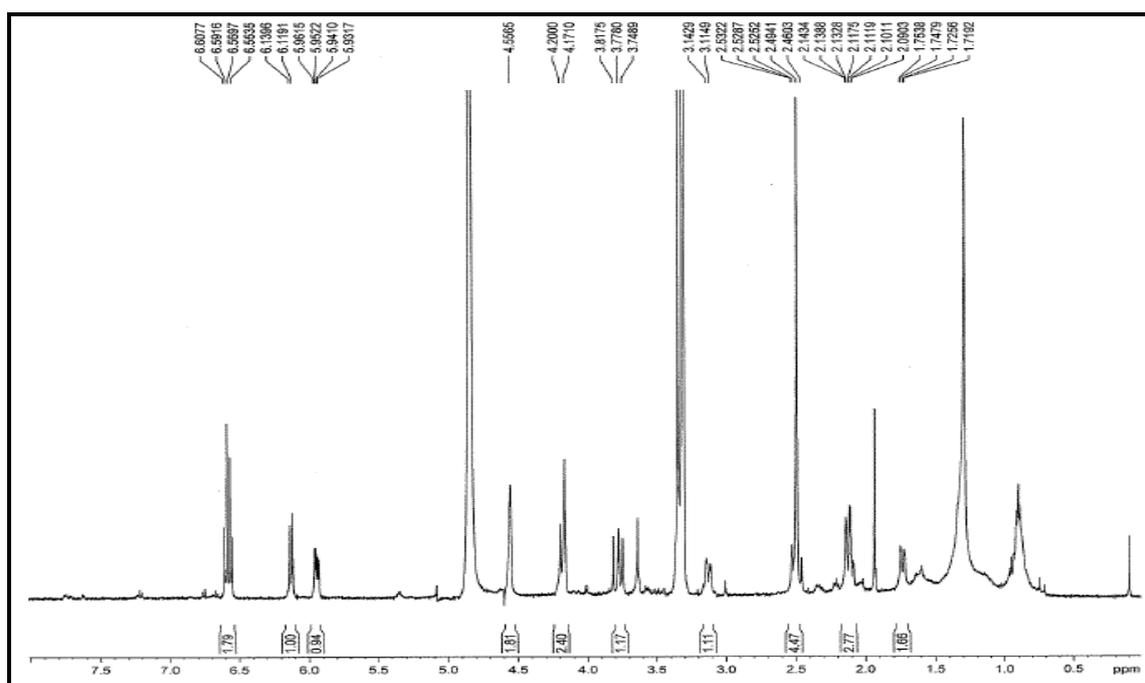


Figura 64 – Espectro de RMN 2D¹H, ¹H-NOESY de **HS-8** (CD₃OD, 500 x 500 MHz)

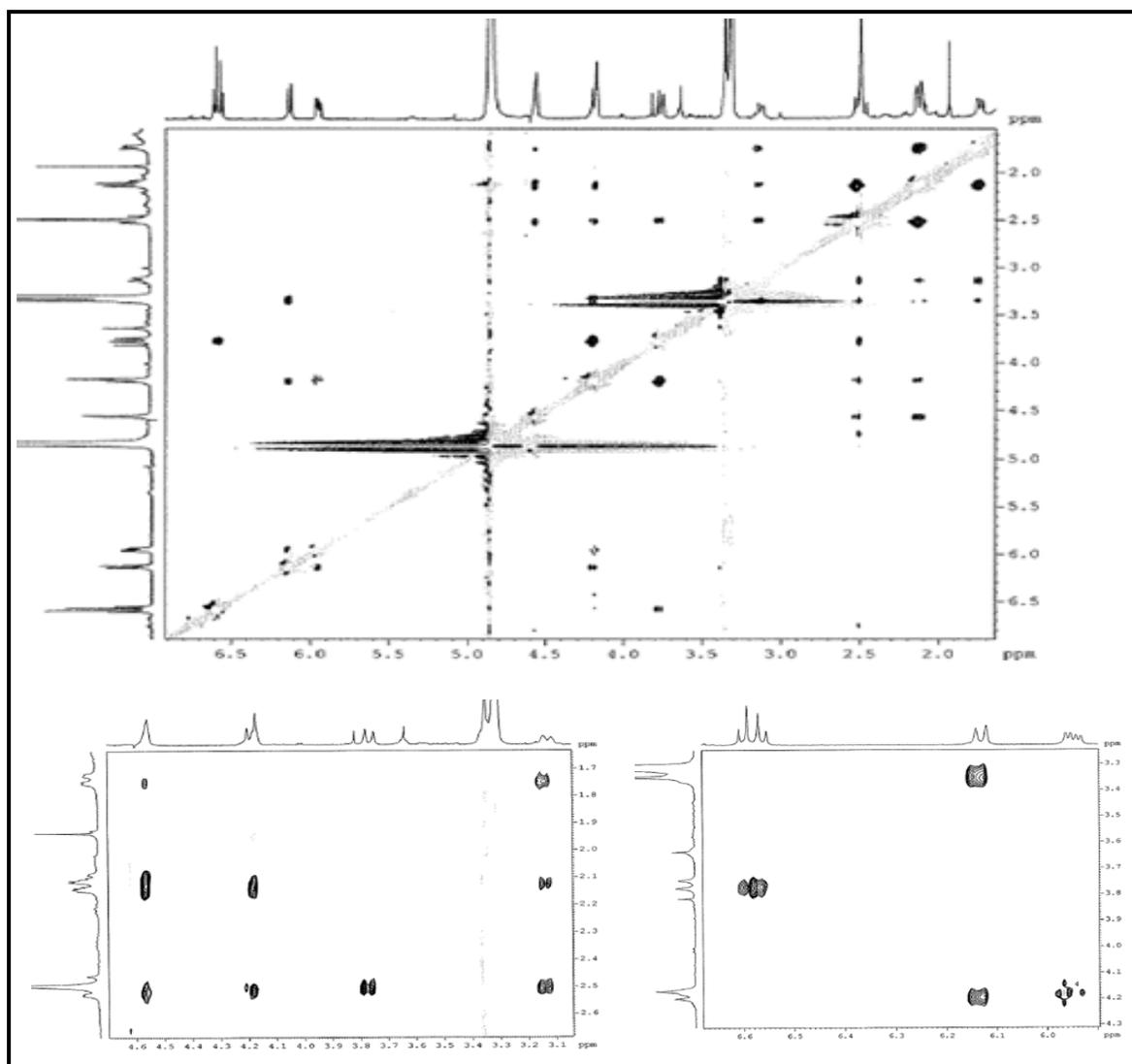


Figura 65 - Espectro de RMN-HSQC (MeOD, 125 x 500 MHz) de **HS-8**.

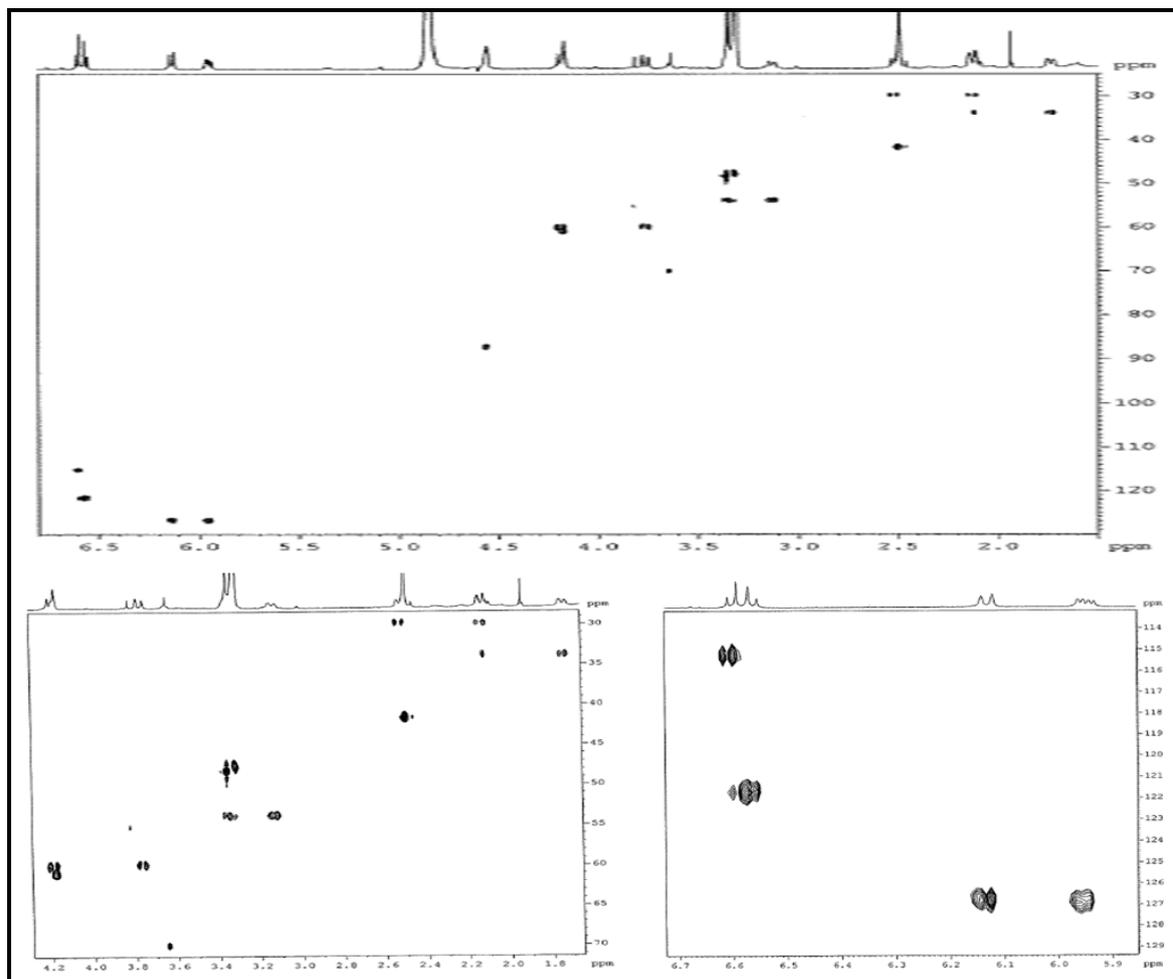


Figura 66 - Espectro de RMN-HMBC (MeOD, 125 x 500 MHz) de HS-8.

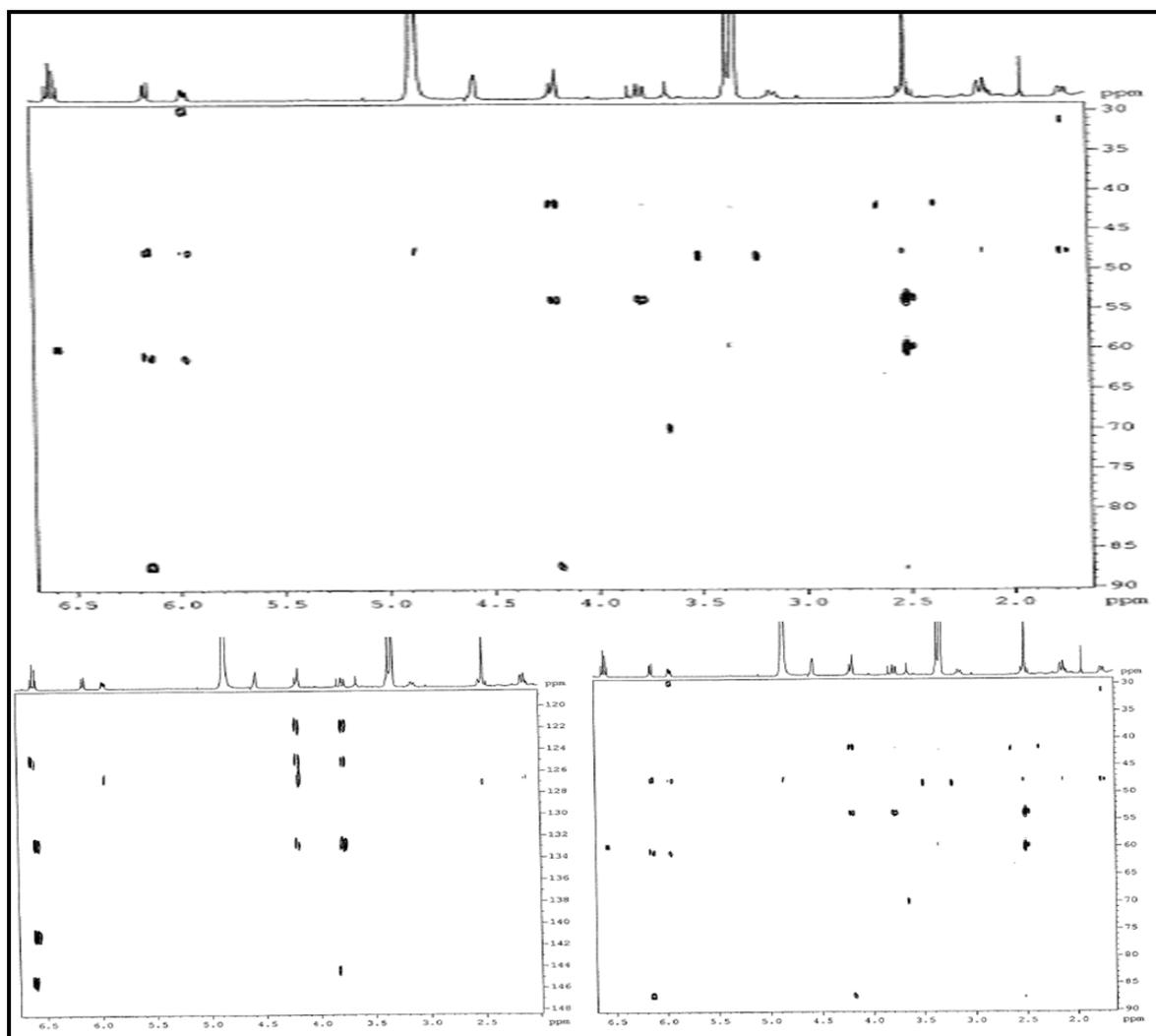
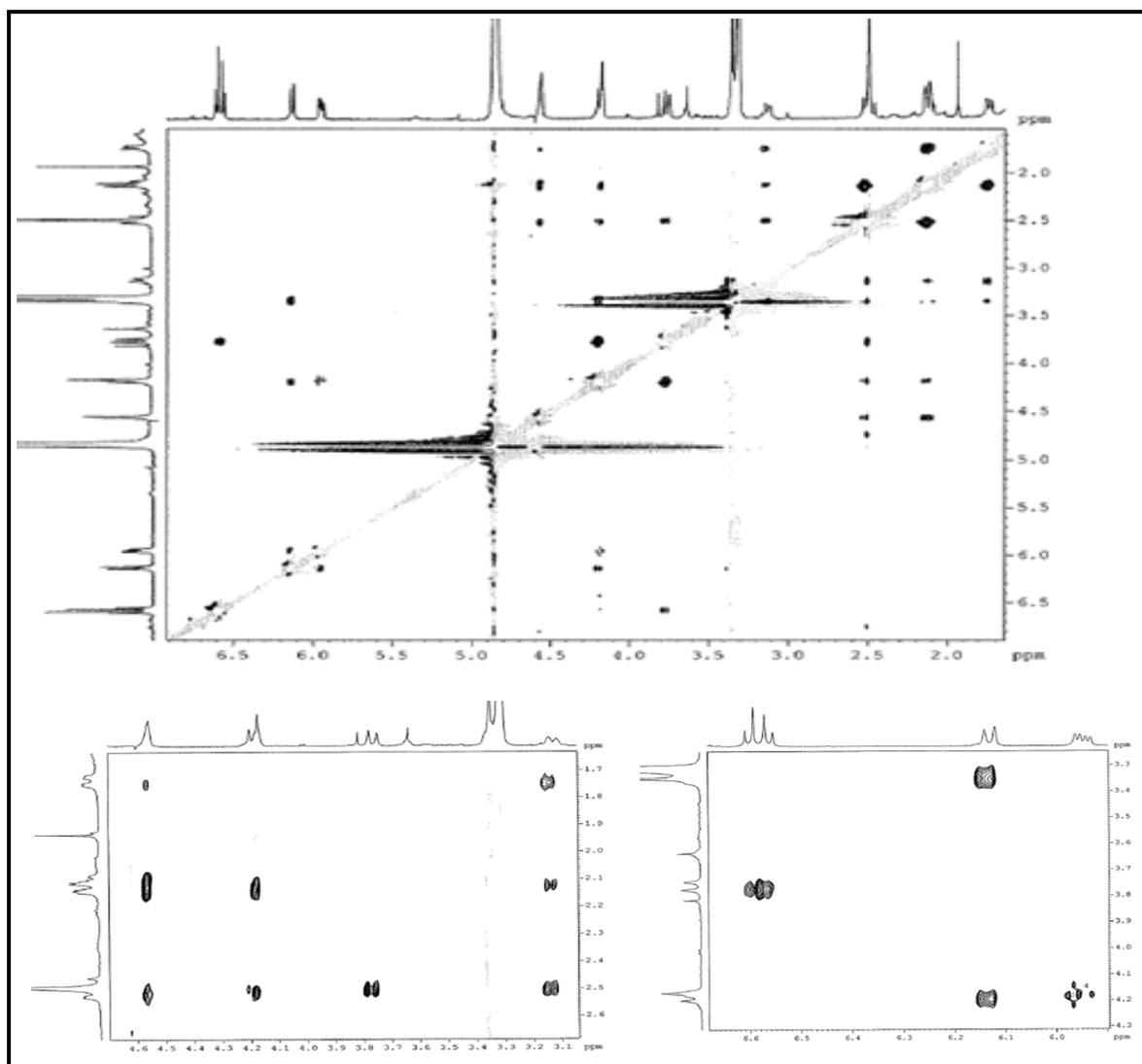


Figura 67 – Espectro de RMN 2D¹H, ¹H-NOESY de **HS-8** (CD₃OD, 500 x 500 MHz)



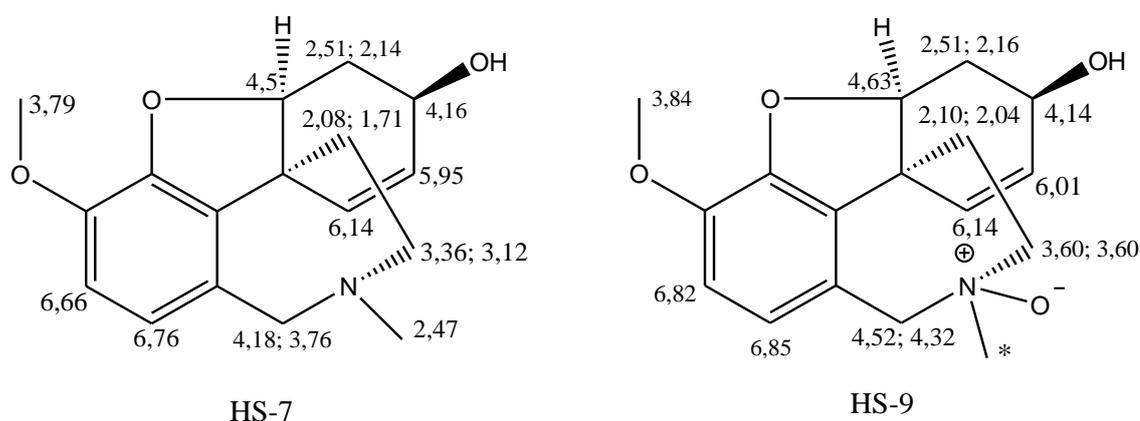
4.1.10 Determinação Estrutural de HS-9

O composto **HS-9** também foi isolado a partir de sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração AcOEt, rica em alcaloides, em Sephadex LH-20, cartucho C18 e CLAE, apresentando-se como uma resina amarela, com $[\alpha]_D^{20} = + 0,036$ (MeOH, c 0,02).

O espectro de massa de alta resolução de **HS-9** (Figura 65), obtido por ionização por *electrospray*, no modo positivo, exibiu o pico da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 304,1576, sugerindo a fórmula molecular $C_{17}H_{22}NO_4$ (calculada 304,1543), a qual apresenta 8 graus de insaturação.

A análise comparativa dos dados de RMN 1H de **HS-9** (Figura 71 e 72, p. 97 e 98), incluindo informações dos espectros COSY, HSQC e HMBC (Figuras 73, 74 e 75, p. 90, 100 e 111) com aqueles de **HS-7** revelou que os dois compostos diferem apenas quanto aos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios pertencentes ao anel B. Estes dados indicaram que HS-9 apresenta a mesma estrutura do esqueleto de **HS-7**, com um átomo de oxigênio ligado ao de nitrogênio, uma vez que seu espectro de massa revelou que **HS-9** possui 16 unidades de massa atômica a mais que **HS-7**. A introdução do átomo de oxigênio, formando o *N*-óxido, justifica a desblindagem dos hidrogênios ligados aos carbonos C-6 e C-12 em relação aqueles de **HS-7**.

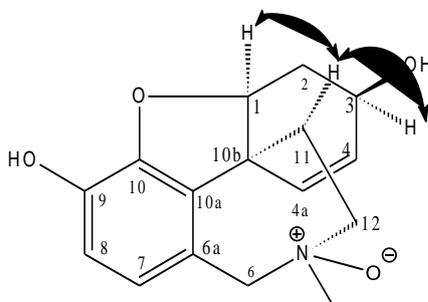
Figura 68 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN 1H dos compostos **HS-7** (b) e **HS-9** (a) (CD_3OD , 500 MHz). * Não detectado.



A estereoquímica relativa do composto foi determinada a partir da análise do espectro de RMN $2D^1H$, 1H -NOESY de **HS-9** (Figura 76, p. 102), o qual exibiu as interações espaciais entre os hidrogênios em δ 4,63 (H-1) com 2,10 (H-11 α) bem como δ 2,10 com 4,14 (H-3). Com base nestes dados e comparação com a literatura (KOBAYASHI *et al.*, 1991),

determinou-se as posições α para os hidrogênios H-1 e H-3, assim como para os dois grupos metilênicos (C-11 e C-12) a qual fazem parte do *N*-heterocíclico.

Figura 69 - Estrutura tridimensional de **HS-9**, destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY.



A união dos dados analisados permitiu afirmar que **HS-9** tratava-se de um alcaloide da classe isoquinolínico, conhecido como *N*-óxido galantamina, isolado previamente dos bulbos de *Lycoris sanguínea* (ABDALLAH 1994), porém é inédito no gênero.

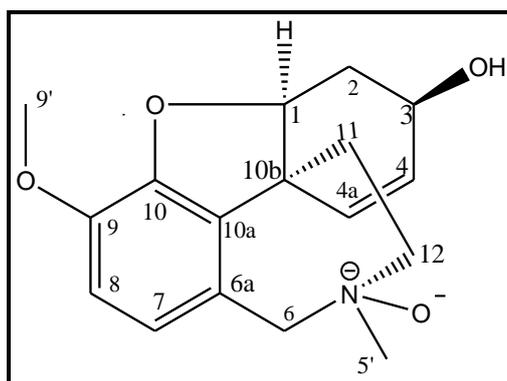


Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **HS-9** (500 e 125 MHz, CD_3OD).

C	HSQC		HSQC Lit**	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	86,0	4,63 (sl)	87,0	4,69 (sl)
2	29,0	α 2,51 (d, $J = 15,8$ Hz) β 2,16 (d, $J = 15,5$ Hz)	31,6	2,73 (d, $J = 16$) 2,16 (d, $J = 16$)
3	60,0	4,14 (sl)	62,2	4,46 (sl)
4	125,0	6,01 (dd, $J = 14,7$; $J = 4,7$ Hz)	127,0	6,28 (dd, $J = 10,4$)
4a	128,0	6,14 (d, $J = 10,3$ Hz)	130,0	6,43 (d, $J = 10$)
6	50,0	α 4,52 (d, $J = 15$ Hz) β 4,32 (d, $J = 15$ Hz)	52,1	4,66 (d, $J = 14$) 5,32 (d, $J = 14$)
6a	128,0	-	120,7	-
7	123,0	6,82 (d, $J = 8,3$ Hz)	124,7	6,71 (d, $J = 8$)
8	111,0	6,85 (d, $J = 8,3$ Hz)	114,1	6,82 (d, $J = 8$)
9	147,0	-	148,4	-
10	145,0	-	147,6	-
10a	133,0	-	133,8	-
10b	48,0	-	48,0	-
11	33,0	α 2,10 (m) β 2,04 (m)	35,5	2,24 (m) 1,90 (m)
12	44,0	α 3,60 (sl) β 3,60 (sl)	46,1	3,96 (d, $J = 14$) 4,35 (d, $J = 14$)
H₃C-N	n. d.	*	53,6	3,20 (s)
H₃C-O	59,0	3,8 (s)	56,8	3,71 (s)

*Não detectado

**Dados de RMN ^1H , ^{13}C CD_3OD 200 MHz (KOBAYASHI *et al.*, 1991)

***Dados de carbono foram obtidos pela projeção do espectro de HSQC e HMBC (Figura 74 e 75, p. 100 e 101).

**** Molécula protonada, obtido em HPLC TFA 0,1 %.

Figura 70 - Espectro de massa de alta resolução de HS-9, obtido por IES, no modo positivo.

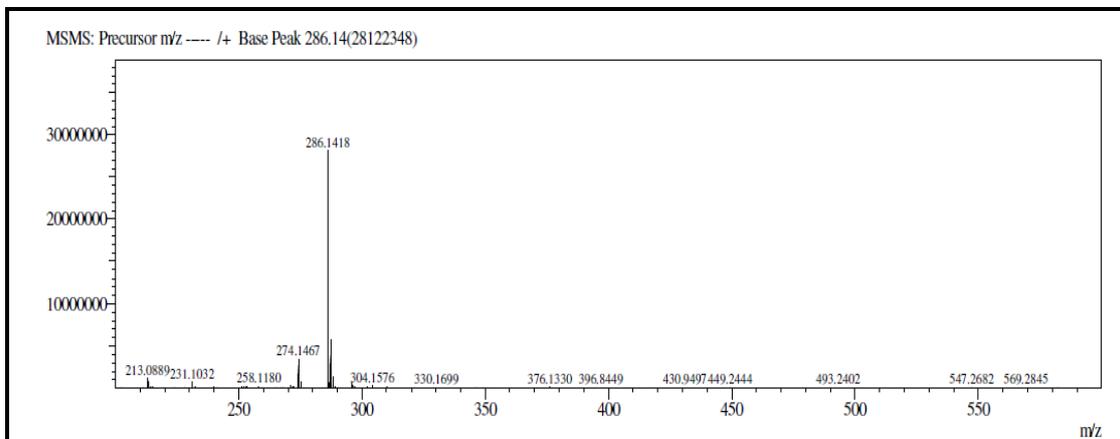


Figura 71 - Espectro de RMN ^1H de HS-9 (CD_3OD , 500 MHz).

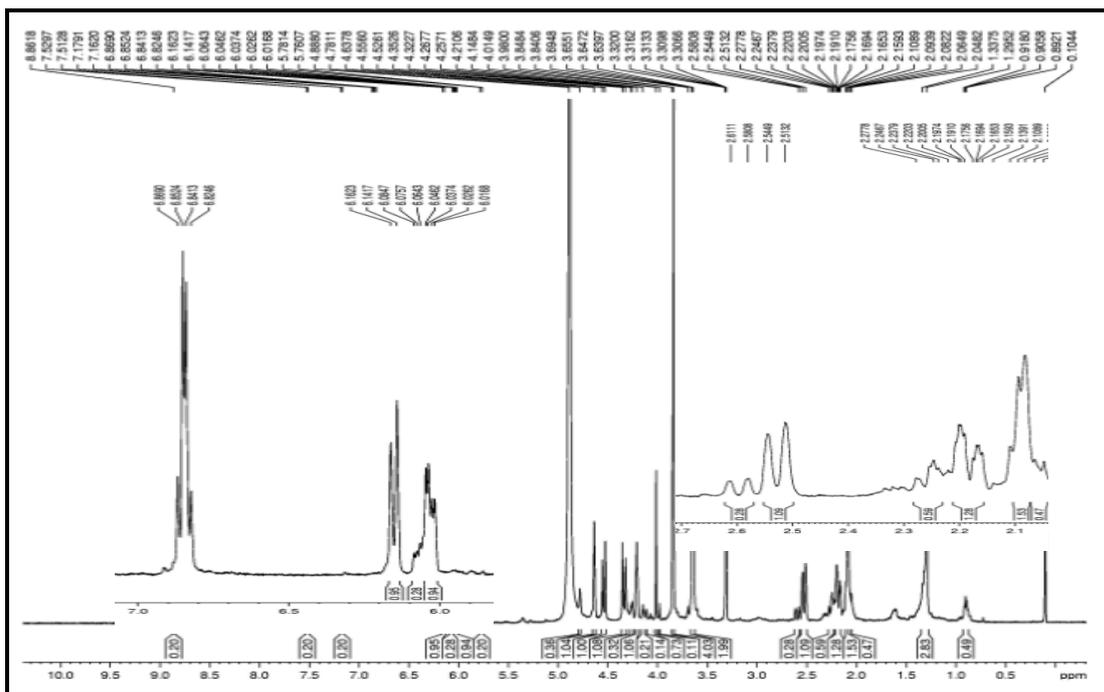


Figura 72 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **HS-9** (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 5,0 e 3,2 ppm.

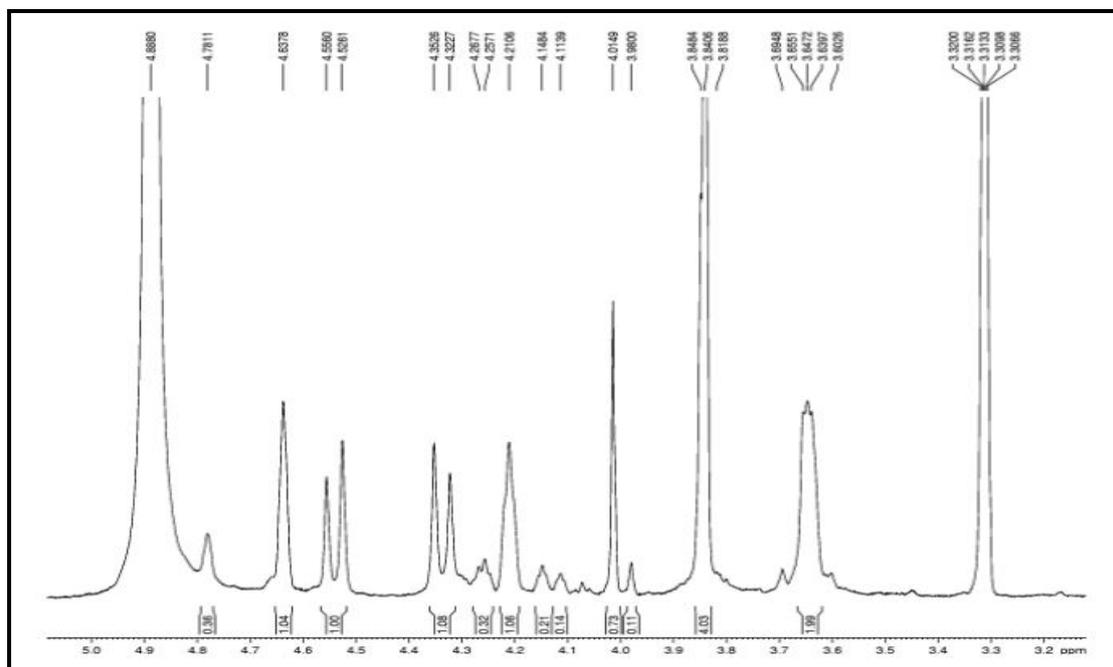


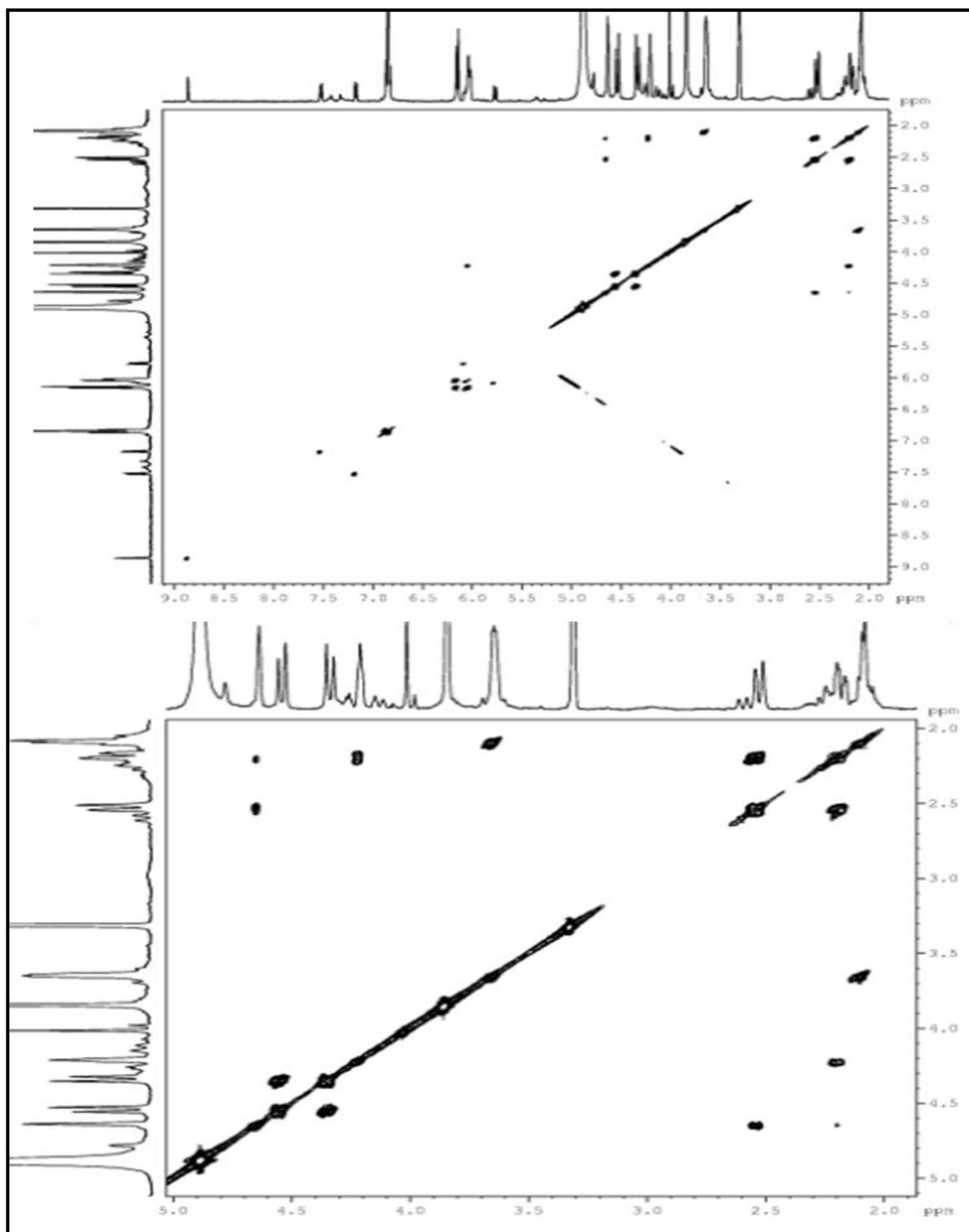
Figura 73 - Espectro de RMN 2D¹H, ¹H-COSY de **HS-9** (CD₃OD, 500 x 500 MHz).

Figura 74 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de **HS-9** (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

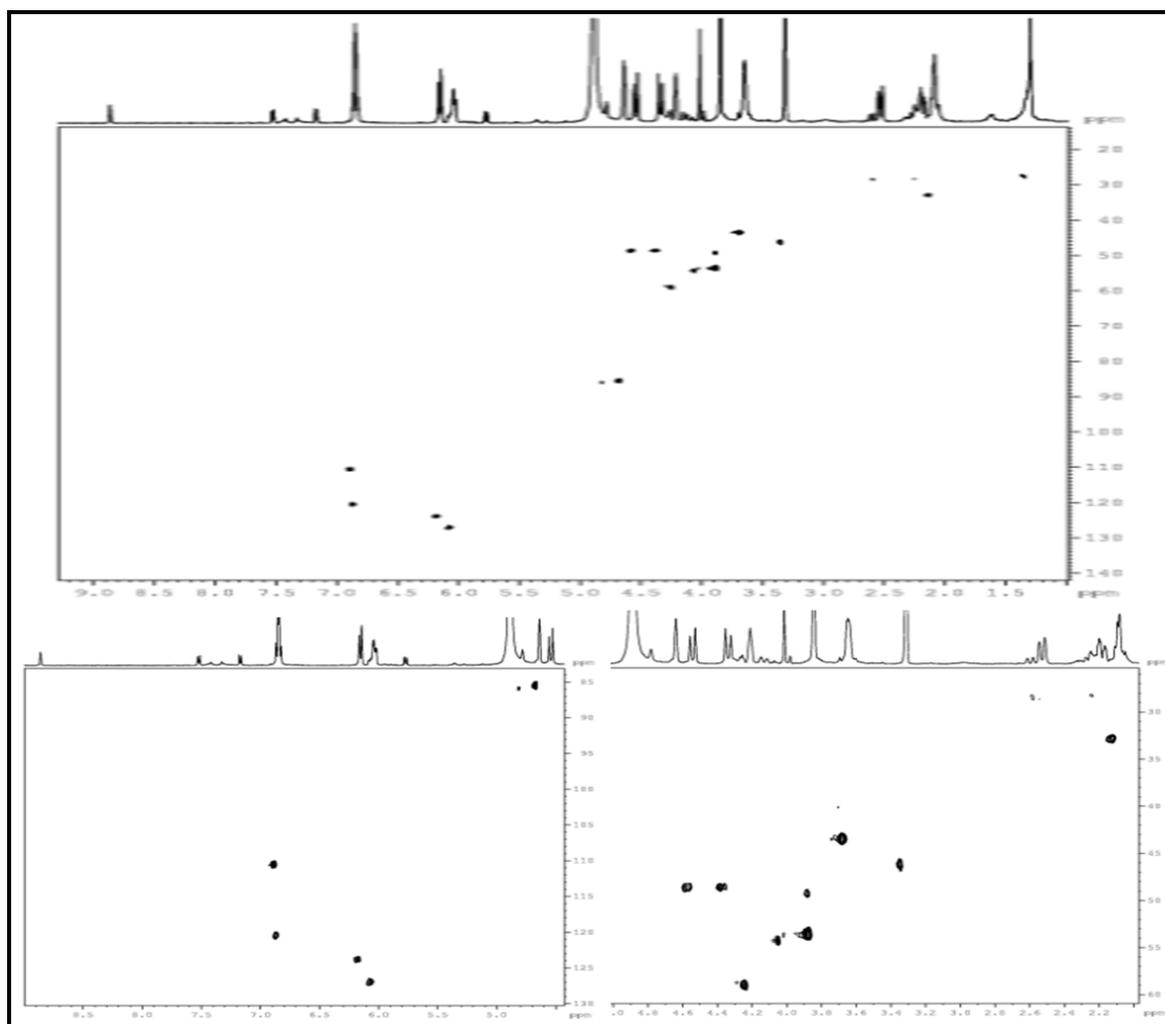


Figura 75 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de **HS-9** (CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansões.

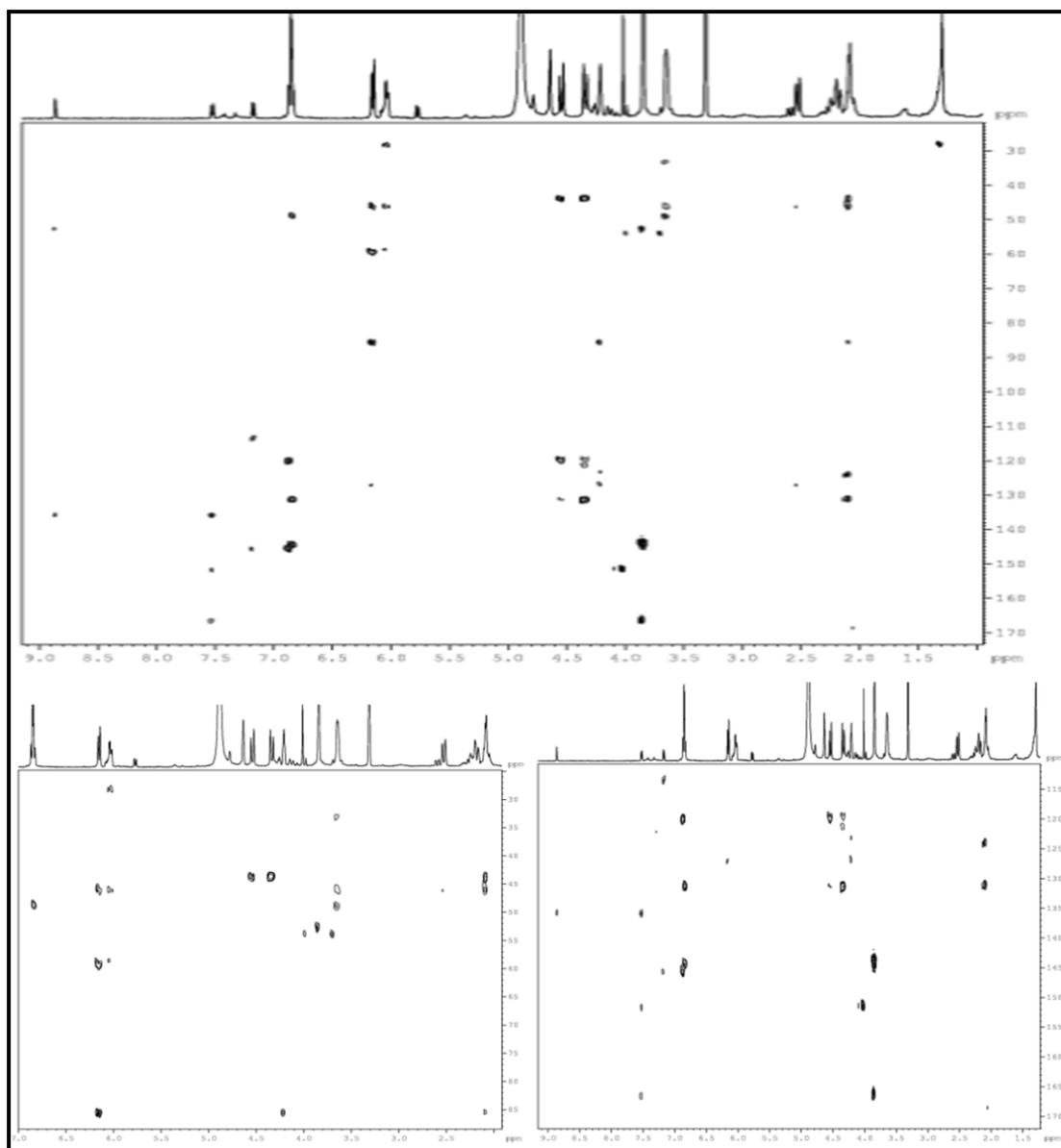
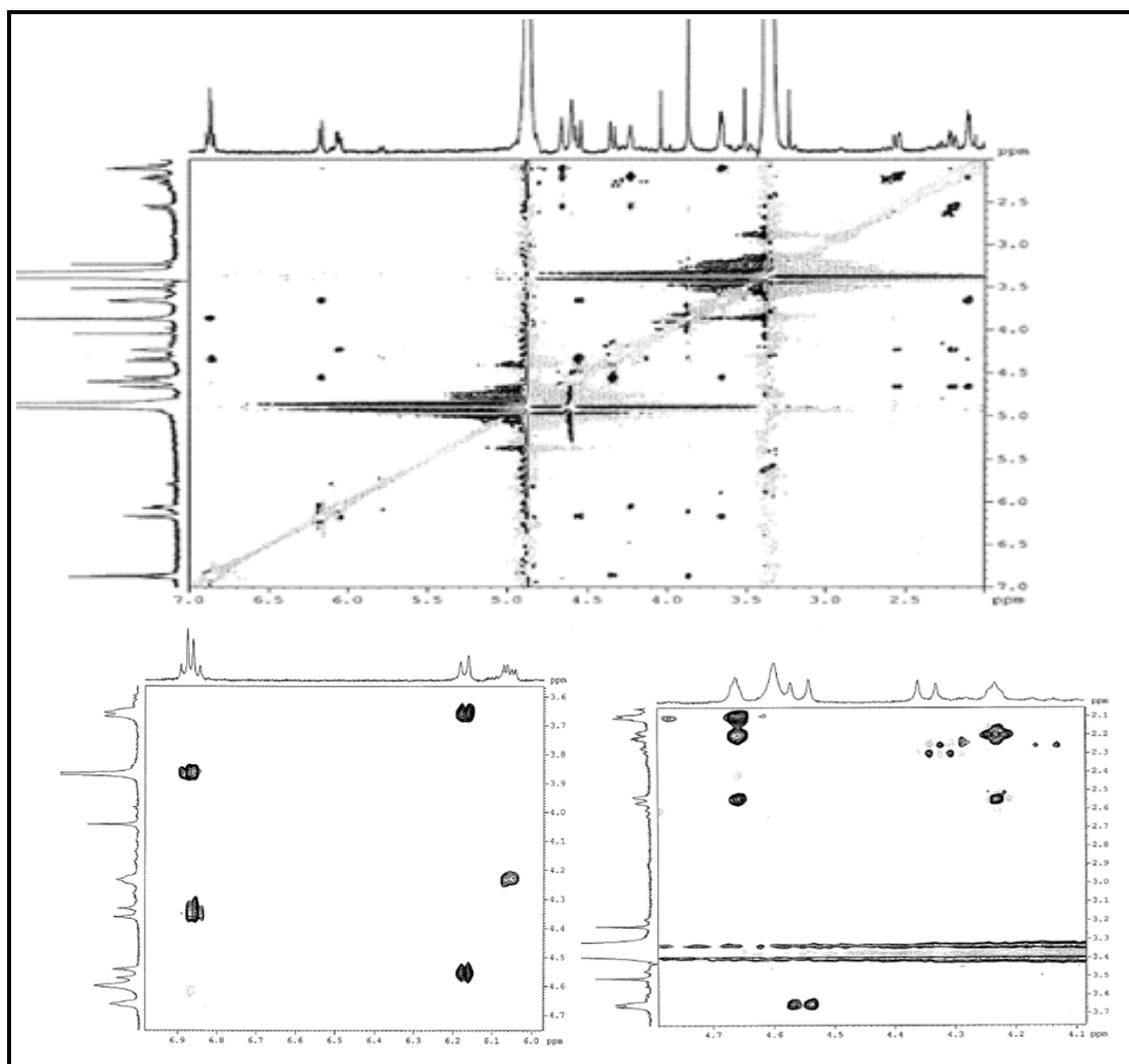


Figura 76 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de **HS-9** (CD_3OD , 500 x 500 MHz)



4.1.11 Determinação estrutural de HS-10

HS-10 foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica AcOEt (Fluxograma 2, p. 125) Este composto apresentou-se como uma resina amarela, com rotação óptica $[\alpha]_D^{20} = 0,040$ (MeOH, c 0,016).

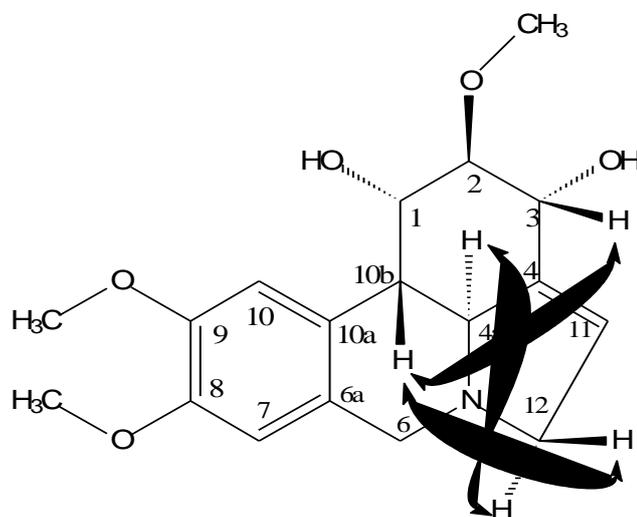
Seu espectro de massa de alta resolução (Figura 78, p. 106) obtido por ionização por *electrospray* (ESI) e no modo positivo, exibiu o pico do íon molecular $[M + H]^+$ em m/z 334,1632, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{20}NO_6$ (cal., 334,1654), a qual apresenta 8 graus de insaturação.

O espectro de RMN 1H de HS-10 (Figuras 79 e 80, p. 106 e 107) apresentou sinais na região de aromáticos em δ 7,03 (s, H-10) e 7,12 (s, H-7), um singlete em δ 5,88, o qual foi inferido a uma ligação dupla trissubstituída, bem como três singletos com integração para três hidrogênio em δ 3,30 (2'OMe) 3,88 (8'OMe) e 3,84 (9'OMe) compatíveis com grupos metoxilas. Adicionalmente, foram observados sinais de δ 4,50 (H-4a), 3,11 (H-10b), 4,62 (2H-6) e 4,16 (2H-12) referentes a hidrogênios metínicos e metilênicos.

Através do espectro de COSY (Figura 81, p. 108) foram observados os acoplamentos dos hidrogênios em δ 3,11 (H-10b) e 4,50 (H-4a), do hidrogênio em δ 3,75 (H-2) com os hidrogênios 4,68 (H-1) e 4,86 (H-3) e do hidrogênio em δ 4,16 (H-12) com o hidrogênio em 5,88 (H-11).

O espectro NOESY (Figura 82, p. 109), revelou interações espaciais entre o hidrogênio em δ 3,11 (H-10b) com os sinais de hidrogênio em δ 3,75 (H-2) 4,16 (H-12 β). A configuração relativa estabelecida com base no espectro NOESY está de acordo aquela inferida para narcissidina, um alcalóide de esqueleto do tipo licorina, previamente isolado da espécie *Leucojum autumnale* L. (KIHARA, 1995).

Figura 77 - Estrutura tridimensional de **HS-10**, destacando os acoplamentos espaciais vistos no espectro NOESY.



A reunião dos dados acima discutidos permitiu afirmar que **HS-10** tratava-se da narcissidina, um alcaloide isoquinolínico de esqueleto licorina. Um minucioso levantamento bibliográfico revelou que este composto está sendo registrado pela primeira vez no gênero.

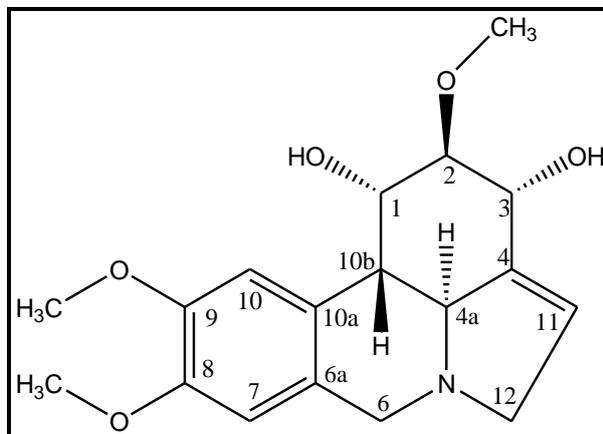


Tabela 13 - Dados de RMN¹H do composto **HS-10** (500 MHz, CD₃OD).

C	HSQC δ_{H}	HSQC Lit* δ_{H}
1	4,68 (sl)	4,87 (m)
2	3,75 (sl)	3,81 (t, $J = 3,0$ Hz)
3	4,86**	4,70 (m)
4	-	-
4a	4,50 (d, $J = 10,5$ Hz)	4,69 (d, $J = 3,0$ Hz)
6	α 4,62 (t, $J = 15,0$ Hz) β 4,62 (t, $J = 15,0$ Hz)	α 4,10 (t, $J = 13,0$ Hz) β 4,59 (t, $J = 13,0$ Hz)
6a	-	-
7	7,12 (s)	6,90 (s)
8	-	-
9	-	-
10	7,03 (s)	6,90 (s)
10a	-	-
10b	3,11 (d, $J = 12$ Hz)	2,74 (d, $J = 11$ Hz)
11	5,88 (s)	5,61 (m)
12	α 4,16 (d, $J = 14$ Hz) β 4,16 (d, $J = 14$ Hz)	4,07 (dt, $J = 14,5; 2,0$) 3,60 (ddd $J = 2,0; 5,5; 14,5$)
8'-OMe	3,88 (s)	3,88
9'-OMe	3,84 (s)	3,84
2'-OMe	3,30 (s)	3,46

*Dados de RMN¹H, CDCl₃, 400 MHz (KIHARA, 1995)

**sobreposto pelo sinal da água

Figura 78 - Espectro de massa de alta resolução de **HS-10**, obtido por ESI, no modo positivo.

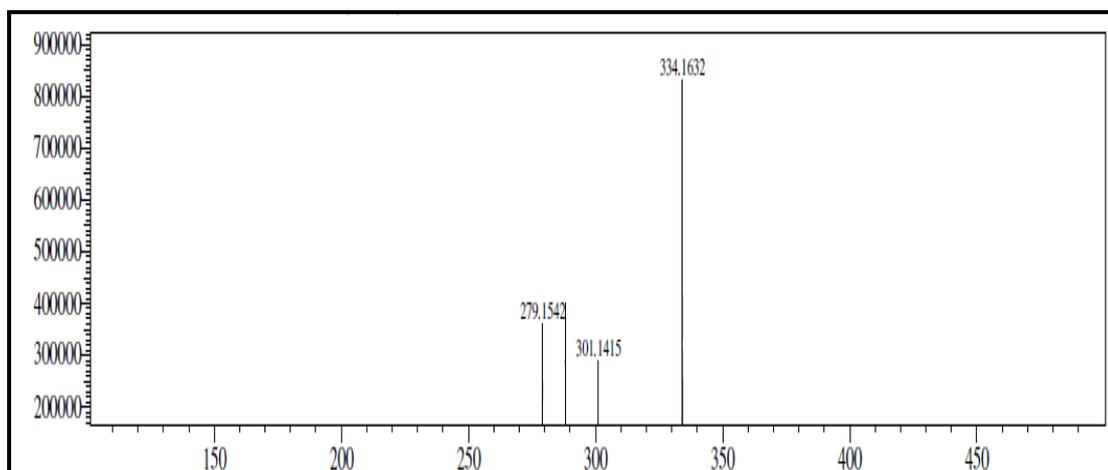


Figura 79 - Espectro de RMN ^1H de **HS-10** (CD_3OD , 500 MHz).

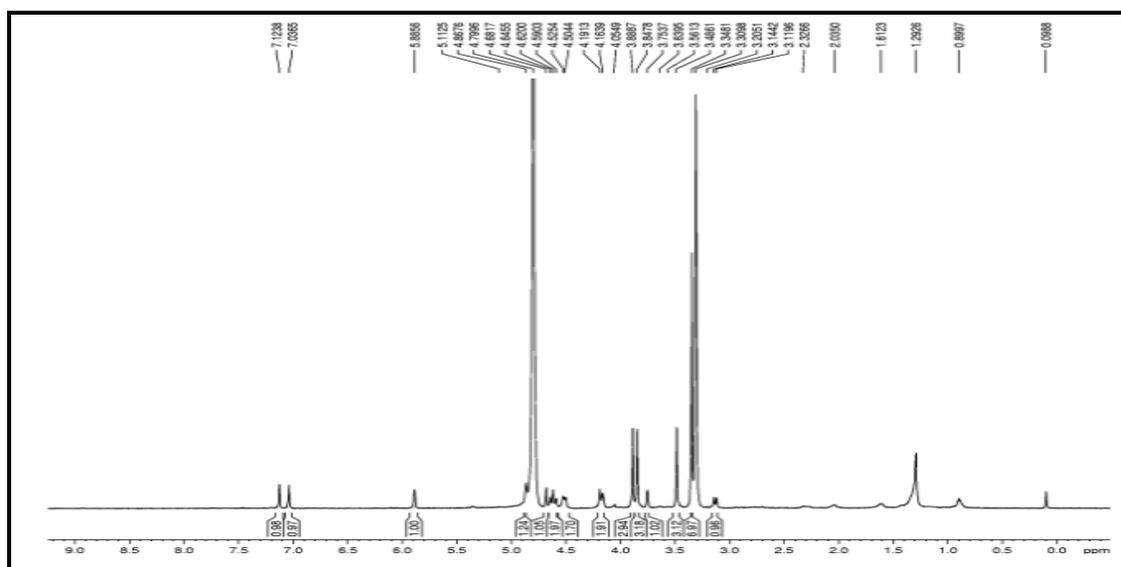


Figura 80 -Expansão do espectro de RMN ^1H de **HS-10** (CD_3OD , 500 MHz), correspondente à região entre 5,0 e 3,1 ppm.

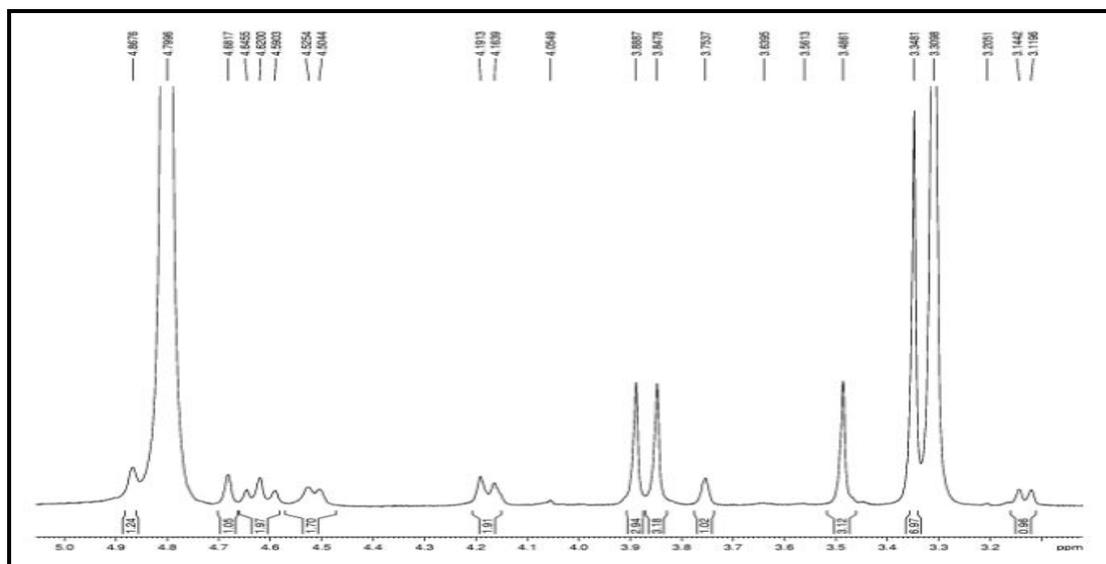


Figura 81 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de HS-10 (CD_3OD , 500 x 500 MHz).

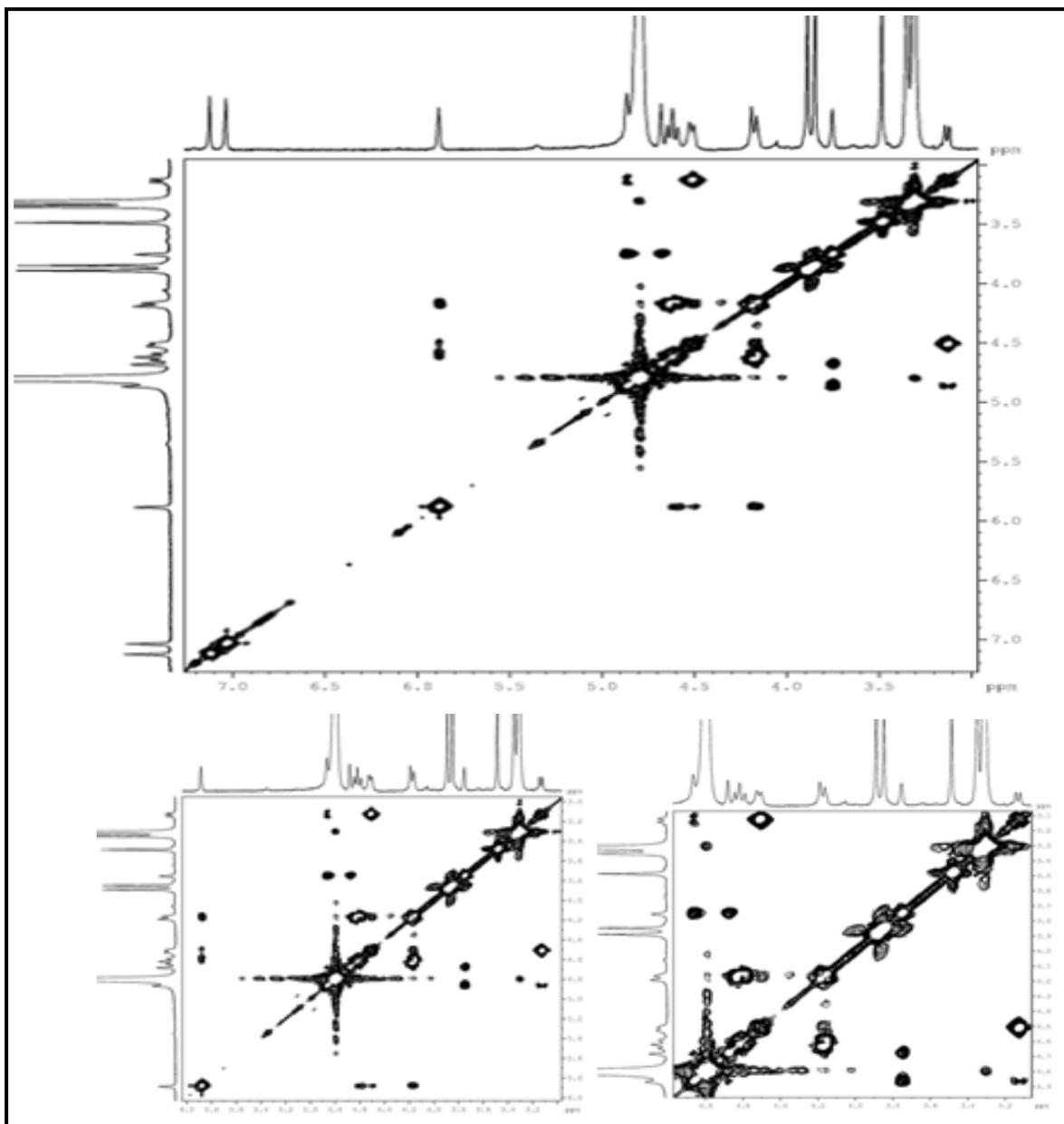
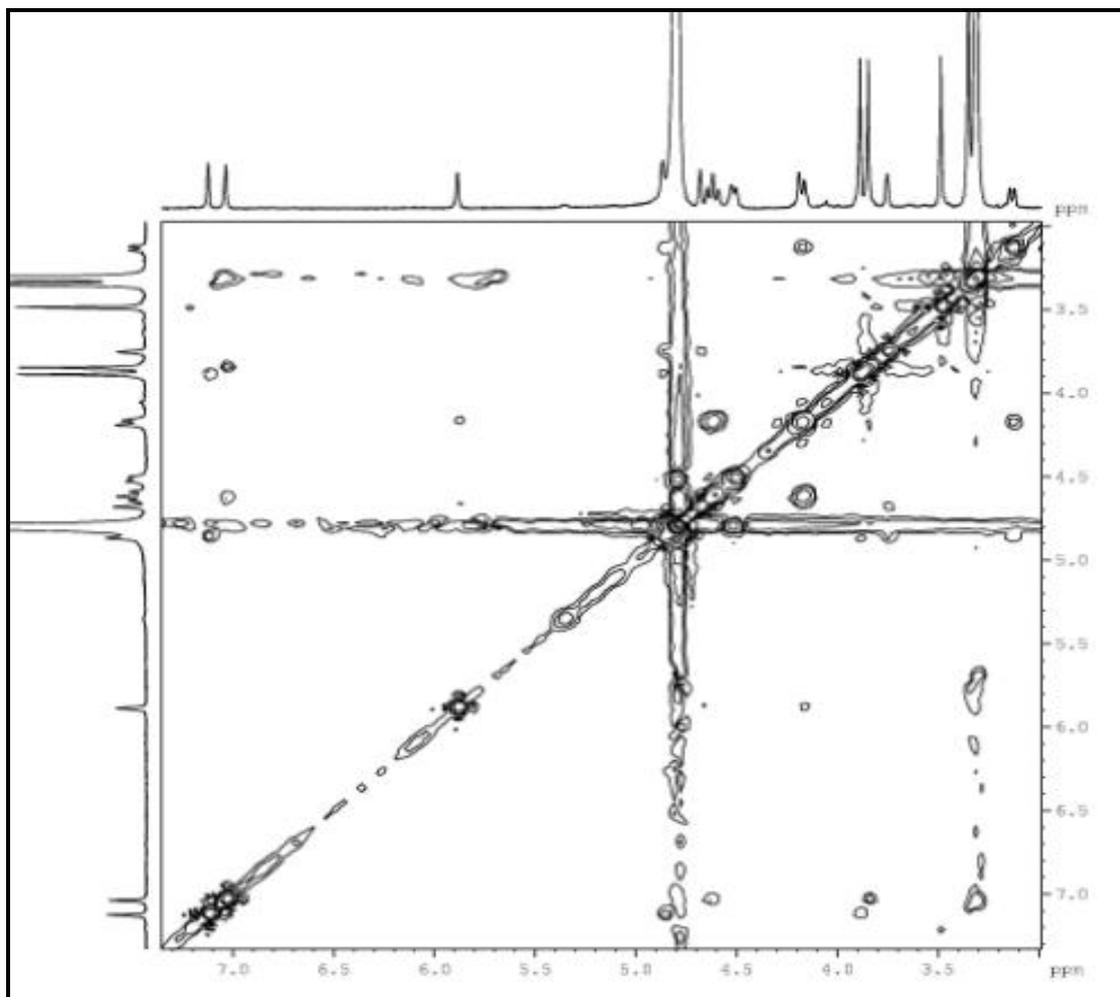


Figura 82 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de **HS-10** (CD_3OD , 500 x 500 MHz).



4.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Dos sete alcaloides isolados neste trabalho, cinco já são relatados na literatura, sendo três deles possuidores de atividade citotóxica. A narciclasina (**HS-4**) foi testada frente a 60 linhagens de células cancerosas, entre elas destacam-se (leucemia, cólon, pâncreas, próstata), mostrando-se ativa contra todas elas com IC_{50} médio de $0,05 \mu\text{M}$ (VAN GOIETSENOVEN, *et al.*; 2013). A Galantamina (**HS-7**) (Reminyl®) é comercializada nos Estados Unidos e Europa para o tratamento da doença de Alzheimer para o tratamento de falha de memória e outros declínios associados à terceira idade (HOUGHTON, *et al.*; 2004), além de possuir inibição contra acetilcolinesterase (AChE) (HEINRICH, *et al.*; 2004) assim como o alcaloide sanguinina (**HS-8**) que por sua vez possui inibição contra AChE pouco mais intenso quanto a galantamina (BERKOV, *et al.*; 2008).

O efeito global de todos os compostos isolados (**HS-4** a **HS-10**) foi determinada pelo ensaio MTT contra quatro linhagens de células tumorais, HCT-116 (cólon), HL-60 (leucemia), OVCAR-8 (ovário) e SF-295 (cérebro). Os dados da tabela abaixo mostra elevada citotoxicidade de **HS-4** contra as quatro linhas celulares testadas com valores de IC_{50} entre $0,01 - 0,09 \mu\text{M}$. Este resultado esta de acordo com os dados registrados na literatura (VAN GOIETSENOVEN, *et al.*; 2013).

Além de **HS-4** apenas o composto **HS-5** pode ser considerado como altamente citotóxico, com valores de IC_{50} em torno de $1 \mu\text{M}$. Em geral, HCT-116 foram as linhas de células mais sensíveis, onde cinco dos sete compostos testados apresentaram valores de IC_{50} abaixo de $50 \mu\text{M}$.

Tabela 14 - Citotoxicidade dos compostos (**HS-4** a **HS-10**) em determinadas linhas de células de tumor avaliadas pelo ensaio de MTT, após 72 h de exposição.

	IC ₅₀ μM (CI 95%)			
	HCT-116	HL-60	OVCAR8	SF-295
HS-4	0.02 (0.01 - 0.03)	0.01 (0.02 - 0.01)	0.09 (0.07 - 0.10)	0.02 (0.02 - 0.03)
HS-5	0.85 (0.71 - 1.02)	1.10 (0.97 - 1.26)	1.59 (1.28 - 1.97)	1.81 (1.54 - 2.11)
HS-6	11.69 (8.10 - 16.87)	> 50	15.11 (6.41 - 35.66)	16.31 (11.96 - 22.24)
HS-7	> 50	> 50	> 50	> 50
HS-8	29.00 (16.97 - 49.57)	32.08 (19.83 - 52.02)	> 50	> 50
HS-9	> 50	> 50	> 50	> 50
HS-10	> 50	> 50	> 50	> 50
Doxorubicin	0.02 (0.02 - 0.04)	0.03 (0.02 - 0.04)	0.29 (0.18 - 0.40)	0.33 (0.22 - 0.43)

Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

5.1.1 - Cromatografia de Adsorção

Nas cromatografias de adsorção foi empregada gel de sílica 60 da Merck ou da Vetec (\emptyset μm 70-230, cromatografia gravitacional e \emptyset μm 230-400, cromatografia *flash*). As colunas sob média pressão (cromatografia *flash*) foram realizadas empregando-se uma bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 682403 de Ind. de aparelhos médicos Ltda. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (\emptyset 5-40 μm) sobre alumínio da Silicycle com indicador de fluorescência na faixa de 254 ηm . Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta no comprimento de onda (254 ηm) emitidos por lâmpada modelo CN-15LM da Vilber Lourmat, e/ou pela pulverização com reagente de Dragendorff ou por aspersão com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), seguido de aquecimento (100 °C) por aproximadamente 5 minutos, ou ainda por exposição a vapores de iodo.

5.1.2 Cromatografia de Exclusão

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol como fase móvel.

5.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE \approx HPLC)

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho de HPLC da marca SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de dióxido (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. As separações foram efetuadas em coluna semi-preparativa Phenomenex[®] (4,6 x 250 mm, 5 μm), mantidas em forno termostático a 35°C. As amostras foram eluídas com água (levemente acidificada com ácido trifluoracético -TFA) e acetonitrila.

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (MeOH e ACN-Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Whatman).

5.1.4 Extração em Fase Sólida (EFS ≈ SPE)

As extrações em fase sólida das frações dos bulbos de *H. solandriiflorum* com fins de isolamento, bem como na etapa de preparo das amostras injetadas no HPLC (*clean-up*), foram realizadas em cartuchos de fase reversa (C18) de 2000 mg (Phenomenex). O uso dos cartuchos era precedido por ativação do adsorvente com metanol, seguida de acondicionamento em água Milli-Q, utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho.

5.2 MÉTODOS FÍSICOS

5.2.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital MARCONI, modelo MA 381/CE composto por uma placa aquecedora N480D pertencente ao Laboratório de Fitoquímica de Plantas Mediciniais - LAFIPLAM/UFC. As verificações foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min.

5.2.2 Rotação óptica

As rotações ópticas foram obtidas em polarímetro digital da Perkin-Elmer 341 em temperatura de 25 °C e concentração de 1mg/1mL de solvente.

5.2.3 Método de análise dos resultados

Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrões. O cálculo das CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *GraphPrism* (versão 5).

5.3. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

5.3.1 Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Spectrum 100 – FT-IR Spectrometer da Perkin Elmer, modelo Universal ATR Sampling Accessory.

5.3.2 Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro SHIMADZU, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray*, pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste, da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC), sendo os *scans* adquiridos no modo positivo.

5.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ^1H) e Carbono 13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelos DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 500 e para hidrogênio e 125 e para carbono-13, ambos pertencente ao Centro Nordestino de aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade federal do Ceará (CENAUREMN-UFC) .

O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foi metanol deuterado (CD_3OD).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente: metanol δ (3,31) e para os espectros de RMN ^{13}C pelo pico de carbono-13 do solvente: metanol δ (49,15).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

5.4 ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE HIPPEASTRUM SOLANDRIFLORUM

5.4.1 - Material vegetal

Os bulbos de *Hippeastrum Solandriflorum* utilizadas no estudo foram coletadas na cidade de Russas, Ceará, em Fevereiro de 2012, pelo professor Edilberto Rocha Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

A identificação da planta foi realizada pelo professor Luiz Wilson Lima Verde do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

5.4.2 – Preparação do extrato

Os bulbos fresco (8,80 Kg) foram triturados e extraídos através de maceração com etanol (3 x 5 L), que após concentração do solvente, a pressão reduzida, forneceu o extrato etanólico (283 g), o qual foi codificado por HS-EtOH.

5.4.3 – Partição líquido-líquido do extrato etanólico (HS-EtOH)

Uma alíquota (88,00 g) do extrato etanólico dos bulbos de *H. solandriiflorum* foi dissolvido em 100 mL de MeOH/H₂O 30%. Após este procedimento foram individualmente submetidas à partição líquido-líquido, utilizando-se os solventes: DCM (5 x 100 mL), AcOEt (5 x 100mL), n-ButOH (2 x 50 mL) e fração aquosa cujas massas resultantes foram: 2,80 g (DCM), 1,64 g (AcOEt), 1,54 g (n-ButOH) e 56,00 g (fração aquosa).

5.4.4 - Fracionamento cromatográfico das frações AcOEt e DCM da partição

As frações AcOEt e DCM (Fluxoframa 1, p. 124) após analisadas por CCDA, foram reunidas. O material resultante dessas frações (HS-AD; 4,44 g) foi adsorvido a 10,9 g de gel de sílica e cromatografada sobre 53,7 g de gel de sílica. A eluição foi realizada a vácuo utilizando Hexano, DCM, AcOEt e MeOH puros ou em mistura binárias em escala crescente de polaridade. Foram obtidas 8 frações, as quais foram concentradas sob pressão reduzida para obtenção das suas respectivas massas, conforme sumarizada na Tabela, abaixo.

Tabela 15 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração HS-AD.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa (mg)
Hex/ DCM 80%	250	HS-AD-1	343,4
DCM 100%	250	HS-AD-2	183,5
DCM/ AcOEt 20%	250	HS-AD-3	583,3
DCM/ AcOEt 50%	250	HS-AD-4	549,9
AcOEt 100%	250	HS-AD-5	250,1
AcOEt/ MeOH 20%	250	HS-AD-6	950,2
AcOEt/ MeOH 50%	200	HS-AD-7	830,4
MeOH 100%	200	HS-AD-8	90,6
TOTAL			3.780,7 g

A análise comparativa por CCDA revelada sob lâmpada de UV (254 nm) seguida por borrifamento com vanilina e aquecimento das frações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração **HS-AD**. Diante das análises por CCDA, as frações **HS-AD-3** e **HS-AD-6** foram, individualmente, submetidas a tratamentos cromatográficos em coluna *flash*.

5.4.5 – Fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-3 e isolamento de HS-1.

O material (583,3 mg) foi adsorvido em 1,27 g de gel de sílica e recromatografado sob 91,4 g de gel de sílica em coluna de 2,7 de diâmetro, utilizando como eluente os solventes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 108 frações de aproximadamente 5,0 mL, conforme descrito na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-3.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Fração Reunidas	Massa (mg)
1-44	Hex/ AcOEt 30%	400	1-10	6,5
45-106	Hex/ AcOEt 50%	500	11-22	12,5
107	AcOEt 100%	250	23-38	106
108	AcOEt/ MeOH 50%	250	39-72	114
			73-80	14,4
			81-96	17,9
			97-107	256,7
			108	51,9
TOTAL				579,9

A subfração **f(97-107)** foi recromatografada em coluna de gel de sílica, resultando no isolamento de **HS-1** (14,0 mg).

5.4.6 Fracionamento cromatográfico da fração HS-AD-6

O material (950,2 mg) foi adsorvido em 80 mg de gel de sílica e recromatografado sob 91,4 g de gel de sílica em coluna de 2,7 de diâmetro, utilizando como eluente os solventes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade.

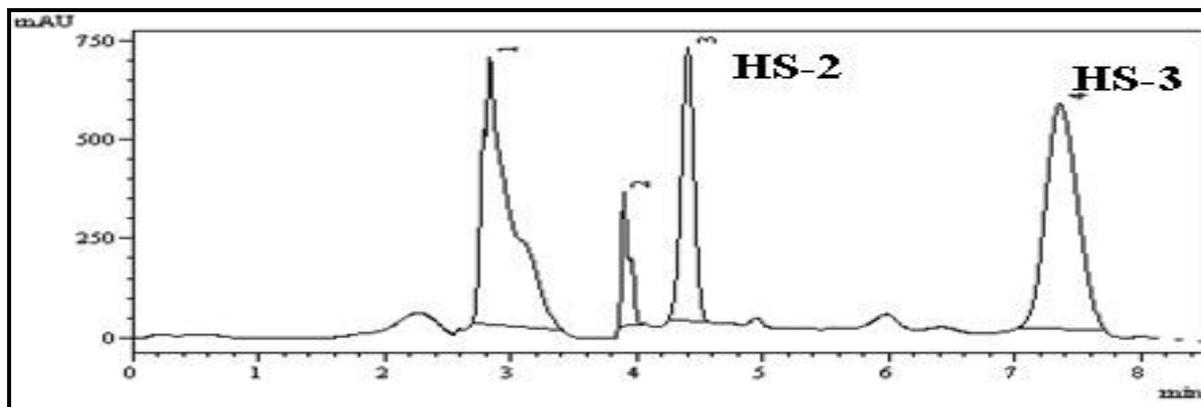
Tabela 17 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração **HS-AD-6**.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Fração Reunidas	Massa (mg)
1-44	Hex/ AcOEt 30%	400	1-15	8,0
45-106	Hex/ AcOEt 50%	500	16-32	20,5
107	AcOEt 100%	250	32-40	190,1
108	AcOEt/ MeOH 50%	250	41-60	170,5
			61-80	24,0
			81-92	230,5
			93-100	226,7
			101-108	54,9
TOTAL				927,1

A subfração f(32-40) foi recromatografada em coluna de gel de sílica, resultando no isolamento de **HS-4** (4,5 mg).

5.4.7 – Fracionamento cromatográfico da fração *n*-ButOH

A fração *n*-ButOH, após sucessivas colunas de exclusão molecular (Sephadex LH-20), forneceu a subfração **f27-32** (53,00 mg), a qual foi submetida a análise por HPLC. A separação, foi efetuada empregando-se como fase móvel ACN/H₂O 85 % (0,1% TFA), com fluxo de 4,72 mL/min durante 10 minutos. Foram identificados 3 picos (**Fig**) detectados na faixa de 210-400 nm e registrados com tempos de retenção de 2,8 min (pico 1; 9,8 mg); 3,8 min (pico 2; 3,4 mg); **4,4 min (pico 3; 4,5 mg)** e **7,3 min (pico 4; 6,0 mg)**, resultando assim no isolamento de **HS-2** e **HS-3**, respectivamente (Figura 83, p. 119).

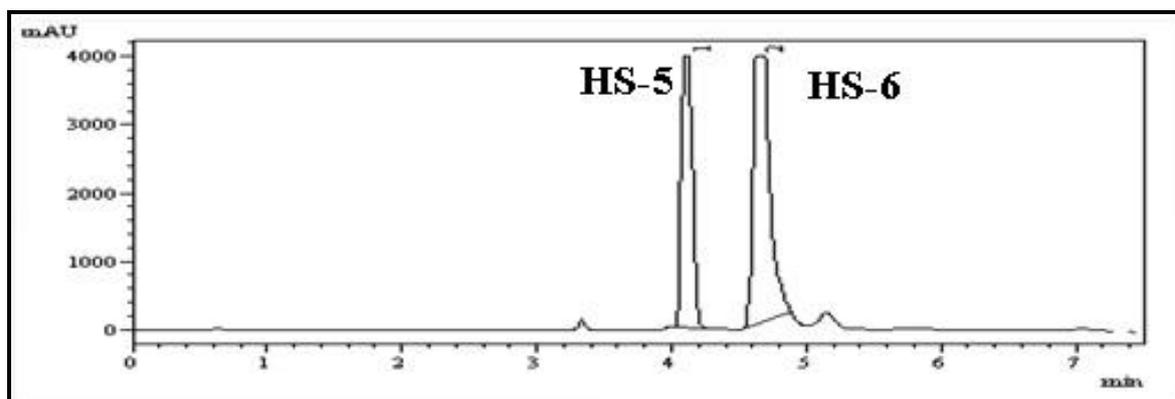
Figura 83 - Cromatograma de isolamento das substâncias **HS-2** e **HS-3**.

5.4.8 - Extração ácido-base da fração aquosa residual dos bulbos de *H. solandriflorum*

A fração aquosa residual (56,0 g) foi submetida à extração ácido-base, direcionada para o isolamento de seus alcaloides. O material foi dissolvido em 150 mL de HCl 10%, sob agitação magnética por 1 h. Em seguida realizou-se extrações com CH₂Cl₂ no intervalo de 30 min (3x 100 mL) fornecendo 165,1 mg da fração não alcaloídica. Após esse procedimento, adicionou-se 100 mL de NH₄OH 25% até aproximadamente pH 9. Posteriormente foram realizados extrações com acetato de etila (10 x 100 mL) e n-Butanol (2 x 50 mL) à cada 30 min, resultando nas frações alcaloídicas, cujas massas resultantes foram: AcOEt (760,8 mg) e n-ButOH (507 mg) (Fluxograma 2, p. 125)

5.4.9 Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica AcOEt

Durante a realização do procedimento cromatográfico, um sólido amorfo precipitou, em grande quantidade. O precipitado foi centrifugado, a fim de separar do líquido mãe. O material sólido (80,8 mg) foi submetido a análise por HPLC, empregando-se como fase móvel ACN/H₂O 15% (0,1% de TFA) e um com fluxo de 4,72 mL/min durante 10 minutos, o qual resultou no isolamento do composto **HS-5 (28,0 mg; 4,2 min)** e **HS-6 (38,0 mg; 5,8 min)** (Figura 17, p. 120)

Figura 84 - Cromatograma do isolamento da substância **HS-5** e **HS-6**.

O material solúvel (679,0 mg) resultante da separação foi cromatografada por exclusão molecular (Sephadex-LH20) usando o eluente MeOH. As frações foram coletadas e reunidas de acordo com suas semelhanças, obtendo-se 9 frações, mostradas na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt alcaloídico dos bulbos de *H. Solandriiflorum*.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
1	4,1	6	54,7
2	28	7	28,4
3	31,4	8	9,3
4	168,5	9	46,1
5	105,5		
Total	476 mg		

A análise por CCD revelada sob lâmpada de UV (254 nm) seguida por borrifamento com vanilina e aquecimento ou com reagente de Dragendorff das frações obtidas do fracionamento cromatográfico revelou que algumas frações apresentaram teste positivo frente ao reagente de Dragendorff, indicando a presença de alcaloides e justificando assim seu estudo. As frações 4-7 mostraram serem promissoras na obtenção dos alcaloides e em seguida foram reunidas de acordo com suas semelhanças obtendo-se duas frações codificadas como:

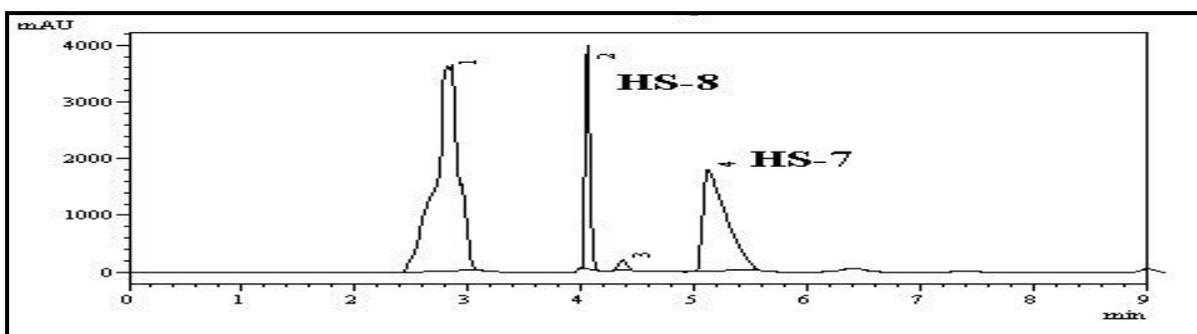
HS-Fr4-5 (274,0 mg) e **HS-Fr6-7** (83,1 mg) que posteriormente foram analisadas em cartucho SPE-C18.

5.4.10 - Fracionamento da fração HP-Fr4-5

O material (274,0 mg) foi inicialmente dissolvido em 2 mL em MeOH/H₂O 5:5 e cromatografado em cartucho de SPE-C18, utilizando-se como fase móvel um gradiente de MeOH/H₂O nas proporções 5:5 (f1-13), 6:4 (f14-29) e 100% de H₂O (f30-44), resultando em 44 frações com aproximadamente 5 mL. As frações da coluna foram monitoradas por CCD utilizando-se o reagente de Dragendorff como revelador e reunidas da seguinte forma: f1-3, f4-8, f9-12, f13-18, **f19-23**, **f24-37** e f38-44. As subfrações **f19-23** e f24-37 foram reunidas e selecionadas para o processo de purificação por HPLC.

A subfração **f19-37** (37,7 mg) foi injetada sucessivas vezes (200 µL) num aparelho de HPLC, equipado com coluna semi-preparativa de fase reversa. A separação, foi efetuada empregando-se como fase móvel ACN/H₂O 15% (0,1% de TFA), com fluxo de 4,72 mL/min durante 12 minutos. Foram identificados 4 picos, detectados na faixa de 210-400 nm e registrados com tempos de retenção de 2,81 min (pico 1; 8,5 mg), **4,0 min (pico 2; 4,5 mg)**, 4,32 min (pico 3; 1,2 mg) e **5,0 min (pico 4; 6,4 mg)**. O material referente aos picos 4,0 min e 5,0 min foram coletados e possibilitou o isolamento do composto **HS-8** e **HS-7**, respectivamente (Figura 85, p. 121).

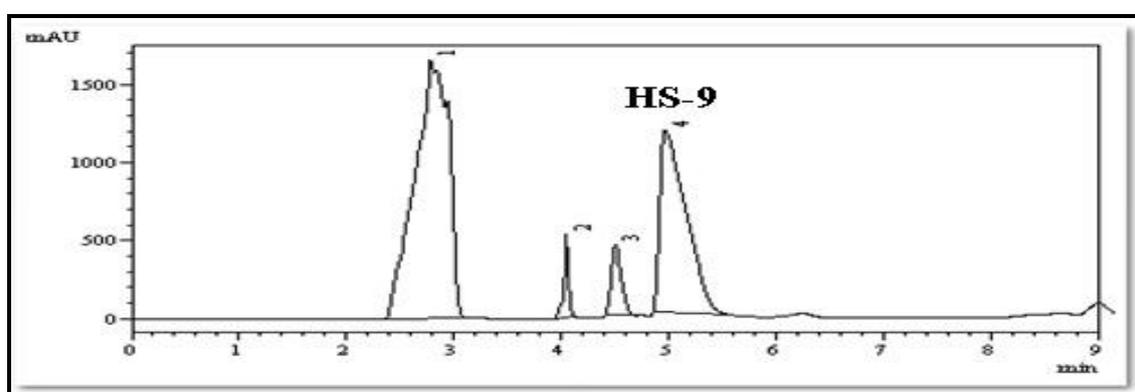
Figura 85 - Cromatograma do isolamento de **HS-8** e **HS-7**.



Ainda nesse experimento, a **f4-8** (73,0 mg) foi submetida novamente ao cartucho C18, o qual foi eluído com MeOH/H₂O 5:5 (f1-16), 6:4 (f17-33) e 100% de H₂O (f34-43), resultando em 43 frações com aproximadamente 5 mL, as frações da coluna foram monitoradas por CCD com detecção com reagente de Dragendorff e reunidas da seguinte forma: f1-4, **f5-10**, f11-16, f17-25 e f26-43.

A subfração **f5-10** (39,5 mg) foi injetada sucessivas vezes (200 μ L) num aparelho de HPLC, equipado com coluna semi-preparativa de fase reversa. A separação foi efetuada empregando-se como fase móvel ACN/H₂O 15% (0,1% de TFA), com fluxo de 4,72 mL/min, com tempo de corrida de 15 minutos. O cromatograma (Figura 86), visualizado na faixa de 210-400 nm, mostrou a separação de 4 picos cujos tempos de retenção foram de 2,8 min (pico 1; 7,5 mg), 4,0 min (pico 2; 1,0 mg), 4,2 min (pico 3; 1,0 mg), **6,1 min (pico 4; 4,1 mg)** sendo o pico 4 correspondente ao composto **HS-9**.

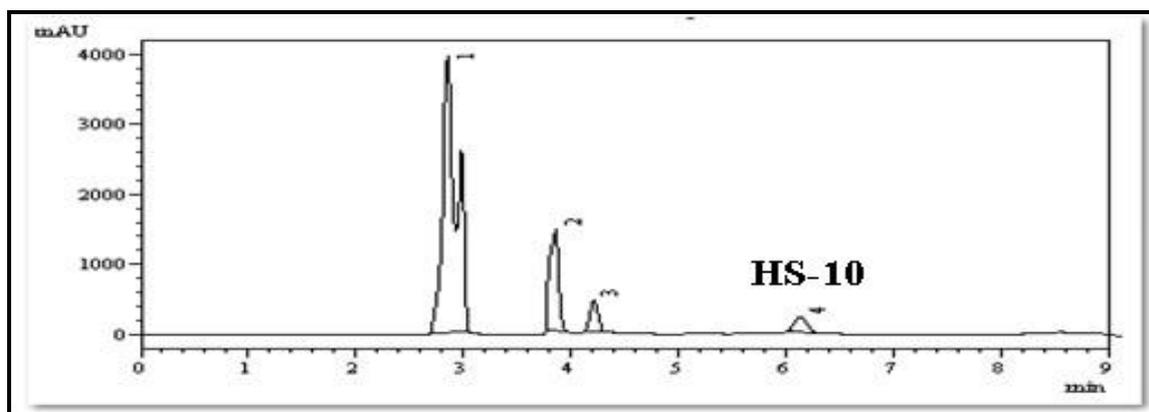
Figura 86 - Cromatograma do isolamento de **HS-9**.



5.4.11 - Fracionamento da fração HP-Fr6-7

O material (83,1 mg) foi inicialmente dissolvido em 2 mL em MeOH/H₂O 5:5 e cromatografada em cartucho de C18, utilizando-se como fase móvel um gradiente de MeOH/H₂O nas proporções 5:5 (f1-19), 6:4 (f20-31) e 100% de H₂O (f32-44), resultando em 44 frações com aproximadamente 5 mL, as frações da coluna foram monitoradas por CCD com detecção com reagente de Dragendorff e reunidas da seguinte forma: f(1-4), f(5-7), f(8-11), **f(12-14)**, **f(15-22)**, f(23-26), f(27-38) e f(39-44). As subfrações f12-14 e f15-22 foram reunidas e selecionadas para ser purificada por HPLC.

A análise por CLAE da subfração **f12-22** (21,4 mg), empregando-se como fase móvel ACN/H₂O 15% (0,1% de TFA), com fluxo de 4,72 mL/min durante 20 minutos e detecção na faixa de 210-400 nm (Figura 87, p. 123), forneceu o composto **HS-10** (pico 4; T_R 4,9 min; 6,4 mg).

Figura 87 - Cromatograma do isolamento de **HS-10**

5.4.12 - Tratamento do composto HS-5.

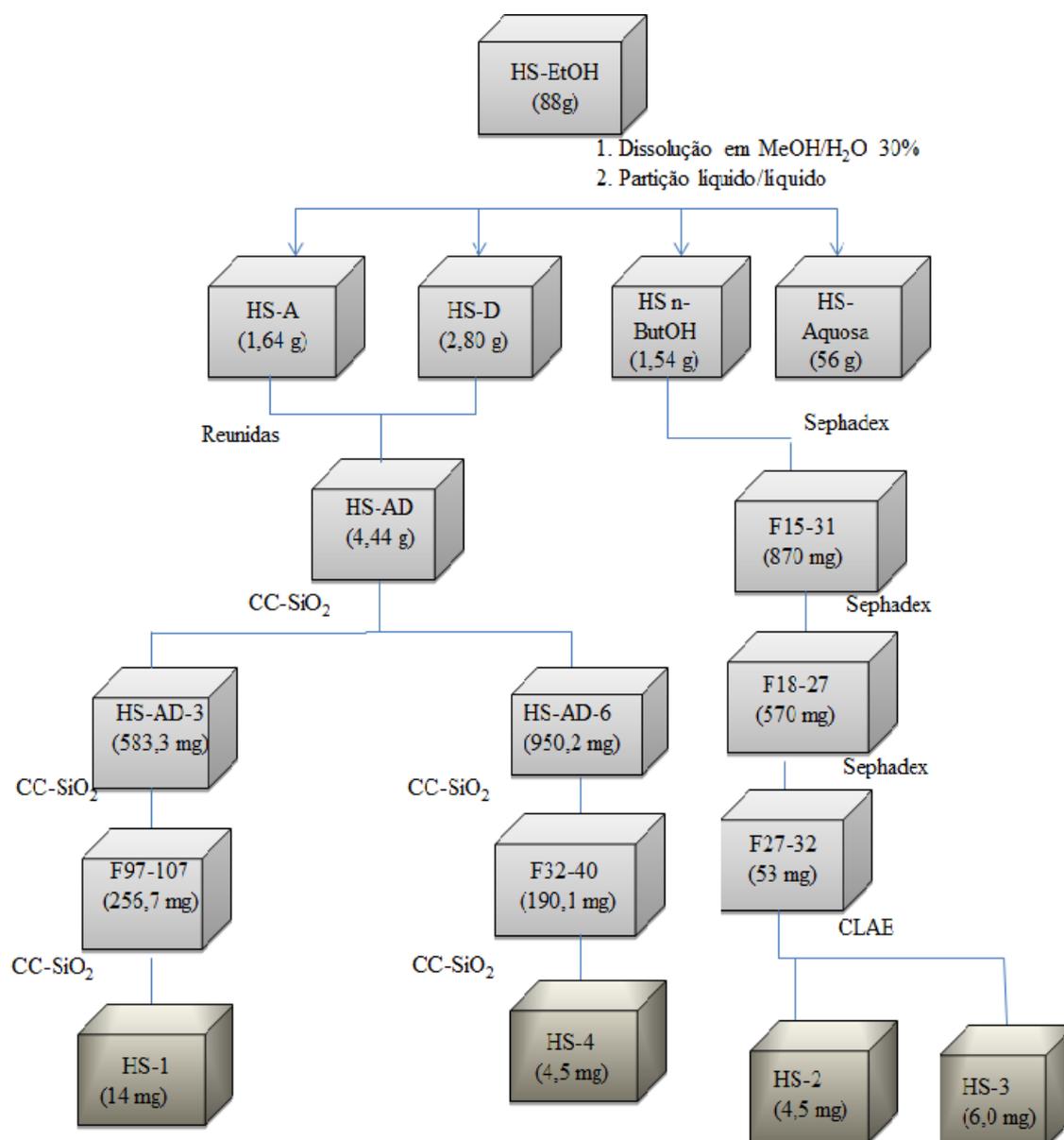
Após identificar a estrutura do composto HS-5, ele foi submetido a tratamento com uma solução básica para efetuar o desprotonamento, visto que foi isolado utilizando ácido trifluoroacético (TFA) e, portanto, encontrou-se protonado devido a reação do nitrogênio básico com o ácido.

23,0 mg do composto HS-5 foram solubilizadas em 1 mL de metanol, e a esta solução foram adicionados, gota a gota, 3 mL de uma solução aquosa de NH_4OH 10 % (v/v), até atingir pH 10. Para garantir o desprotonamento, acrescentou-se 1 mL de base concentrada à solução, a qual foi submetida à extração com 25 mL de AcOEt (4 x 6 mL). A fração orgânica foi lavada com 3 mL de água destilada, sendo, em seguida, seca com Na_2SO_4 anidrido e rotaevaporada, rendendo 19 mg do composto desprotonado.

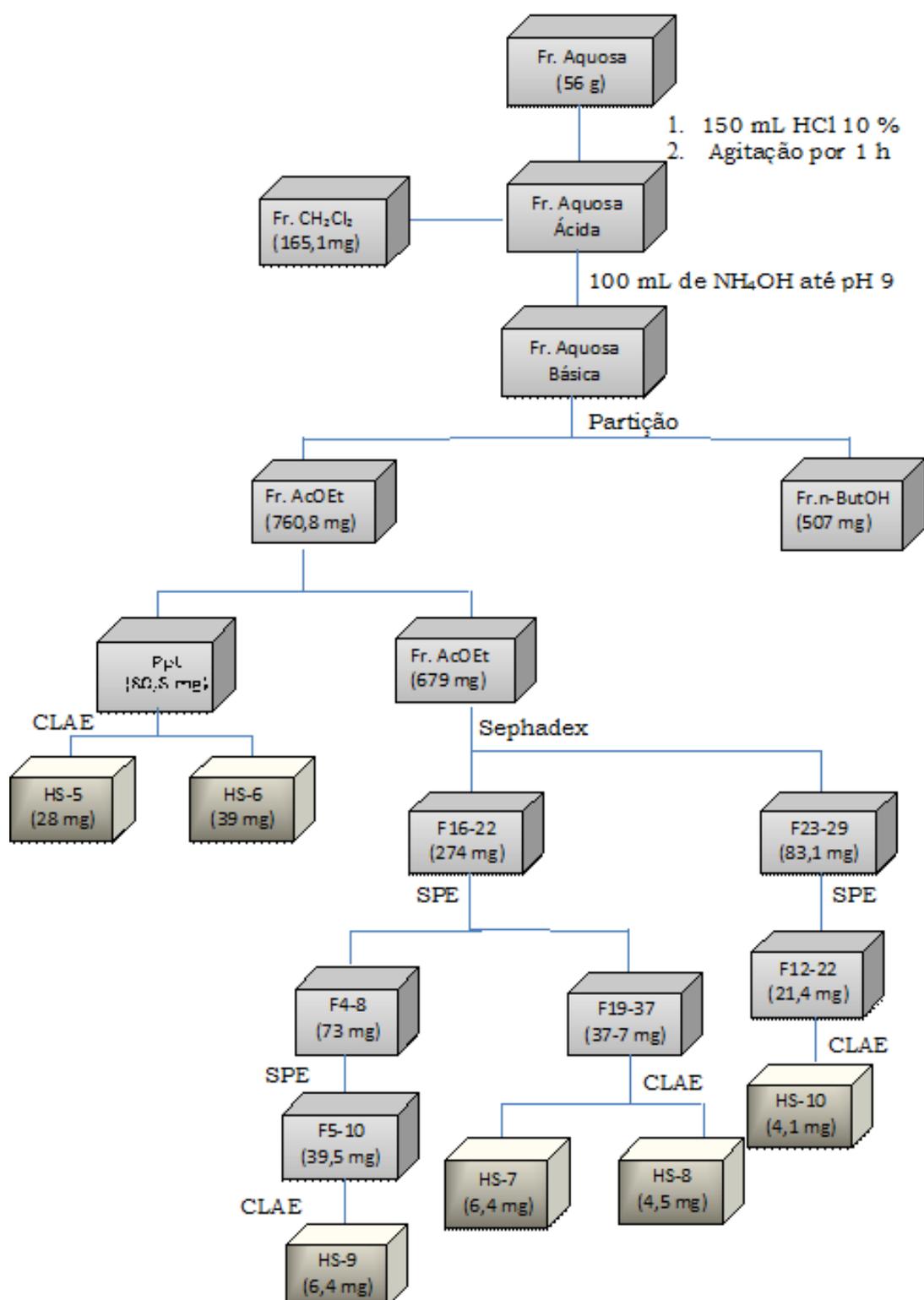
5.5. ENSAIO BIOLÓGICO

Os compostos isolados dos bulbos de *H. Solandriiflorum* foram submetidos a testes preliminares para avaliação da atividade citotóxica, frente a linhagens de células tumorais humanas HCT-116, OVCAR-8, HL-60 e SF-295 no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, sob coordenação da Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo, segundo metodologia descrita por MOSMANN, 1983.

Fluxograma 1 – Metodologia de isolamento das substâncias obtidas das frações do extrato etanólico dos bulbos de *H. solandriflorum*



Fluxograma 2 – Metodologia de isolamento das substâncias obtidas da fração aquosa do extrato etanólico dos bulbos de *H. solandriflorum*



Considerações Finais

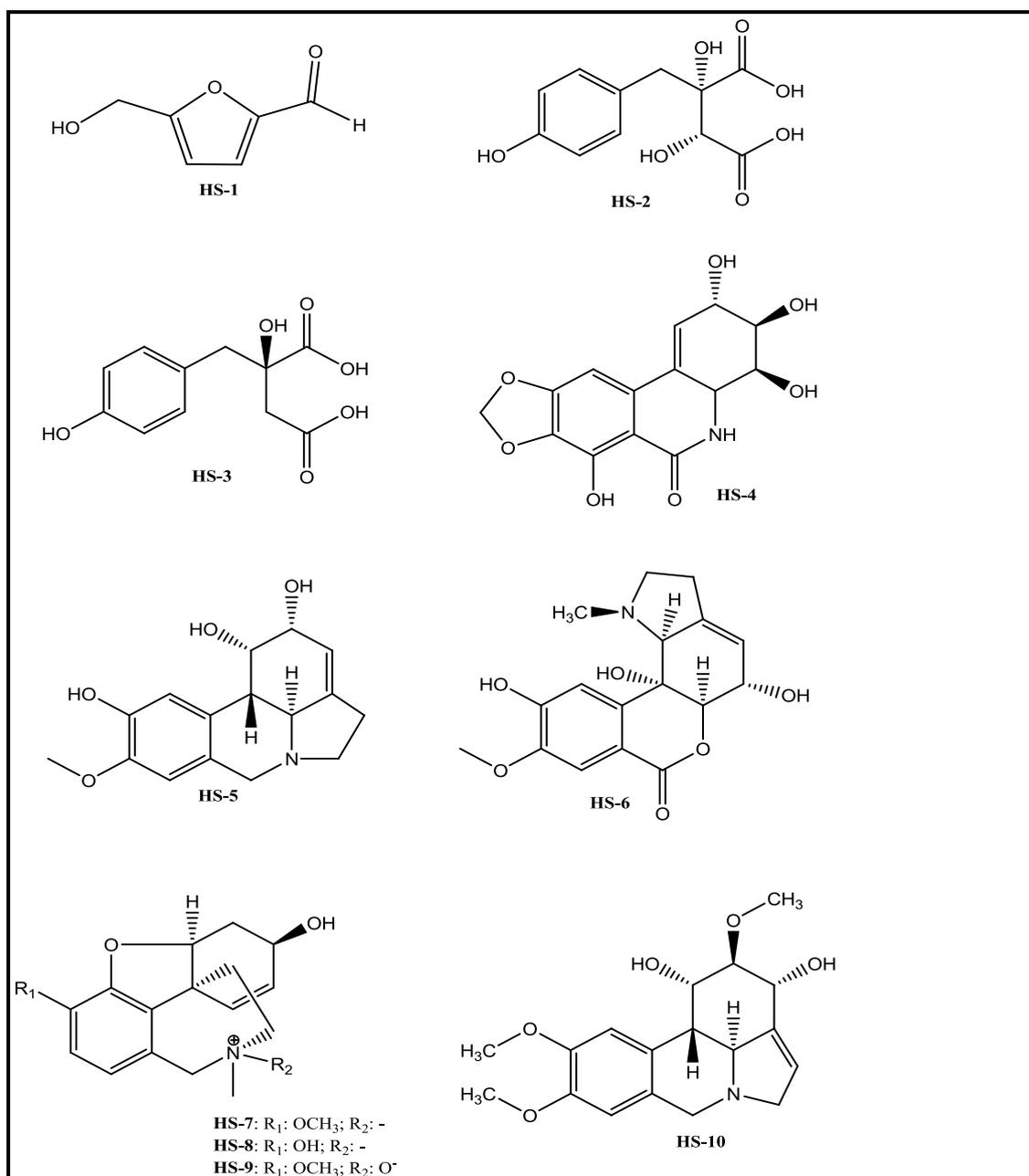
CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção química do extrato etanólico dos bulbos de *H. solandriflorum* resultou no isolamento e caracterização estrutural de dez compostos: um derivado furânico (**HS-1**), dois derivados fenólicos (**HS-2** e **HS-3**), enquanto os demais compostos isolados foram alcalóides isoquinolínicos (**HS-4** a **HS-10**), uma classe de compostos bastante comum, tanto na família Amaryllidaceae como no gênero *Hippeastrum*, (Figura 88, p. 128).

Dentre os compostos isolados um é de caráter inédito na literatura **HS-6** e os demais na espécie estudada. Um levantamento bibliográfico mostrou uma variedade de compostos alcaloídicos que tem sido alvo de muitos estudos devido à grandeza de suas diversidades estrutural e farmacológica (MCNULTY, *et al.*; 2007). Dentre as quais destacam-se atividade antiviral, antitumoral, citotóxica, antioxidante, antimalarial, anti-inflamatório (CITOGLU, *et al.*; 2012). Um levantamento sobre o gênero *Hippeastrum* mostrou que os alcaloides narciclasina (**HS-4**), sanguinina (**HS-8**), galantamina *N*-óxido (**HS-9**) Pseudolicorina (**HS-5**) estão sendo relatados pela primeira vez no gênero, bem como os derivados fenólicos (**HS-2** e **HS-3**) e do furano (**HS-1**) que por sua vez está sendo isolado como produto natural. Os demais compostos galantamina (**HS-7**) e narcissidina (**HS-10**) estão sendo relatados pela primeira vez na espécie. Encontra-se na literatura apenas um trabalho sobre a espécie *solandriflorum* que relata o isolamento de cinco compostos (Licorina (**1**), ismina (**11**), Ungeremina (**13**) hamaina (**14**), vittatina (**41**) Tabela 2, Págx) (BASTIDA, *et al.*; 1996).

Conhecendo o potencial citotóxico dos alcaloides de *Hippeastrum*, todos foram submetidas a teste de atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas de cólon (HCT-116), leucemia (HL-60), ovário (OVCAR-8) e cérebro (SF-295) sendo os alcalóides (**HS-4**) e (**HS-5**) considerados altamente ativos, com valores de IC₅₀ de 0,05 µM para o composto (**HS-4**) e 1 µM para (**HS-5**).

Figura 88 – Estruturas dos compostos isolados de *H. solandriflorum*



Referências

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER K.; EVIDENTE, A. Biology and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. **Chem Ver**, v. 108(6), p. 1982–2014, 2008.
- ALI, A. A.; MESBAH, M. K.; FRAHM, A. W. Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. Part IV: Stereochemistry of pancracine, the first 5,11-methanomorphanthridine alkaloid from *Hippeastrum* – structure of hipagine. **Planta Medica**, v. 50, n. 2, p. 188-189, 1984.
- AMARASEKARA, A. S.; WILLIAMS, L. D.; EBEBE, C. Mechanism of the dehydration of d-fructose to 5-hydroxymethylfurfural in dimethyl sulfoxide at 150 C: an NMR study. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 3021-3024, 2008.
- ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVEIRA, L.; GIUO, Y.; BERKOV, S.; REYES-CHILPA, R.; AMRANI, A. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; CPDINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptatum*. **Phytochemistry**, 103, p. 188-195, 2014.
- BASTIDA, J.; CODINA, C.; PORRAS, C. L.; PAIZ, L., Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum*. **Planta Medica**, 62 p. 74-75, 1996.
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloid In: CORDELL, G. A. (Ed.) **The alkaloids: Chemistry and Physiology**. San Diego: Academic Press INC, v. 63, p. 87-179, 2006.
- BASTIDA, J.; LLABRÉS, J. M.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C., SERRANO, M.; RUBIRALTA, M.; FELIZ, M.; Dubiusine from *Narcissus dubius*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3657-3660, 1988.
- BERKOV, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Analysis of galanthamine-type alkaloids capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 285-293, 2008.
- BOIT, H. G. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VI. The alkaloids of *Nerine sarniensis*, *Crinum moorei*, *Hippeastrum vittatum* and *Clivia miniata*. **Chemical Beriche**, v. 87, p.1704-1707, 1954.
- BOIT, H. G. Amaryllidaceae Alakloids. XI Alkaloids of *Chilidanthus fragrans*, *Valotta purpurea*, *Nerine undulate*, and *Hippeastrum vittatum*. **Chemical Berichte**, v. 89, p. 1129-1134, 1956.

- BRADSHAW, J.; BUTINA, D.; DUNN, A. J.; GREEN, R. H.; HAJEK, M.; JONES, M. M.; LINDON, J. C.; SIDEBOTTOM, P. J. A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1541-1544, 2001.
- BRUNETON, J. Farmacognosia: Fitoquímica – Planta Medicinales, ed. 2, Zaragoza: Acribia S. A, p.1099, 2001.
- CABEZAS, F.; RAMIREZ, A.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Eucharis amazônica* (Amaryllidaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 3, p. 315-317, 2003.
- CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Cytotoxic a and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v. 64, p. 91-93, 1998.
- CASTILHOS, R. S. Investigação química em *Habranthus erectus* Ravenna e *Rhodophiala bífida* (Herb) Traub (Amaryllidaceae) e avaliação biológica in vitro do alcaloide montanina. Porto Alegre: UFRGS. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, 2004 (Dissertação de Mestrado).
- CASTILHOS, R. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. A. Avaliação *in vitro* das atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcaloide montamina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 209-214, 2007.
- CERIOTTI, G. Narciclasine: an antimitotic substance from *Narcissus* bulbs. **Nature**, v. 213, 595 – 596, 1967.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BESTTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.
- DAHLGREN, R. M.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons: Structure, evolution, and taxonomy**. Berlin: Springer- Verlag, p. 520, 1985.
- DOPKE, W.; BIENERT, M. Alkaloids from Amaryllidaceae; the structure of oduline. **Pharmazie**, v. 21,n. 5, p. 323-324, 1966.
- DOPKE, W.; PHAM, L. H.; GRUNDEMANN, E.; BARTOSZEK, M.; FLATAU, S. Alkaloids from *Hippeastrum equestre*; Part I: Phamine, a new phenanthridone alkaloid. **Planta Medica**, v. 61, p. 564-566, 1995.
- DUTILH, J. H. A. Investigação citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb. São Paulo: Campinas. (Dissertação de Mestrado), 1987.

- ELCHHORN, J.; TAKARA, T.; KITA, Y.; ZENK, M. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1037-1047, 1998.
- ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; MORRIS, C.; STADEN, J. van. Variation among three *Crinum* species in alkaloids content. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 601-615, 2003.
- ELGORASHI, E. E.; MALAN, S. F.; STAFFORD, G. I.; STADEN, J. van. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 224-231, 2006.
- ELGORASHI, E. E.; STADEN, J. van. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 27-32, 2004.
- EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ABOU-DONIA, A. H.; TOUEMA, S. M.; HAMMODA, H. M.; SHAWKY, E.; MOTTA, A. (-)Amarbelisina, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis beladona* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2113-2118, 2004.
- EVIDENTE, A.; Narciclasine: ^1H - and ^{13}C -NMR data and a new improved method of preparation. **Planta Medica**. v. 57, p.293-295, 1991.
- FABRIS, H. A. Pteridófitas, Gmnospermas y Monocotiledoneas (excepto Gramineas). In: CABRERA, A. L. **Flora de La Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires: Collection Cient INTA**, v. 1, p. 531-534, 1968.
- FENNEL, C. W.; STADEN, J. V. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 15-26, 2001.
- GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2141-2156, 1985.
- GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2141-2156, 1985.
- GIORDANI, R. B.; ANDRADE, J. P.; VERLI, H.; DUTILH, J. H.; HENRIQUES, A. T.; BERKOV, S.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Hippeastrum morelium* Lem. (Amaryllidaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 668-672, 2011.
- HARTWELL, J. L. Plants used against cancer. A Survey. **Lloydia**, v. 30, p. 379-393, 1967.
- HARVEY, A. L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 113-128, 1995.

- HEINRICH, M.; TEOH, H. L Galanthamine from snow drop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian know ledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, 147-162, 2004.
- HOFMANN JUNIOR, A. E.; SEBBEN, C.; SOBRAL, M.; DUTILH, J.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Alkaloids from *Hippeastrum glaucescens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1455-1456, 2003.
- HOSHIO, O. The Amaryllidaceae alkaloid. In: CORDELL, G. A. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Londres: Academic Press INC., v. 51, p. 323-417, 1998.
- HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEGBULUGBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian Crinum species. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2893-2896, 2004.
- HUANG Sheng-Dian, ZHANG, Y.; HE, Hong-Ping; LI, Shi-Fei; TANG Gui-Hua, CHEN Duo-Zhi, CAO Ming-Ming, DI Ying-Tong, HAO Xiao-Jiang. A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.11(4) p. 0406-0410, 2013.
- JIN, S. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*, v. 22, p. 111-126, 2004.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**, ed. 13. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.
- KIHARA, M.; KONIDHI, K.; XU, L.; KOBAYASHI, S. Alkaloidal constituents of the flowers of *Lycoris radiata* Herb. (Amaryllidaceae). **Chem. Pham. Bull**, v. 39, p. 1849-1853, 1991.
- KOBAYASHI, S.; SATOH, K.; NUMATA, A.; SHINGU, T.; KIHARA, M. Alkaloid N-oxides from *Lycoris sanguinea*. **Phytochemistry**, v.30, p. 675-677, 1991.
- KOORBANALLY, N.; MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N. Alkaloids and triterpenoids from *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v. 54, p. 93-97, 2000.
- LABRANA, J.; MACHOCHO, A. K.; KRCSFALUSY, V.; BRUN, R.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *Transcarpathicus* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v. 60, p. 847-852, 2002.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1331-1338, 1993.

- LLABRÉS, J. M.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C., SERRANO, M.; RUBIRALTA, M.; FELIZ, M.; Two alkaloids from *Narcissus requienii*. **Phytochemistry**, v. 25 p. 1453-1459, 1986.
- LOPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Science**, n. 71, p. 2521-2529, 2002.
- MACHOCHO, A. K.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BRUN, R.; CHHABRA, S. C. Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3143-3149, 2004.
- MARTIN, S. F. The Amaryllidaceae alkaloids. In: BROSSI, A. (Ed). **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. San Diego: Academic Press INC, v. 30, cap. 3, p. 251-376, 1987.
- MERROW, A. W.; FAY, M. F.; GUY, C. L.; LI, Q.; ZAMAN, F. Q.; CHASE, M. W. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistics analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 9, p. 1325-1345, 1999.
- OKPO, S. O.; ADEYEMI, O. O. Effects of *Crinum glaucum* aqueous extract on intestinal smooth muscle activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 413-416, 1998.
- PACHECO, G. R.; DEL, C. P.; SILVA, M. J.; SAMMES, P. G.; WATSON, W. H. Chemical study of Chilean Amaryllidaceae. II. New alkaloids from *Hippeastrum ananuca* Phil. **Boletín Sociedad Chilean Química**, v. 27, n.2, p.289-290, 1982.
- PACHECO, G. R.; DEL, C. P.; SILVA, M. J.; SAMMES, P. G.; WATSON, W. H. Chemical study of Chilean Amaryllidaceae. II. New alkaloids from *Hippeastrum ananuca* Phil. **Boletín Sociedad Chilean Química**, v. 27, n. 2, p. 289-290, 1982.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4ed. (tradução), São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2010.
- PHAM, L. H.; GRUNDEMANN, E.; DOPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. (Amaryllidaceae) Part III. **Pharmazie**, v. 52, n.2, p. 160-163, 1997.
- PHAM, L. H.; GRUNDEMANN, E.; WAGNER, J.; BARTOSZEK, M.; DOPKE, W. Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.; 3-O-demethyltazettine and egonine. **Phytochemistry**, v. 51, p.327-332, 1999.
- QUIRION, J.; HUSSON, H. (-)-3-o-acetylnarcissidine, a new alkaloid from *Hippeastrum puniceum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 1112-1114, 1991.

- RAO, K. R. V.; NAZAR, A.; VIMALADEVI, R. Phytochemical studies from *Hippeastrum johnsonii* bulbs. **Indian Journal Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 56-58, 1971.
- RAO, K. R. V.; VIMALADEVI, R. Crystalline alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. **Planta Medica**, v. 21, n. 2, p. 142-143, 1972.
- RATNASOORIYA, W. D.; DERANIYAGALA, S. A.; BATHIGE, S. D. N. K.; HETTIARACHCHI, H. D. I. Leaf extract of *Crinum bulbisperminum* has antinociceptive activity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 123-128, 2005.
- RUSSO, P.; FRUSTACI, A.; BUFALO, D.; FINI, M.; CESARIO, A. From traditional European Medicine to Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Dementia and Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 976-983, 2013.
- SENNER, B.; KOYUNCU, M.; BINGOL, F.; MUHTAR, F. Production of bioactive alkaloids from Turkish. **Pure and applied Chemistry**, v. 70, p. 2131-2136, 1998.
- SENNER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. **Phytoterapy Research**, v. 17, p. 1220-1223, 2003.
- SIMMLER, C.; ANTHEAUME, C.; ANDRÉ, P.; BONTÉ, F.; LOBSTEIN, A.; Glucosyloxybenzyl Eucomate derivatives from *Vanda teres* stimulate HaCat cytochrome c oxidase. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 949-955, 2011.
- TAKAHIRA, M.; KUSANO, A.; SHIBANO, M.; KUSANO, G.; MIYASE, T.; Piscidic acid and fukiic acid esters from *Cimicifuga simplex*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2115-2119, 1998.
- TRAM, N. T. N.; TITORENKOVA, T. V.; BANKOVA, V. S.; HANDJIEVA, N. V.; POPOV, S. S. *Crinum L.* Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 83-2008, 2002.
- TSAKADZE, D. M. SAMSONIYA, S. A.; ZIAEV, R.; ABDUSAMATOV, A. Alkaloid and phenolic compounds of *Galanthus caucasicus*, *Magnolia obovata*, *Cocculus laurifolius*, and *Veratrum lobelianum* grown in Georgia. **Molecular Diversity**, v. 9, p. 41-44, 2005.
- UNVER, N.; GOZLER, T.; WALCH, N.; GOZLER, B.; HESSE, M. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *Byzantinus* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v. 50, p. 1255-1261, 1999.
- VAN GOIETSENOVEN, G.; MATHIEU, V.; LEFRANC, F.; KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryrls are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. **Med. Res. Rev.**, v. 33, p. 439-455, 2013.

WENINGER, B.; ITALIANO, L.; BECK, J. P.; BASTIDA, J.; BERGONON, S.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta Medica**, v. 61, p. 77-79, 1995.

WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: MANSKE, R. H. F. **The alkaloids: Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press INC., v. 6, cap. 9, 289-412, 1960.

WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: MANSKE, R. H. F. **The alkaloids: Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press INC., v. 11, cap. 10, p.307-404, 1968.

WILDMAN, W. C.; FALES, H. M.; BATTERSBY, A. R. Biosynthesis in the Amaryllidaceae. The incorporation of 3-C¹⁴ -tyrosine in *Sprekelia formosissima*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 20, n.4, p. 681-682, 1962.

WILDMAN, W. C.; OLESEN, B. Biosynthesis of montanine. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communication**, p. 551, 1976.

YOUSSEF, D. T. A.; KHALIFA, A. A. Cytotoxic quaternary alkaloids from the flowers of *Narcissus tazetta*. **Pharmazie**, v. 56, p. 818-822, 2001.