



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

JOSÉ RÉGIS DE PAIVA

ESTUDO DOS ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE E SUA CORRELAÇÃO
COM A ATIVIDADE ANTI-ACETILCOLINESTERASE

FORTALEZA

2019

JOSÉ REGIS DE PAIVA

ESTUDO DOS ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE E SUA CORRELAÇÃO NA
ATIVIDADE ANTI-ACETILCOLINESTERASE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Professora Dra. Otilia Deusdênia
Loiola Pessoa.

Coorientador: Pesquisador Dr. Kirley Marques
Canuto.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P168e Paiva, José Régis de.
Estudo dos alcaloides de amaryllidaceae e sua correlação na atividade anti-acetilcolinesterase / José Régis de Paiva. – 2019.
146 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.
Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto.

1. Amaryllidaceae. 2. Hippeastrum. 3. Griffinia. 4. Galantamina. 5. Acetilcolinesterase. I. Título.

CDD 540

JOSÉ RÉGIS DE PAIVA

ESTUDO DOS ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE E SUA CORRELAÇÃO NA
ATIVIDADE ANTI-ACETILCOLINESTERASE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Kirley Marques Canuto (coorientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. Nirla Rodrigues Romero
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Antônia Fádía Valentim de Amorim
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, José Regino e Maria Socorro.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida. Aos meus pais, José Regisno e Maria Socorro, por todo amor e dedicação para comigo, pessoas que tenho imenso orgulho de ter como pais, fundamentais para a conclusão desse trabalho, pessoas que me ensinaram os princípios da dignidade e honestidade, agradeço também por todo o esforço para me oferecer a melhor educação e por sempre acreditar e confiar no meu potencial.

Ao meu irmão, Regilane. Bem como os demais membros da minha família por todo o apoio oferecido a mim.

A minha namorada Jéssica, por ter me dado apoio incondicional e indescritível, amor, carinho e atenção.

Ao Dr. Kirley Marques Canuto, meu coorientador, pela orientação, pela oportunidade, pela disponibilidade e apoio de forma absoluta e irrestrita, sua imensa disponibilidade e paciência, sendo literalmente um exemplo de profissional a ser seguido.

A Professora Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, minha orientadora que me acolheu como aluno quando eu mais precisava e acreditou em minha capacidade, por todo o empenho para que minha aprendizagem fosse plena e não medir esforços para que este trabalho fosse realizado.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, pelo apoio e orientação na área de química analítica e por ter me dado a oportunidade de continuar meu trabalho pelo oferecimento de uma bolsa de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, pela disponibilidade e por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo bastante para melhoria do mesmo, principalmente no Exame de Qualificação.

A Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo, pela disponibilidade, pela contribuição com o presente trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora.

A Profa. Dra. Nirla Rodrigues Romero, pela disponibilidade, pela contribuição com o presente trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora.

A Profa. Dra. Antônia Fadia Valentim de Amorim, pela disponibilidade, pela contribuição com o presente trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora, por ter contribuído com minha formação no tempo da graduação na UECE. Aos meus companheiros do LMQPN pelas horas de descontração, amizade

e grandes momentos de aprendizagem: Jhone, Camila Mota, Carol, Erbenia, Fátima, Kaline, Liana, Licia, Marcelo, Oiram, Bruno e Sheila.

A colaboração do Francisco das Chagas na caracterização química e nos mecanismos de fragmentações.

A Dra. Andrielle Câmara Amaral Lopes da Embrapa Recursos Genéticos (Brasília-DF) pelo fornecimento dos bulbos da coleção de Amaryllidaceae.

A Dra. Rita de Cássia Souza Dias pela excelente condução do estudo agrônomo, das Amaryllidaceae, a qual foi essencial na conclusão deste trabalho.

A Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade pela supervisão dos ensaios ex vivo da atividade antiacetilcolinesterase nos extratos de Amaryllidaceae e a bolsista Juliete Tavares pela realização dos ensaios.

A Profa. Dra. Selene Maia de Moraes pela supervisão dos ensaios in vitro da atividade antiacetilcolinesterase nos extratos de Amaryllidaceae e a bolsista Daniela Ribeiro Alves pela realização dos ensaios.

A Embrapa Agroindústria Tropical, pelo suporte e apoio na realização das atividades de pesquisa deste trabalho, em especial, aos membros do LMQPN, Lorena Mara, Tigressa e Paulo Riceli e Edy Brito que contribuíram e sempre se prontificaram a ajudar ativamente para a execução desse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), onde passei boa parte do tempo durante o curso, sendo a mesma como uma segunda casa, onde adquiri bastante conhecimento apesar das enormes dificuldades. Além de todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A Embrapa Agroindústria Tropical pelo financiamento das atividades de pesquisa por meio do projeto de código 03.14.01.007.00.00.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton.

RESUMO

A família Amaryllidaceae é caracterizada pela grande ocorrência de alcaloides isoquinolínicos denominados alcaloides de Amaryllidaceae (AA), os quais possuem importância quimiotaxonômica e biológica. Os AA destacam-se pela ação inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é um importante alvo terapêutico para tratamento do mal de Alzheimer. Galantamina (GAL), um fármaco de uso clínico para essa finalidade, é o principal representante dessa classe química, sendo obtido principalmente de fontes botânicas que ocorrem ou são cultivadas em regiões temperadas. Esse alcaloide foi previamente relatado em *Hippeastrum elegans*, uma amarilidácea nativa da Caatinga, onde é conhecida como açucena e usada para fins ornamentais. O presente trabalho teve como objetivo investigar potenciais fontes tropicais de galantamina e de outros AA bioativos, determinando-se as composições químicas de bulbos de uma Coleção de Amarilidáceas da Embrapa (CAE) e de *H. elegans* cultivados, correlacionando-as com a atividade antiAChE. Nosso estudo consistiu dos seguintes experimentos: (I) desenvolvimento e validação de um método de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-ESI-QTOF e UPLC-QDA) e análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) para identificação de AA e quantificação dos alcaloides GAL, pseudolicorina (PSE), narciclasina (NAR) e sanguinina (SAN) em 67 extratos da CAE (espécies de *Habranthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes* e *Griffinia*) bem como de seis extratos de *H. elegans* colhidos em seis épocas (150, 210, 270, 330, 390 e 450 dias de cultivo) (II) ensaios *in vitro* e *ex vivo* de atividade inibitória de AChE dos referidos extratos. Além disso, os dados de UPLC-ESI-QTOF e RMN foram analisados por análise quimimétrica de regressão parcial por mínimos quadrados (PLS) para identificação de biomarcadores. Os alcaloides foram extraídos de bulbos secos e moídos (100 mg) usando microextração líquido-líquido (hexano/ $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$) seguida de extração em fase sólida em cartuchos de troca catiônica. O método de quantificação por UPLC-QDA mostrou boa linearidade ($R \geq 0,9968$), seletividade, sensibilidade (LOD: 5-100 ng/mL e LOQ: 20-350 ng/mL), repetibilidade (CV= 1,3-8,4% para precisão intradia e interdia) e limites de recuperação aceitáveis (87,5-96,2%), exceto para narciclasina. Na avaliação da CAE, os extratos de *Hippeastrum* apresentaram os maiores teores de SAN, PSE, NAR, enquanto os de *Griffinia* os maiores teores de GAL. As maiores atividades anti-AChE foram observadas para os gêneros *Habranthus*, *Hippeastrum* e *Griffinia*. Quanto à investigação do tempo de colheita, verificou-se que *H. elegans* foi rico em PSE e NAR, alcançando maiores teores em 270 e 390 dias de cultivo, respectivamente. No entanto, as maiores atividades anti-AChE foram

observadas para bulbos de 450 dias. As análises de PLS indicaram a PSE como composto discriminante para este extrato, portanto responsável por sua maior atividade anti-AChE juntamente com os conhecidos inibidores de AChE GAL e SAN. Assim, nosso estudo indica que espécies de *Griffinia* e *H. elegans* são fonte promissoras de AA bioativos. No entanto, são necessários estudos agronômicos de melhoramento genético e de desenvolvimento de sistema de produção para torná-las materiais comercialmente competitivos com suas congêneres cultivadas em países de clima temperado.

Palavras-chave: Amaryllidaceae. *Hippeastrum*. *Griffinia*. Alcaloides. Galantamina. UPLC-MS. RMN ¹H. Acetilcolinesterase. Regressão parcial por mínimos quadrados.

ABSTRACT

The Amaryllidaceae family is characterized by the high occurrence of isoquinoline alkaloids so-called Amaryllidaceae alkaloids (AA), which have chemotaxonomic and biological importance. AA stands out for the inhibitory action on the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which is an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease. Galantamine (GAL), a clinical drug used for this purpose, is the main representative of this chemical class, being obtained mainly from botanical sources that occur or are cultivated in temperate regions. Such alkaloid was previously reported in *Hippeastrum elegans*, an Amaryllidaceae species native to the Caatinga, where it is known as açucena and used for ornamental purposes. The present work aimed to investigate potential tropical sources of galantamine and other bioactive AA, by evaluating the chemical compositions of bulbs from the Embrapa Collection of Amaryllidaceae (ECA) and cultivated *H. elegans*, then correlating them with their antiAChE activity. Our study consisted of the following experiments: (I) development and validation of an ultra-efficient liquid chromatography method coupled to mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF and UPLC-QDA) and Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) analysis for identification AA and quantification of the alkaloids GAL, pseudochlorine (PSE), narciclasin (NAR) and sanguinine (SAN) in 67 extracts from ECA (*Habranthus*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes* and *Griffinia* species) as well as six extracts from *H. elegans* bulbs harvested in six harvest times (150, 210, 270, 330, 390 and 450 days of cultivation); (II) evaluation *in vitro* and *ex vivo* AChE inhibitory activity assays for the aforementioned extracts. In addition, the UPLC-ESI-QTOF and NMR data were analyzed by chemometrics analysis based on partial least squares regression (PLS) to identify biomarkers. Thus, the alkaloids were extracted from dry and ground bulbs (100 mg) using liquid-liquid microextraction (hexane/ CH_3OH - H_2O) followed by solid phase extraction in cation exchange cartridges. The UPLC-QDA quantification method showed good linearity ($R \geq 0.9968$), selectivity, sensitivity (LOD: 5-100 ng / mL and LOQ: 20-350 ng / mL), repeatability (CV = 1.3- 8.4% for intraday and interday precision) and acceptable recovery limits (87.5-96.2%), except for narciclasin. In the ECA evaluation, the *Hippeastrum* extracts showed the highest levels of SAN, PSE, NAR, while those of *Griffinia* showed the highest levels of GAL. The greatest anti-AChE activities were observed for the *Habranthus*, *Hippeastrum* and *Griffinia* extracts. Regarding the investigation of harvest time, *H. elegans* was found to be rich in PSE and NAR, reaching higher levels at 270 and 390 days of cultivation, respectively. However, the greatest anti-AChE activities were observed for 450-day bulbs. PLS analyses indicated PSE as a discriminating

compound for this extract, therefore it was pointed out as responsible for its greater anti-AChE activity along with the known AChE inhibitors GAL and SAN. Accordingly, our study indicates that *Griffinia* species and *H. elegans* are promising sources of bioactive AA. However, agronomic studies for genetic breeding and production system development are necessary to make them commercially competitive materials with their congeners grown in temperate countries.

Keywords: Amaryllidaceae. *Hippeastrum*. *Griffinia*. Alkaloids. Galantamine. UPLC-MS. ¹H NMR. Acetylcholinesterase. Partial least squares regression.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação de alcaloides de Amaryllidaceae em grupos de acordo com suas semelhanças estruturais	33
Quadro 1 – Amaryllidaceae coletadas com seus respectivos locais de coleta e massas frescas e secas de bulbos	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura molecular dos alcaloides isoquinolínicos, morfina, codeína, papaverina, galantamina, emetina e hisdrastina (SIMÕES, 2017)	27
Figura 2	– Propostas de vias biossintéticas para alcaloides representativos de Amaryllidaceae e as classes de enzimas destacadas em azul.....	28
Figura 3	– Distribuição de plantas endêmicas da família Amaryllidaceae no mundo	30
Figura 4	– Diversidade de gêneros de Amaryllidaceae. A: <i>Narcissus</i> , B: <i>Grifínia</i> , C: <i>Lycoris</i> , D: <i>Crinum</i> , E: <i>Hippeastrum</i> , F: <i>Worsleya</i>	30
Figura 5	– Diversidade de gêneros de Amaryllidaceae no Brasil	31
Figura 6	– Estrutura dos padrões de alcaloides: (1) galantamina, (2) sanguinina, (3) pseudolicorina, (4) narciclasina	53
Figura 7	– Cromatograma dos padrões pelo método PDA exploratório de 210 a 900 nm.	54
Figura 8	– Esquema resumido ilustrando o experimento agrônômico	59
Figura 9	– <i>Hippeastrum elegans</i> (açucena) em canteiro da Embrapa Agroindústria Tropical, data do registro 09 de janeiro de 2017	60
Figura 10	– Beneficiamento de açucena com bulbo, raízes e folhas. (a) Material fresco, (b) material fatiado e fresco, (c) material fatiado e seco.....	60
Figura 11	– Sistema UPLC-QTOF-MS ^E utilizado no trabalho	63
Figura 12	– Sistema UPLC-QDA utilizado no trabalho	64
Figura 13	– Ilustração do processo de microextração	66
Figura 14	– Extração em ultrassom e preparo de amostra por partição líquido-líquido	68
Figura 15	– Fluxograma com a disposição dos tratamentos (T ₁₋₆) replicatas (R ₁₋₅ e P ₁₋₄) e amostra composta (R ₁₋₅ , P ₁₋₄)	75
Figura 16	– Áreas de picos de alcaloides extraídos dos bulbos de <i>Hippeastrum elegans</i> usando três métodos de extração	79

Figura 17	– Cromatogramas no modo SIM dos alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina para os três métodos de extração: microextração sólido-líquido (MESL), microextração sólido-líquido seguido de extração em fase sólida (MESL/SPE) e extração líquido-líquido (ELL).....	80
Figura 18	– Cromatogramas de UPLC-SIM-MS dos padrões de alcaloides e amostras exibidas de acordo com seus respectivos íons quantitativos (m/z e intervalo de tempo): (A) <i>Habranthus cf. irwinianus</i> Ravena; (B) <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb.; (C) <i>Griffinia nocturna</i> Ravenna e (D) <i>Hippeastrum elegans</i>	81
Figura 19	– Gráficos de resíduo das curvas de calibração de galantamina, pseudolicorina, sanguinina e narciclasina ao longo dos eixos das concentrações	82
Figura 20	– Teores de alcaloides (μg de alcaloide por grama de bulbo) em épocas de colheita em dias para galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina	86
Figura 21	– Teor total de alcaloide (mg) em dias de cultivo	87
Figura 22	– Cromatogramas UPLC-q-TOF-MS / MS de extratos de bulbos de <i>Hippeastrum elegans</i> (A-F) 150 a 450 dias, utilizados para a análise de alcaloides	90
Figura 23	– Compostos identificados em extratos de <i>Hippeastrum elegans</i> por UPLC-QTOF-MSE: isopseudolicorina (1), pseudolicorina (2), licorina (3), sanguinina (5), galantamina (6), narcissidina (7), montamina (8) e narciclasina, composto esse que sai na etapa de <i>clean up</i>	92
Figura 24	– (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para isopseudolicorina (1, $t_R = 0,919$ min)	93
Figura 25	– (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para pseudolicorina (2, $t_R = 1,682$ min)	94
Figura 26	– (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para o licorina (3, $t_R = 2,039$ min)	95
Figura 27	– (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para a sanguinina.....	96

	(5, $t_R = 2,401$ min)	
Figura 28	– (A) O espectro MS/MS e (B) fragmentação proposta para galantamina (6, $t_R = 2,487$ min)	96
Figura 29	– (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para a narcissidina (7, $t_R = 3,275$ min)	97
Figura 30	– (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para a montanina (8, $t_R = 3,545$ min)	98
Figura 31	– Diagrama de inibição da AChE em experimentos <i>in vitro</i> nos períodos de coleta com destaque ao período que foi diferenciado no teste de Tukey's.....	100
Figura 32	– Diagrama de inibição da AChE em experimentos <i>ex vivo</i> para extratos alcaloídicos de <i>H. elegans</i> em diferentes épocas de colheita: 150, 210, 270, 330, 390 e 450, com destaque ao período que foi diferenciado no teste de Tukey's	102
Figura 33	– Respostas estatísticas da modelagem por PLS para dados UPLC-MS usando a atividade inibidora da acetilcolinesterase <i>in vitro</i> (AChE) como variáveis categóricas (coluna Y): a) variância capturada de acordo com o número f LV; b) erros de RMSEC e RMSECV com base no número f LV; c) valores de atividade anti-AChE medido (real) × predito pelo modelo de validação cruzada; d) Cargas de LV1 dos compostos fortemente indicados como compostos biomarcadores para a atividade anticolinesterase.....	103
Figura 34	– Respostas estatísticas da modelagem por PLS para dados de RMN usando o: valores da atividade inibidora da acetilcolinesterase <i>in vitro</i> (AChE) como variáveis categóricas (coluna Y): a) variância capturada de acordo com o número fLV; b) erros RMSEC e RMSECV baseados no número fLV; c) valores da atividade anti-AChE medida (real) × predita para o modelo de validação cruzada; d) cargas de LV1 dos compostos fortemente indicados como compostos biomarcadores contra a atividade anticolinesterase	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Grupo dos principais tipos de alcaloides com alguns representantes e seus respectivos núcleos	26
Tabela 2	– Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC50 (μM) em ensaios <i>in vitro</i> com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências	39
Tabela 3	– Massa exata dos padrões galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina (UPLC-QTOF-MS) e íons de monitoramento correspondentes com janelas de tempo (UPLC-QDA-SIM)	62
Tabela 4	– Gradientes estabelecidos em UPLC-QTOF e UPLC-QDA: 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B)	64
Tabela 5	– Dados estatísticos dos quatro alcaloides quanto, as curvas de calibração, coeficientes de correlação (r), linearidade, $T_{\text{calculado}}$ em relação ao coeficiente angular (b) e linear (a) para $T_{\text{calculado}}$ 0,68; F de significância da regressão linear e F_{crit} da distribuição Snedecor para 1 grau de liberdade (Gl) no numerador e $n - 2$ graus de liberdade no denominador, teste F de Hartley (F_{Hart}) e o valor tabelado de Hartley (F_{tab}), todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%	83
Tabela 6	– Porcentagem de recuperação juntamente com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método UPLC-MS para quantificação dos quatro alcaloides ($n = 5$)	84
Tabela 7	– Coeficientes de variação (CV%) para precisão intradia e interdia do método UPLC-MS para quantificação dos quatro alcaloides ($n = 5$)	84
Tabela 8	– Alcaloides identificados em extrato de bulbo de <i>Hippeastrum elegans</i> em UPLC-QTOF-MS ^E	91
Tabela 9	– Quantificação dos alcaloides galantamina (Gal), sanguinina (Sang), pseudolicorina (Pseu) e narciclasina (Narc) em Amaryllidaceae de várias regiões brasileiras	107

Tabela 10 – Ensaio de Inibição de Acetilcolinesterase <i>in vitro</i> por extratos de alcaloides das 67 plantas da família Amaryllidaceae	114
Tabela 11 – Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase <i>ex vivo</i> em frações de alcaloides de Amaryllidaceae	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CV	Coefficiente de variação
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de arranjo de díodos
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitro benzóico) – reagente de Ellman
<i>g</i> -COSY	<i>Gradient correlation spectroscopy</i> (Espectroscopia de correlação homonuclear com gradiente)
<i>g</i> -HSQC	<i>Gradient heteronuclear single quantum coherence</i> (Coerência quântica heteronuclear simples com gradiente)
<i>g</i> -HMBC	<i>Gradient heteronuclear multiple bond correlation</i> (correlação heteronuclear a múltiplas ligações com gradiente)
LV	<i>Latent Variables</i> (variáveis latentes)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais)
FID	<i>Flame ionization detector</i> (Detector de ionização de chama)
GC-MS	<i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i> (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa)
HPLC-ESI-MS	<i>High-performance liquid chromatography/ Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência / ionização por eletropulverização com espectroscopia de massa)
IC ₅₀	Concentração que causa 50% de inibição da reação enzimática
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MS / MS	Espectrometria de massa em tandem
NACE	<i>Non-aqueous capillary electrophoresis</i> (Eletroforese capilar não aquosa)
PTFE	Politetrafluoretileno

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> (erro médio de raiz quadrada de calibração)
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i> (erro médio quadrático de raiz de validação cruzada)
r^2	<i>Squared pearson correlation coefficients</i> (coeficientes de correlação de Pearson ao quadrado)
SCX	<i>Strong cation exchange</i> (Forte troca catiônica)
SIM	<i>Selected ion monitoring</i> (Monitoramento de íons selecionado)
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Extração em fase sólida)
SIMPLS	<i>Simplified Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais Simplificados)
UPLC-QTOF-MS ^E	<i>Ultra performance liquid chromatography–quadrupole and time-of-flight-type mass spectrometry</i> ^{Elevated Energy} (Cromatografia líquida de ultraeficiência com espectrometria de massas ^{Energia Elevada} do tipo quadrupolo e tempo de voo)
UPLC-QDA	<i>Ultra performance liquid chromatography with quadrupolar detector and diode array</i> (Cromatografia líquida de ultraeficiência com analisador de massas quadrupolo e detector de arranjo de diodo)
UPTLC	<i>Ultra-performance thin-layer chromatography</i> (Cromatografia de camada fina de ultraeficiência)
UV	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Plantas como fonte de fármacos	24
1.2	Alcaloides	25
<i>1.2.1</i>	<i>Classificação dos alcaloides</i>	25
<i>1.2.2</i>	<i>Destaque para os alcaloides isoquinolínicos</i>	26
<i>1.2.3</i>	<i>Distribuição dos alcaloides</i>	28
<i>1.2.4</i>	<i>Propriedades farmacológicas e biológica dos alcaloides</i>	29
1.3	Familia Amaryllidaceae	29
<i>1.3.1</i>	<i>Alcaloides de Amarillidaceae</i>	32
1.4	Doença de Alzheimer	37
<i>1.4.1</i>	<i>Alcaloides de Amaryllidaceae na inibição da AchE</i>	37
<i>1.4.2</i>	<i>Galantamina como importante fitofármaco no tratamento da doença de Alzheimer</i>	46
1.5	Propriedades farmacológicas e biológica dos alcaloides sanguinina, pseudolicorina e narciclasina	47
1.6	Métodos de extração de galantamina entre outros alcaloides de Amarillidaceae	47
<i>1.6.1</i>	<i>Microextração sólido-líquido</i>	48
<i>1.6.2</i>	<i>Extração líquido-líquido</i>	48
<i>1.6.3</i>	<i>Extração em fase sólida</i>	49
1.7	Métodos de quantificação de galantamina entre outros alcaloides de Amaryllidaceae	49
2	OBJETIVOS	51
2.1	Objetivo principal	51
2.2	Objetivos específicos	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	Instrumentação	52
3.2	Materiais e reagentes	52
3.3	Materiais vegetais	54
<i>3.3.1</i>	<i>Materiais de Hippeastrum elegans para experimento agrônômico</i>	54
<i>3.3.2</i>	<i>Materiais botânicos da coleção de Amaryllidaceae</i>	54

3.4	Experimento agronômico com <i>Hippeastrum elegans</i>	58
3.5	Cultivo de espécies da coleção de Amaryllidaceae	61
3.6	Condições cromatográficas	61
3.6.1	<i>Condições das análises por UPLC-QTOF-MS^E</i>	61
3.6.2	<i>Desenvolvimento do método cromatográfico usando UPLC-QDA-SIM</i>	63
3.7	Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	64
3.8	Otimização do método de extração de alcaloides e preparo de amostra	65
3.8.1	<i>Microextração</i>	66
3.8.2	<i>Partição líquido-líquido</i>	66
3.8.3	<i>Microextração sólido-líquido seguida de extração em fase sólida (SPE)</i>	69
3.9	Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de alcaloides em bulbos de Amaryllidaceae	69
3.9.1	<i>Preparação de padrões analíticos</i>	69
3.9.2	<i>Curvas analíticas</i>	70
3.9.3	<i>Validação do método</i>	70
3.9.3.1	<i>Seletividade</i>	70
3.9.3.2	<i>Linearidade</i>	70
3.9.3.3	<i>Análise estatística</i>	71
3.9.3.4	<i>Teste da significância estatística da regressão linear</i>	71
3.9.3.5	<i>Precisão e exatidão</i>	73
3.9.3.6	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	73
3.10	Estudo dos teores de galantamina, sanguinina, pseudolicorina, narciclasina e avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase por extratos de <i>Hippeastrum elegans</i> em diferentes épocas de colheita	74
3.10.1	<i>Extração e quantificação dos alcaloides</i>	74
3.10.2	<i>Análise estatística dos teores de alcaloides nas diferentes épocas de colheita de <i>Hippeastrum elegans</i></i>	75
3.11	Testes de Inibição de Acetilcolinesterase por extratos de alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae	76
3.11.1	<i>Ensaio in vitro</i>	76
3.11.2	<i>Ensaio ex vivo</i>	77
3.12	Identificação dos alcaloides de <i>Hippeastrum elegans</i>	78
3.13	Análise multivariada	78

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	Otimização do método de extração	79
4.1.1	<i>Seleção do método de extração para alcaloides de Amaryllidaceae</i>	79
4.2	Validação do método de quantificação por UPLC-QDA	80
4.2.1	<i>Seletividade e efeito matriz</i>	81
4.2.2	<i>Linearidade</i>	82
4.2.3	<i>Exatidão e precisão</i>	85
4.2.4	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	85
4.3	Estudo químico e atividade anticolinesterásica dos extratos de <i>Hippeastrum elegans</i> em diferentes épocas de colheita	85
4.3.1	<i>Quantificação dos teores de alcaloides nos bulbos de H. elegans em</i> <i>diferentes épocas de colheita</i>	85
4.3.2	<i>Análise do perfil químico de alcaloides em Hippeastrum elegans</i>	88
4.3.2.1	<i>Identificação dos alcaloides</i>	89
4.3.3	Ensaio da Inibição de Acetilcolinesterase por extratos de alcaloides de H. <i>elegans</i> em diferentes épocas de colheita	98
4.3.3.1	<i>Ensaio in vitro em seis épocas de colheita de H. elegans</i>	98
4.3.3.2	<i>Ensaio ex vivo em seis épocas de colheita de H. elegans</i>	101
4.3.4	Modelagem PLS	102
4.3.4.1	<i>Análise de regressão baseada na atividade anticolinesterase e no conjunto de</i> <i>dados de UPLC-ESI-QTOF-MS</i>	102
4.3.4.2	<i>Análise de regressão baseada na atividade anticolinesterase e no conjunto de</i> <i>dados de RMN</i>	104
4.4	Estudo das espécies de Amaryllidaceae coletadas em várias regiões do Brasil	106
4.4.1	<i>Quantificação dos alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e</i> <i>narciclasina em espécies de Amaryllidaceae coletadas em várias regiões do</i> <i>Brasil (coleção de Amaryllidaceae da Embrapa)</i>	106
4.4.2	Ensaio da Inibição da Acetilcolinesterase	113
4.4.2.1	<i>Ensaio in vitro em extratos de alcaloides das 67 plantas da família</i> <i>Amaryllidaceae (coleção Embrapa)</i>	113
4.4.2.2	<i>Ensaio ex vivo por extratos de alcaloides da família Amaryllidaceae</i>	119
5	CONCLUSÃO	121

REFERÊNCIAS	123
APÊNDICE A - DADOS DE ANOVA PARA SELEÇÃO E MÉTODO DE EXTRAÇÃO	133
APÊNDICE B - DIAGRAMAS E TABELAS DOS TESTES DE TUKEY'S PARA OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	134
APÊNDICE C - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS ALCALOIDES EM UM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%.....	135
APÊNDICE D - DADOS DE ANOVA PARA IC ₅₀ DOS TESTES ANTI-ACETILCOLINESTERASE <i>IN VITRO</i> DOS TRATAMENTOS DE T1 A T6 PARA 5% DE SIGNIFICÂNCIA.....	136
APÊNDICE E - ANOVA DOS ENSAIOS <i>EX VIVO</i> DE EXTRATOS DE AMARYLLIDACEAE.....	137
APÊNDICE F - TESTE DE TUKEY'S DAS 7 CONCENTRAÇÕES COM N = 24 DA UNIÃO DE TODOS OS PERÍODOS.....	138
APÊNDICE G - DADOS DE ANOVA (0,05 DE SIGNIFICÂNCIA) PARA OS TESTES ANTI-ACETILCOLINESTERASE <i>EX VIVO</i> DOS EXTRATOS DE <i>H. ELEGANS</i> COLHIDOS EM SEIS ÉPOCAS.....	139
APÊNDICE H - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO DE PLS DE UPLC-ESI-QTOF-MS E OS RESULTADOS ENCONTRADOS NOS ENSAIOS ACHE <i>IN VITRO</i>	140
APÊNDICE I - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PLS DE RMN E ENSAIOS ACHE <i>IN VITRO</i>	141
APÊNDICE J - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DOS EXTRATOS EM BULBOS DE <i>HIPPEASTRUM ELEGANS</i>	142
APÊNDICE L - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DOS EXTRATOS EM BULBOS DE <i>HIPPEASTRUM ELEGANS</i> , EXPANSÃO 8,6 - 5,0 PPM.....	143
APÊNDICE M - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DOS EXTRATOS EM BULBOS DE <i>HIPPEASTRUM ELEGANS</i> – EXPANSÃO.....	144
APÊNDICE N - ESPECTRO DE RMN <i>G</i> -COSY DE <i>H. ELEGANS</i>	145
APÊNDICE O - ESPECTRO DE RMN <i>G</i> -HSQC DE <i>H. ELEGANS</i>	146
APÊNDICE P - ESPECTRO DE RMN <i>G</i> -HMBC DE <i>H. ELEGANS</i>	147

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas como fonte de fármacos

No Brasil a diversidade de plantas é estimada em 46836 espécies. Quase metade, 43%, é exclusiva (endêmica) do território nacional, colocando o Brasil como o país com a maior riqueza de plantas no mundo. Esse número não para de crescer, porque novas espécies são identificadas e relatadas continuamente em revistas científicas. Em média, os botânicos apresentam cerca de 250 novas espécies por ano (COSTA et al., 2015; THE BRAZIL FLORA GROUP, 2015). Todavia, o número total de plantas efetivamente utilizadas com fins medicinais é bastante reduzido. O instituto Kew Garden relatou que existem 28.187 espécies registradas em todo mundo com fins medicinais, porém apenas 4.478 têm sido citadas em publicações oficiais (KATHY et al., 2017).

Historicamente, a indústria farmacêutica vem utilizando produtos naturais como estratégia para a descoberta de novas moléculas farmacologicamente ativas, apesar de sérias dificuldades apontadas pelo setor tais como a legislação de acesso ao patrimônio genético prevista na Convenção da Diversidade Biológica, a qual é considerada restritiva e burocrática. No período de 1981-2010, 1/3 dos medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* eram de origem natural ou semissintética. Além disso, a indústria farmacêutica busca o desenvolvimento de produtos obteníveis a partir de fontes renováveis (HARVEY et al., 2015; MCCHESENEY et al., 2007). Existem vários exemplos de fitofármacos comerciais obtidos de plantas: os agentes anticâncer camptotecina de *Camptotheca acuminata*, Paclitaxel (Taxol®) de *Taxus* sp; podofilotoxina de *P. emodi* and *P. peltatum*, vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus* o antimalárico artemisinina de *Artemisia annua* (AHMAD, 2018).

Os produtos naturais são os componentes ativos não só da maioria dos medicamentos tradicionais, mas também de muitos medicamentos modernos, como o uso do alcaloide isoquinolínico galantamina proveniente de algumas espécies de Amaryllidaceae no tratamento do mal de Alzheimer (HULCOVÁ et al., 2019). Os produtos naturais são frequentemente usados como referência de partida para a descoberta de novos fármacos (ALLIED ACADEMIES, 2018). Os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta de medicamentos, cerca de mais de 50% dos medicamentos aprovados pela FDA eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais. O mercado global desses medicamentos foi avaliado em U\$ 25,6 bilhões em 2015 e deverá atingir quase U\$ 35,4 bilhões

em 2020, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,6% de 2015 a 2020 (ALLIED ACADEMIES, 2018).

1.2 Alcaloides

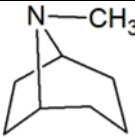
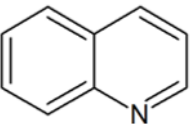
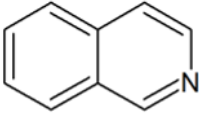
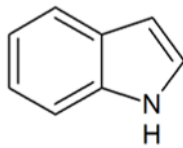
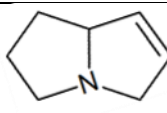
Entre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os alcaloides se destacam como classe muito proeminente de compostos de defesa. De acordo com os bancos de dados do *Dictionary of Natural Product* (<http://dnp.chemnetbase.com/intro/>) e publicado no livro *Studies in Natural Products Chemistry* (ATTA-UR-RAHMAN, 2019), cerca de 27.000 alcaloides já foram identificados. O alcaloide é definido como “*substância orgânica, de origem natural, cíclica contendo um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada dentro dos organismos vivos.*” (PELLETIER, 1988), ou uma classificação mais moderna e geral: “*Alcaloides é um termo usado coletivamente para descrever um grupo grande e diversificado de produtos químicos que possuem propriedades semelhantes a álcalis e pelo menos um átomo de nitrogênio em uma estrutura de anel heterocíclico*” (TAYLORS, 2017).

1.2.1 Classificação dos alcaloides

Os alcaloides têm o requisito de serem derivados de aminoácidos em sua origem biogênica, todavia não é o fato de se ter nitrogênio em sua estrutura que os alcaloides são obrigatoriamente básicos, sendo que alguns podem ser neutros ou até ácidos. Isto depende da classificação do nitrogênio como amina secundária, terciária ou quaternária, e presença de grupos elétron-doadores e elétron-atraentes próximos ao nitrogênio do alcaloide, proporcionando maior e menor basicidade, respectivamente (BRUNETON, 2001). Os alcaloides que efetivamente derivam de aminoácidos e apresentam nitrogênio em heterociclo são denominados de alcaloides verdadeiros, enquanto aqueles que possuem nitrogênio fora do heterociclo são denominados de protoalcalóides. Além disso, alcaloides biossintetizados por uma via diferente da de aminoácidos, porém que incorporam o nitrogênio a sua estrutura, são denominados de pseudoalcalóides. Uma mesma família botânica pode ser capaz de biossintetizar diferentes classes de alcaloides, no entanto, em alguns casos, a síntese de alcalóides pode ser extremamente específica (SIMÕES, 2017).

Os alcaloides verdadeiros podem ser classificados quanto aos seus esqueletos básicos, como quinolínicos, isoquinolínicos, tropânicos, indólicos, pirrolizidínicos e metilxantinas (Tabela 1) (SIMÕES, 2017; WINK, 2000).

Tabela 1. Grupo dos principais tipos de alcaloides com alguns representantes e seus respectivos núcleos.

Grupo de alcaloide	Principais alcaloides	Núcleo do grupo
Tropânicos	Atropina Cocaína Beladona Hiosciamina Metilecgonona	
Quinolínicos	Quinidina Quinina Camptotecina Cinchonidina Cinchonina	
Isoquinolínicos	Galantamina Berberina Hidrastina Codeína Morfina Papaverina	
indólicos	Vincristina Reserpina Estricnina Fisostignina Ergotamina	
Pirrolizidínicos	Retronecina Platinecina Licopsamina Senecionina	

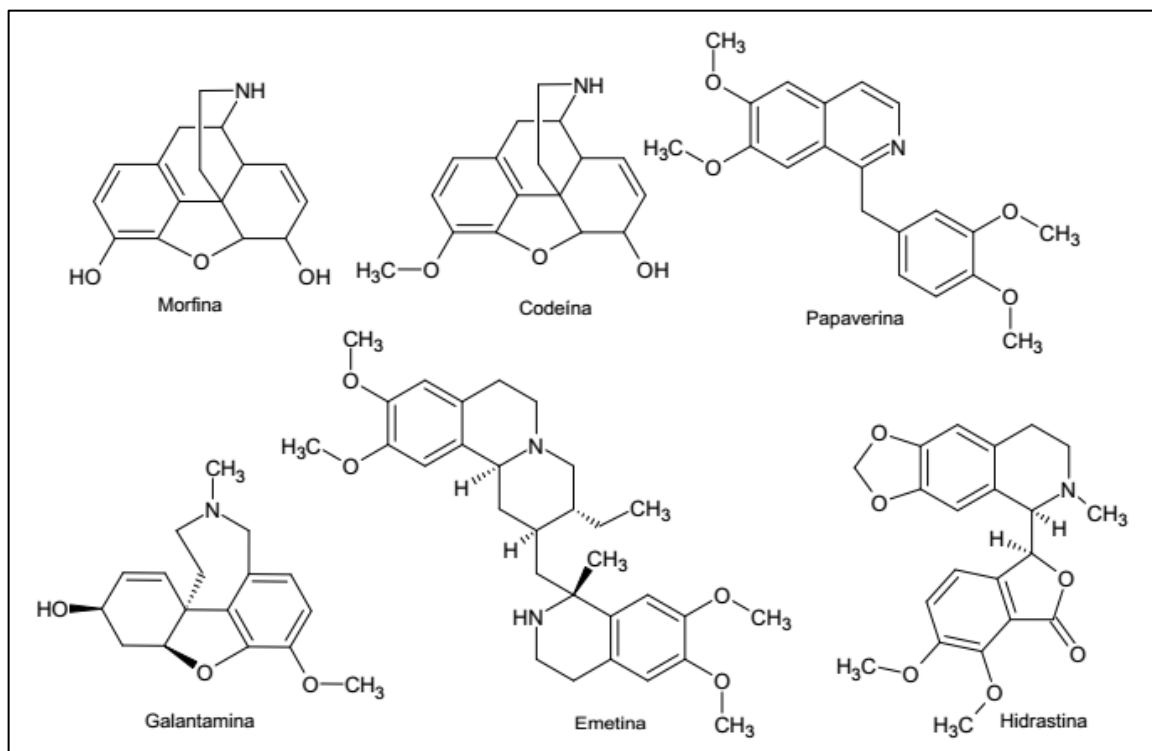
Fonte: adaptado de (SIMÕES, 2017).

1.2.2 Destaque para os alcaloides isoquinolínicos

Os alcaloides isoquinolínicos pertencem ao maior grupo de alcaloides vegetais, e consequentemente contém a maior diversidade de estruturas químicas que demonstram ampla variedade de atividades biológicas, tais como antiviral, anticâncer, inibição da acetilcolinesterase (AChE), antimalárica, entre outras (DEWICK, 2002). Esses alcaloides são bem característicos das espécies da família Amaryllidaceae, que estão distribuídas em regiões quentes e temperadas ao redor do mundo (HOFMANN et al., 2004).

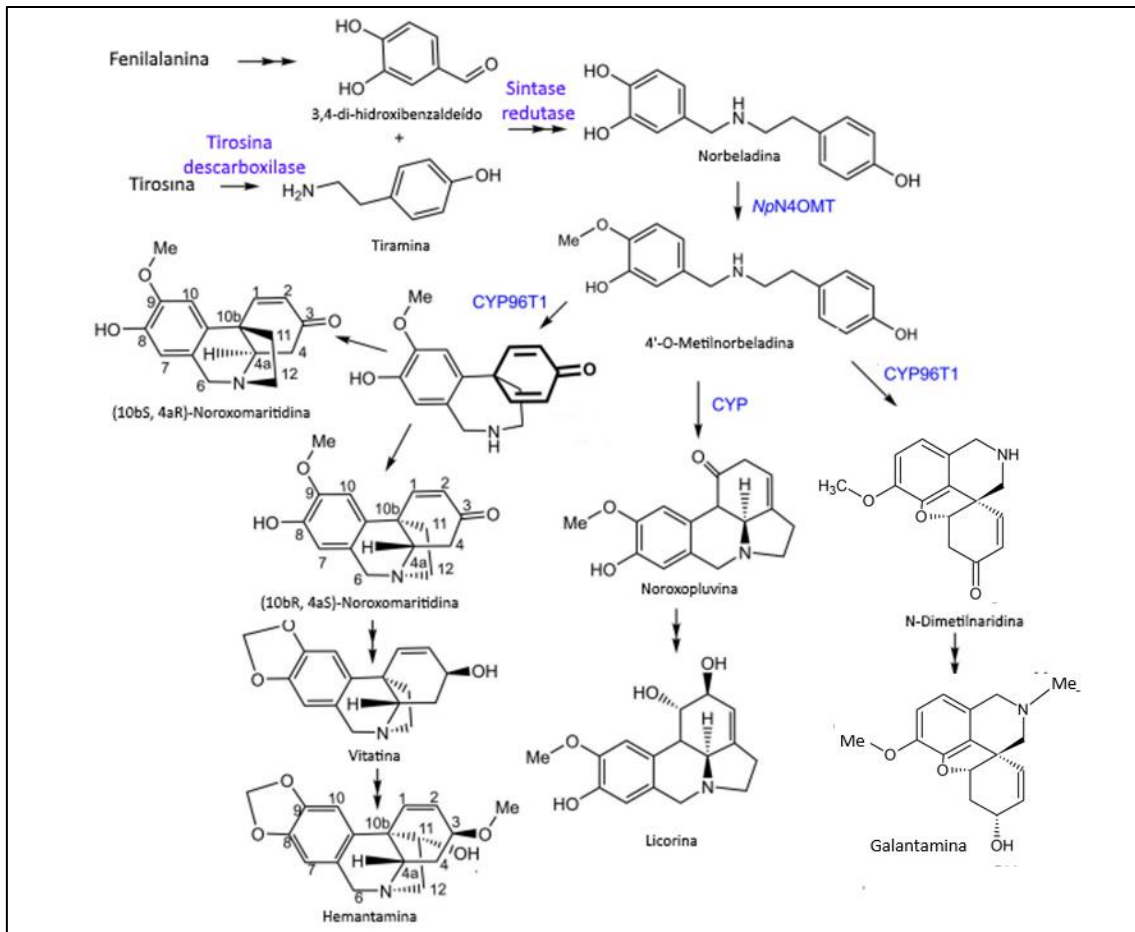
O grupo dos alcaloides isoquinolínicos são derivados dos benzil-isoquinolínicos que incorporam duas unidades fenólicas com origem biossintética dos aminoácidos *L*-tirosina e *L*-fenilalanina (DEWICK, 2002). Esse grupo tem alcaloides bem característicos como a morfina, codeína, papaverina, tubocurarina, galantamina, ementina e umas outras 4.000 substâncias com esse tipo de estrutura isoquinolínica, Figura 1, (SIMÕES, 2017). A biossíntese da galantamina tem sua gênese pelo aminoácido fenilalanina, a qual é convertida no aldeído pirocateico, e a tirosina que é convertida a tiramina. A condensação da tiramina com o aldeído pirocateico forma uma base de Schiff. Esta imina origina a norbelladina que é catalisada pela norbelladina 4'-*O*-metiltransferase (*NpN4OMT*), uma enzima envolvida na biossíntese dos alcaloides de Amaryllidaceae que utiliza o co-substrato *S*-adenosilmetionina para metilar a norbelladina formando o 4'-*O*-metilnorbelladina. A enzima noroxomaritidina sintase (*CYP96T1*) catalisa o primeiro ramo principal da biossíntese de alcaloides de Amaryllidaceae. A norbelladina por meio dessas enzimas, entre outras, é precursora de espécies intermediárias, após acoplamentos oxidativos, ciclizações intramoleculares e reduções dão origem a galantamina entre outros alcaloides, Figura 2, (KILGORE et al., 2016; SIMÕES, 2017).

Figura 1. Estrutura molecular dos alcaloides isoquinolínicos, morfina, codeína, papaverina, galantamina, ementina e hidrastina (SIMÕES, 2017).



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Figura 2. Propostas de vias biossintéticas para alcaloides representativos de Amaryllidaceae e as classes de enzimas destacadas em azul.



Fonte: Modificada de KILGORE et al., 2016.

1.2.3 Distribuição dos alcaloides

Alcaloides são amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente entre as angiospermas (mais de 20% de todas as espécies produzem alcaloides). Esses metabólitos nitrogenados são menos comuns, mas estão presentes também em gimnospermas, pteridófitos, musgos, algas, bactérias, fungos, muitos animais marinhos (esponjas, lesmas, vermes, briozoários), artrópodes, anfíbios (sapos, salamandras) e também em algumas aves e mamíferos (AIELLO et al., 2007).

As plantas produzem alcaloides em seu metabolismo secundário principalmente na defesa química contra herbívoros ou predadores (ROBERTS et al., 1998; WINK, 1993, 2000) e esses alcaloides aparentemente são importantes para o bem estar da planta que os produz. Alguns alcaloides são antibacterianos, antifúngicos e antivirais; e estas propriedades podem

estender-se à toxicidade para os animais; além de competição inter e intraespecífica, contribuindo para o equilíbrio populacional de uma comunidade de plantas (HARBORNE, 1993; WINK, 1993, 2000). Os alcaloides tendem a se acumular em células específicas, onde irão desempenhar sua função fisiológica na planta. Geralmente encontram-se presentes em tecidos mais externos, como nas epidermes, primeiras camadas corticais e no tegumento das sementes. No entanto, os alcaloides podem ser biossintetizados em diferentes tecidos e transportados para seu local de acúmulo. Para seu melhor transporte os alcaloides acumulam-se na forma de sal hidrossolúvel ou associado com taninos (BRUNETON, 2001).

1.2.4 Propriedades farmacológicas e biológica dos alcaloides

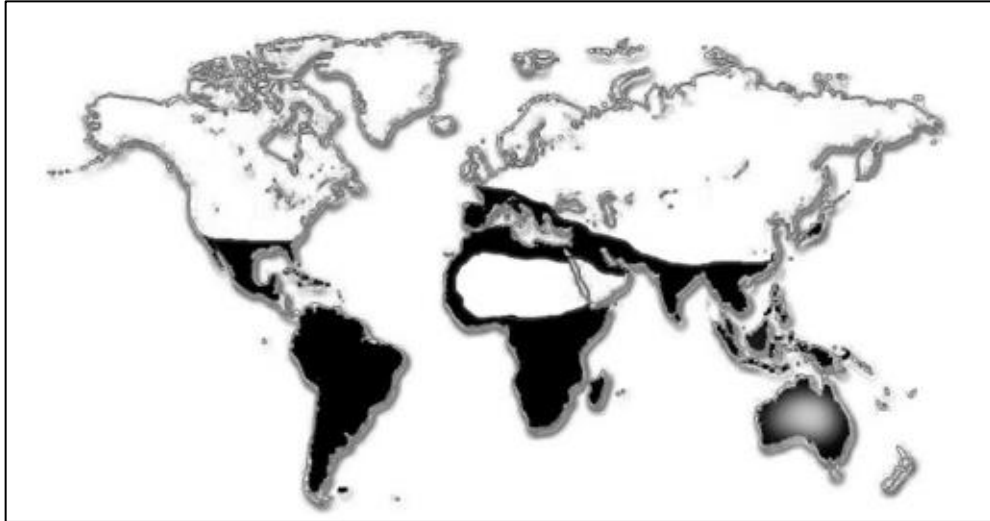
Os alcaloides apresentam promissoras atividades farmacológicas, incluindo o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, propriedades antioxidantes, ansiolíticas, anti-inflamatórias, antidepressivas e atividade citotóxica (CHAVES et al., 2017). Além de outras propriedades biológicas, como: atividade antimalárica, atividade antimicrobiana e antituberculose. Os alcaloides podem interagir com diversos alvos, como canais de Na⁺, enzimas (ex. acetilcolinesterase), além de vários tipos de receptores tais como de acetilcolina, adrenalina, dopamina, serotonina e opióides (AIELLO et al., 2007).

1.3. Família Amaryllidaceae

Plantas da família Amaryllidaceae, cujo nome é oriundo do gênero *Amaryllis*, pertencem à ordem monocotiledônea Asparagales e compreendem 75 gêneros e cerca de 1100 espécies. Estão amplamente distribuídas nos trópicos, regiões temperadas e quentes do mundo. Essa distribuição da família Amaryllidaceae mostra um endemismo regional, com quatro grupos monofiléticos de organismos, que incluem os clados basicamente africanos, eurásianos, australasianos e americanos (Figura 3). Os habitats nativos das espécies silvestres da família Amaryllidaceae variam e geralmente florescem no final do inverno e primavera, com exceções ocasionais no outono. A maioria das espécies tem grandes e vistosas flores actinomórficas, variando de estrela para a forma de trompete ou tubular, e as cores variam de vermelho, laranja, amarelo e rosa a branco, enquanto as flores azuladas são encontradas apenas nos gêneros *Griffinia*, *Worsleya* e *Lycoris*. Em geral liberam um odor altamente perfumado e por isso são cultivadas como plantas ornamentais por séculos, principalmente espécies do gênero *Narcissus*, Figura 4, (JIN et al., 2013). No Brasil, Amaryllidaceae está representada por cerca de 15 gêneros

e 150 espécies, sendo *Cearanthes* Rav., *Griffinia* Ker-Gawler, *Tocantinia* Rav. e *Worsleya* (W. Watson ex Traub) Traub, gêneros endêmicos (AMARAL-LOPES, 2015) (Figura 5).

Figura 3. Distribuição de plantas endêmicas da família Amaryllidaceae no mundo.



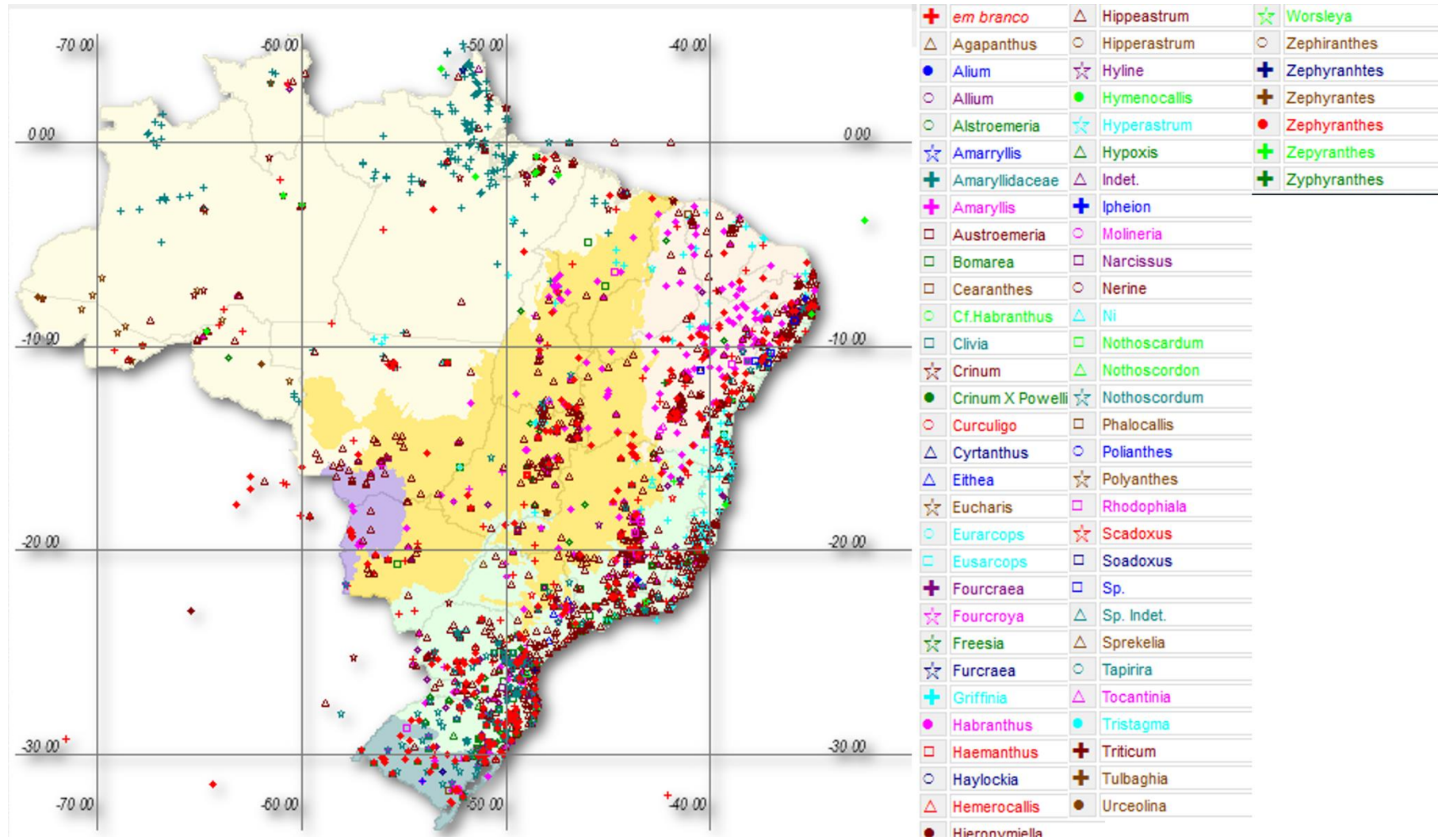
Fonte: adaptada de JIN, Z., (2013).

Figura 4. Diversidade de gêneros de Amaryllidaceae. A: *Narcissus*, B: *Griffinia*, C: *Lycoris*, D: *Crinum*, E: *Hippeastrum*, F: *Worsleya*.



Fonte: https://c1.staticflickr.com/8/7320/9611591941_6ff4748807_b.jpg.

Figura 5. Diversidade de gêneros de Amaryllidaceae no Brasil.



Fonte: disponível na rede speciesLink (<http://www.splink.org.br>) em 23 de janeiro de 2020 às 14:46.

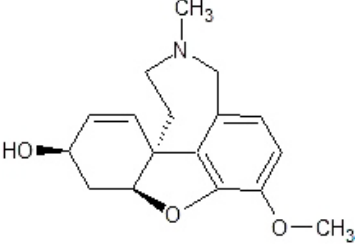
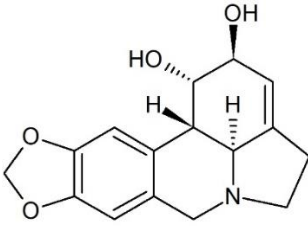
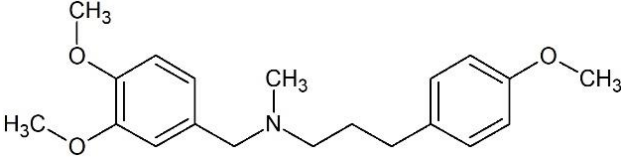
1.3.1 Alcaloides de Amaryllidaceae

Os alcaloides de Amaryllidaceae são derivados de fenilalanina e tirosina e apresentam como estrutura básica o núcleo tetraidroisoquinolínico, restritos unicamente à essa família das monocotiledóneas e podem estar presentes em todo o vegetal, porém ocorrem predominantemente nos bulbos (BRUNETON, 2001; JIN et al., 2019). Amaryllidaceae é uma família amplamente reconhecida por seu alto conteúdo de alcaloide. Os alcaloides presentes em extratos de plantas de Amaryllidaceae têm sido objeto de investigações químicas por quase 200 anos (ABOU-DONIA et al., 2008a). Até o momento, mais de 600 alcaloides exclusivos e estruturalmente diversos já foram isolados de plantas da família Amaryllidaceae e são responsáveis por várias atividades farmacológicas (JIN et al., 2019).

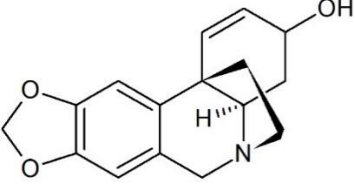
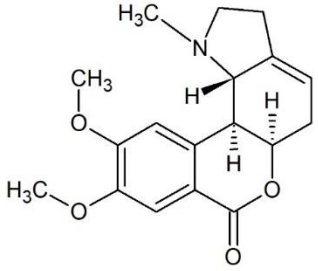
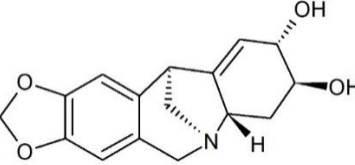
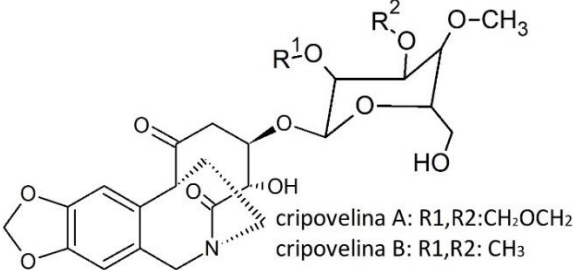
Os estudo dos alcaloides de Amaryllidaceae, iniciou-se com o isolamento da licorina de *Narcissus pseudonarcissus* em 1877 (GHOSAL et al., 1985). Estudos com extratos e moléculas puras, extraídas de diferentes gêneros de Amaryllidaceae, tais como *Hippeastrum*, demonstraram terem potencial atividade anticolinérgica (GIORDANI et al., 2008; PAGNING et al., 2016), exibindo atividade inibitória e neuroprotetora da acetilcolinesterase (AChE) (CORTES et al., 2015a; CORTES et al., 2015b). A versatilidade das estruturas dos alcaloides de Amaryllidaceae os postulam como potenciais agentes neuroprotetores contra atividades oxidativas (CORTES et al., 2018a).

Segundo Jin (2019), estes alcaloides são classificados em grupos de acordo com suas semelhanças estruturais. Estes grupos foram atualizados de forma a ampliar a classificação dos alcaloides de Amaryllidaceae neste trabalho (MÉRILLON, 2013), como ilustrado no Quadro 1.

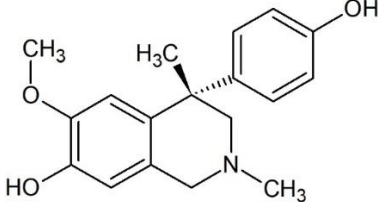
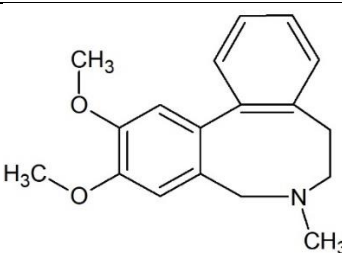
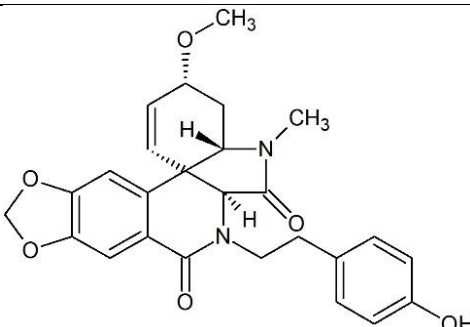
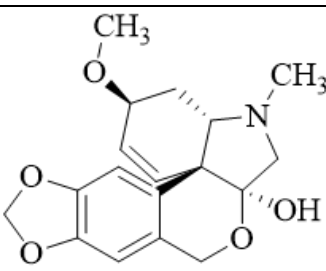
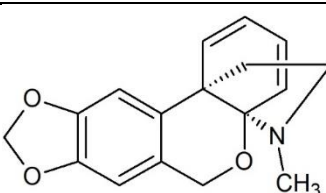
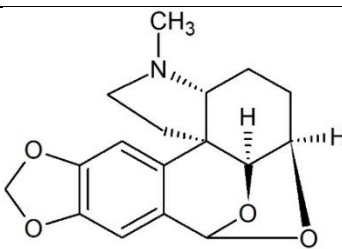
Quadro 1. Classificação de alcaloides de Amaryllidaceae em grupos de acordo com suas semelhanças estruturais (*continua*).

Alcaloide representante	Tipo de estrutura	Gêneros
Galantamina	 <p>The structure shows a complex polycyclic alkaloid with a central nitrogen atom bonded to a methyl group (CH₃). It features a benzene ring with a methoxy group (-OCH₃) and a hydroxyl group (-OH) on adjacent carbons, and a fused ring system containing another oxygen atom.</p>	<p><i>Crinum,</i> <i>Cyrtanthus,</i> <i>Galanthus,</i> <i>Hippeastrum,</i> <i>Hymenocallis,</i> <i>Leucojum,</i> <i>Lycoris,</i> <i>Narcissus,</i> <i>Ungernia.</i></p>
Licorina	 <p>The structure is a complex polycyclic alkaloid with a central nitrogen atom. It features a benzene ring with a furan ring fused to it, and a complex ring system with multiple hydroxyl groups (-OH) and hydrogen atoms (-H) indicated with stereochemistry.</p>	<p><i>Crinum,</i> <i>Cyrtanthus,</i> <i>Galanthus,</i> <i>Hippeastrum,</i> <i>Hymenocallis,</i> <i>Leucojum,</i> <i>Lycoris,</i> <i>Narcissus,</i> <i>Ammocharis,</i> <i>Brunsvigia,</i> <i>Clivia,</i> <i>Eucharis,</i> <i>Sprekelia,</i> <i>Sternbergia,</i> <i>Ungernia,</i> <i>Zephyranthes.</i></p>
Beladina	 <p>The structure shows a tropane alkaloid with a central nitrogen atom bonded to a methyl group (CH₃). It features two phenyl rings, one with a methoxy group (-OCH₃) and a methyl group (-CH₃) on the same carbon, and another with a methoxy group (-OCH₃).</p>	<p><i>Crinum e</i> <i>Nerine</i></p>

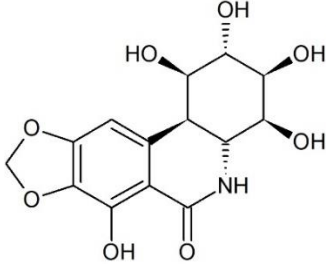
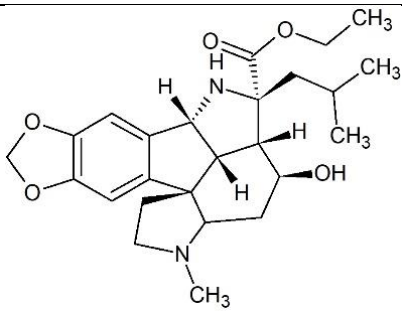
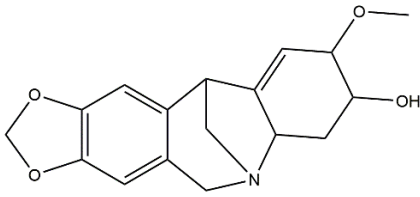
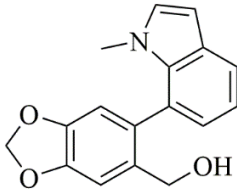
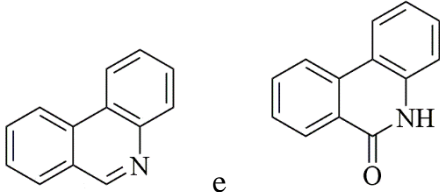
Quadro 1. Classificação de alcaloides de Amaryllidaceae em grupos de acordo com suas semelhanças estruturais (*continuação*).

Crinina		<i>Ammocharis,</i> <i>Brunsvigia,</i> <i>Crinum,</i> <i>Galanthus,</i> <i>Hymenocallis,</i> <i>Nerine,</i> <i>Narcissus,</i> <i>Eucharis.</i>
Homolicorina		<i>Crinum,</i> <i>Hippeastrum,</i> <i>Lycoris,</i> <i>Narcissus,</i> <i>Amaryllis,</i> <i>Ammocharis,</i> <i>Brunsvigia,</i> <i>Eucharis,</i> <i>Hymenocallis,</i> <i>Leucojum,</i> <i>Zephyranthes.</i>
Pancracina		<i>Narcissus,</i> <i>Hymenocallis,</i> <i>Rhodophiala,</i> <i>Boophane,</i> <i>Haemanthus.</i>
Cripovelina	 <p>cripovelina A: R₁,R₂:CH₂OCH₂ cripovelina B: R₁,R₂: CH₃</p>	<i>Crinum</i>

Quadro 1. Classificação de alcaloides de Amaryllidaceae em grupos de acordo com suas semelhanças estruturais (*continuação*).

Cherilina		<i>Crinum</i>
Buflavina		<i>Boophane</i>
Plicamina		<i>Cyrtanthus,</i> <i>Galanthus</i>
Tazetina		<i>Crinum,</i> <i>Eucharis,</i> <i>Galanthus,</i> <i>Hippeastrum,</i> <i>Hymenocallis</i> <i>(Pancratium)</i>
Gracilina		<i>Galanthus</i>
Augustamina		<i>Crinum</i>

Quadro 1. Classificação de alcaloides de Amaryllidaceae em grupos de acordo com suas semelhanças estruturais (*continuação*).

Pancratistatina		<i>Crinum</i> , <i>Hippeastrum</i> , <i>Hymenocallis</i> , <i>(Pancratium)</i> , <i>Zephyranthes</i> .
Gracilamina		<i>Galanthus</i>
Montanina		<i>Lycoris</i> <i>Pancratium</i> <i>Haemanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Narcissus</i>
Galantindole		<i>Galanthus</i> <i>Narcissus</i> <i>Lycoris</i>
Fenantridona e Fenantridina		<i>Lycoris</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Brachystola</i> <i>Hort. ex</i> <i>Schmarse</i>

Fonte: o autor e as pesquisas dos gêneros de Amaryllidaceae foram realizadas em http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html.

1.4 Doença de Alzheimer

Em 2016, 47 milhões de pessoas viviam com a doença de Alzheimer (DA) em todo mundo. Este número deverá aumentar para mais de 131 milhões até 2050, à medida que as populações envelhecem no mundo (PRINCE et al., 2016). A DA é uma doença neurodegenerativa, na qual a principal característica é a perda progressiva da função cognitiva e motora. A etiologia da DA permanece obscura, de modo que o tratamento atual tem por finalidade apenas melhorar a qualidade de vida do paciente, através do retardo da falência de células cerebrais e gerenciamento dos sintomas cognitivos e comportamentais (WONG, 2016). A demência também tem um enorme impacto econômico ultrapassando um quarto de trilhão de dólares em 2018, de acordo com o relatório de 2018 da *Alzheimer's Facts and Figures Report* (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2018). Três inibidores de Acetilcolinesterase, o donepezil, rivastigmina e galantamina tem uso clínico no início da doença de Alzheimer. Dentre essas substâncias, destaca-se o fitofármaco galantamina que também atua sobre sítios alostéricos em receptores nicotínicos, tornando-os mais responsivos a acetilcolina e por ter menores efeitos colaterais adversos (TAKLA et al., 2018).

1.4.1 Alcaloides de *Amaryllidaceae* na inibição da AChE

Os inibidores da AChE foram extensivamente estudados como opções terapêuticas para a DA após a observação inicial de que a fisostigmina (eserina), um alcaloide obtido das sementes de *Physostigma venenosum* Balf. (*Fabaceae*), tradicionalmente usado como veneno em rituais na África (BRUNETON, 1999) poderia reverter os distúrbio da cognição produzida pela escopolamina em experimentos em animais. Este alcaloide tem um efeito rápido e, embora atue como inibidor reversível para ambas as colinesterases, é mais seletivo para AChE. No entanto, o uso da fisostigmina é atualmente limitado por sua meia-vida curta, sua estreita janela terapêutica e seus efeitos gastrointestinais e ortostáticos. Outros alcaloides anticolinesterásicos atualmente estudados para seu uso na DA inclui galantamina, como relatado anteriormente e huperzina A, um alcaloide do tipo quinolizidina isolado de *Huperzia serrata* (Thunb) Trev, uma espécie chinesa tradicionalmente usado para o tratamento de inchaço, esquizofrenia e miastenia grave (GUO et al., 2009).

Muitos alcaloides que são inibidores ativos da colinesterase já foram descritos em diferentes famílias, incluindo alcaloides do tipo isoquinolínicos de *Amaryllidaceae*

(encontrados principalmente em *Narcissus sp*, *Galanthus sp* e *Hyppeastrum sp*) (PAGLIOSA et al., 2010; KIM et al., 2002). Em relação à inibição da AChE, os compostos mais ativos pertencem ao tipo de galantamina (Tabela 2), especialmente sanguinina, galantamina, 11 α -hidroxi-galantamina e epinorgalantamina, cujos valores de IC₅₀ variam de 0,10 a 9,60 μ M (LÓPEZ et al., 2002). Os efeitos inibitórios da AChE parecem estar relacionados às características estruturais entre os diferentes tipos de esqueletos, uma vez que apenas os alcaloides incluídos nos grupos da galantamina e da licorina (assocanina, grupos oxoassoanina, pseudolicorina) exibiram tais atividade inibitória. O maior poder inibitório destes compostos frente a AChE pode ser atribuída à presença do anel C aromático juntamente com o átomo de nitrogênio quaternário, o que é importante para a atividade inibitória exibida por outros alcaloides isoquinolínicos como a berberina. Além disso, os grupos metil e epóxi presentes na incartina (IC₅₀ = 107 μ M) e *N*-óxido incartina (IC₅₀ = 34,5 μ M) também favorecem a inibição da AChE (ŠAFRATOVÁ et al., 2018). Os alcaloides de Amaryllidaceae exibindo os outros tipos de esqueleto isoquinolínico se comportam como inibidores fracos da colinesterase com valores de IC₅₀ próximos de 10⁻⁴ a 10⁻³ M (KONRATH et al., 2013). Dezena de alcaloides de Amaryllidaceae foram listados na Tabela 2, proveniente de uma vasta busca na literatura com relação à atividade inibitória da AChE em ensaios *in vitro*.

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC₅₀ (μM) em ensaios in vitro com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (continua).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC ₅₀	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC ₅₀
Homolicorina	10- <i>O</i> -demetil-Homolicorina ^d	nd	Licorina	1,2-di- <i>O</i> -Acetil-licorina ^e	211
	8- <i>O</i> -demetil-homolicorina ^b	nd		1- <i>O</i> -Acetil-licorina ^e	0,96
	9- <i>O</i> -demetil-2α-hidroxihomolicorina ^b	nd		2- <i>O</i> -acetilpseudolicorina ^b	nd
	Dubiusina ^b	nd		Assoanina ^b	3,87 ± 0,24
	Galantindola ^d	nd		Assoanina ^e	3,87
	Hippeastrina ^a	> 500		Caranina ^a	321 ± 42
	Homolicorina ^a	64 ± 4		Crinina ^a	> 500
	Licorenina ^a	> 500		Galantine ^a	606 ± 60
	Masonina ^a	305 ± 34		Incartina ^d	208 ± 14
	<i>N</i> -Demetilmasonina ^a	> 500		Licorina ^b	nd
	Odulina ^a	> 500.		<i>N</i> -óxido incartina ^c	34,50 ± 9,1
	<i>O</i> -Ethillicorenina ^a	> 500		<i>N</i> -óxido Licorina ^e	356
	<i>O</i> -Metillicorenina ^a	> 500		<i>O</i> -Acetilpluviina ^a	> 500
	Tetrahidromasonina ^a	> 500		Oxoassoanina ^b	47,21 ± 1,13

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC₅₀ (μM) em ensaios *in vitro* com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (continuação).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC₅₀	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC₅₀
Licorina	Pseudolicorina ^b	152,32 ± 32,06	Galantamina	<i>N</i> -óxido Galantamina ^e	26,2
	Ungerimina ^e	0,35		Sanguinina ^b	0,10 ± 0,01
Galantamina	11α-Hidroxicgalantamina ^b	1,61 ± 0,21	Tazetina	Pretazettina ^b	nd
	11β-hidroxicgalantamina ^e	14,5		Tazetina ^a	> 500
	Epinorgalantamina ^b	9,60 ± 0,65	Crinina	3- <i>O</i> -Acetil-hamaina ^e	> 500
	Epinorlicoramina ^b	nd		6-hidroxi-crinamina ^e	445
	Galantamina ^a	1,7 ± 0,01		6α, β-haemantidina ^e	108
	Licoramina ^a	456 ± 57		Crinamina ^b	nd
	Licoraminona ^a	> 500		Crinina ^a	> 500
	Narcikachnina ^d	nd		Epimaritidina ^a	> 500
	Narcimatulina ^a	489 ± 60		Haemantamina ^a	> 500
	Narcipavlina ^d	208 ± 37		Haemantidina ^b	nd
	Narwedina ^a	281 ± 34		Papiramina ^b	nd
	Norlicoramina ^d	> 500		Sec-isopowellaminona ^a	294 ± 33

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC50 (μM) em ensaios *in vitro* com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (continuação).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50
Outros	Beladina ^e	> 500	Outros	(+)-Reticulina ^e	72,2
	(-)-2,9-Dihidroxil-3,11-dimetóxy-1,10-dinitro-tetra-hidro-protoberberina ^e	8,77		(+)-Talictrifolina ^e	14,5
	(-)-Corinoxidina ^e	64,4		(<i>R,R</i>)-Isochondodendrina ^e	78,2
	(-)-Tetra-hidro-palmatina ^e	43,2		(<i>R,S</i>)-2- <i>N</i> -norberbamunina ^e	34,7
	(+)-1-nitro-apocavidina ^e	1,70		(<i>S</i>)-3-Metóxi-nordomesticina ^e	10,0
	(+)-2,9-Dihidróxil-3,11-dimetóxi-1,10-dinitro-tetra-hidro-protoberberina ^e	3,34		(<i>S,S</i>)- <i>O</i> 4''-Methyl, <i>O</i> 6'-dimetil-(+)-curina ^e	44,6
	(+)-4-Nitro-isoapocavidina ^e	53,3		1,2-Dihidro-apatelina ^e	116
	(+)-Bulbocapnina ^e	100		5- <i>O</i> -Metil-marcanina D ^e	23,4
	(+)-Canadalina ^e	20,1		6-Epioreobeilina ^e	9,5
	(+)-Canadina ^e	12,4		Berberina ^a	n.d
	(+)-Cavidina ^e	200		Boldina ^e	8,6

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC50 (μM) em ensaios *in vitro* com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (continuação).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50
Outros	(<i>S-S</i>)- <i>O4''</i> -Metil, Nb-nor- <i>O6'</i> -dimetil-(+)-curina ^e	68,3	Outros	Cheleritrina ^e	3,78
	2-Hidróxi-9-metóxi-iaporfina ^e	2,0		Chelidonina ^e	26,8
	6-Etóxi-dihidro-cheleritrina ^e	3,25		Cherilina ^e	407
	6-Etóxi-dihidro-sanguinarina ^e	0.83		Chlidantina ^e	24,1
	7,8-Dihidro-[1,3]dioxolo[4,5-]isoquinolina ^e	18,4		Ciclanolina ^e	9,23
	8-Acetonildihidrocheleritrina ^e	58,7		Cocsolina ^e	47,6
	8 α -Etoxi-precriwelina ^e	> 500		Cocsulina ^e	100.0
	Asimilobina ^e	8,7		Coptisina ^e	1,01
	Bulbocapnina ^e	40		Coricavidina ^e	100

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC50 (μM) em ensaios *in vitro* com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (continuação).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50
Outros	Coridalina ^e	15	Outros	Galwesina ^e	> 500
	Coridalmina ^e	100		Glaucina ^e	50
	Coridina ^e	100		Groenlandicina ^e	0,54
	Corilucinina ^e	128		Hamaina ^e	> 500
	Coritenchina ^e	50		Huperzina A ^e	0,033 \pm 0,001
	Crinamidina ^e	300		Isoboldina ^e	9,4
	Dehidrocavidina ^e	9,92		Isocoridina ^e	50
	Dehidrocoridalina ^e	0,62		Jatrorrizina ^e	2,08
	Dehidrocoridalmina ^e	96		Kurramina-2'- α -N- óxido ^e	150
	Dehidrocoritenchina ^e	98		Kurramine-2'- β -N- óxido ^e	10,0
	Deoxilicorenina ^e	18,0		Laurotetanina ^e	3,2
	Epiberberina ^e	1,07		Liriodenina ^e	3,5
	Epibufanisina ^e	> 500		Lisicamina ^e	16,1
	Epimediphina ^e	3,1		Magnoflorina ^e	100
	Epivitatina ^e	239		Mesembrenone ^b	nd

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC50 (μM) em ensaios *in vitro* com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (continuação).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50
Outros	Narciprimina ^e	78,9	Outros	Pseudocolumbamina ^e	5,0
	<i>N</i> -desmetil-8 α -etóxi-pretazetina ^e	234		Pseudodehidrocoridalina ^e	8,4
	<i>N</i> -desmetil-8 β -etóxi-pretazetina ^e	419		Pseudopalmatina ^e	8,4
	<i>N</i> -Metil stefolidina ^e	31,3		<i>R</i> -(-)-3-hidroxinornuciferina ^e	109
	Oreobeilina ^e	5,0		<i>R</i> -(-)-Asimilobine ^e	123
	Oxipseudopalmatina ^e	50		<i>R</i> -(-)-atinodafnina ^e	117
	Oxoglaucidalina ^e	27,1		<i>R</i> -(-)-norushinsunina ^e	126
	Oxoglaucina ^e	48,7		Remerina ^e	20,7
	Oxonantenina ^e	150		<i>R</i> -(-)-norushinsunina ^e	126
	Oxoxilopina ^e	42,5		Remerina ^e	20,7
	Palmatina ^e	2,20		<i>R</i> -nornuciferina ^e	nd
	Protopina ^e	50		<i>S</i> -(+)-3-hidroxinornantenina ^e	76,9
	Pseudoberberina ^e	4,5			

Tabela 2. Alcaloides de Amaryllidaceae com suas respectivas inibições em termos de IC50 (μM) em ensaios *in vitro* com a AChE. Alguns valores de desvio padrão não foram fornecidos por suas respectivas referências (Final).

Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50	Esqueleto do alcaloide	Alcaloide	IC50
Outros	<i>S</i> -(+)- <i>N</i> -metilcoridina ^e	140	Outros	Stefaranina ^e	14,1
	Sal de (7 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-(-)- <i>N</i> -metil-10- <i>O</i> -dimetil-xilopinina ^e	8,4		Stefarotudina ^e	38,1
	Sal de Picnarrina ^e	16,0		Stefolidina ^e	100
	Sal de <i>S</i> -(-)-7,8-dideidro-10- <i>O</i> -demetilxilopininium ^e	154		Stilopina ^e	15,8
	Sal de <i>S</i> -(-)-7,8-dideidrocoridalminium ^e	30,8		Talifolina ^e	50
	Sanguinarina ^e	1,93		Xilopinina ^e	38,1
	Secoboldina ^e	10,0			

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Referências, a: HULCOVÁ et al., (2019), b: LÓPEZ et al., (2002), c: ANDRADE, (2017), d: ŠAFRATOVÁ et al., (2018), e: KONRATH et al., (2013).

1.4.2 Galantamina como importante fitofármaco no tratamento da doença de Alzheimer

Galantamina, que é um alcaloide típico de Amaryllidaceae, se tornou uma das principais drogas comercializadas na inibição da acetilcolinesterase com atuação seletiva, reversível e competitiva para o tratamento clínico da doença de Alzheimer (MAELICKE et al., 2001; VIEGAS et al., 2005). Todavia, seu efeito neuroprotetor não se resume exclusivamente na inibição da acetilcolinesterase, mas também pela superexpressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, assim como a modulação alostérica de nAChRs (CONTELLES et al., 2006), efeito antidiabético, antioxidante e anti-inflamatório (ALI et al., 2015). Uma série de derivados provenientes da galantamina apresentaram neuroproteção significativa contra a neurotoxicidade induzida por *N*-metil *D*-Aspartato (NMDA) (SIMONI et al., 2012). Além dos bons resultados em testes contra sintomas de doenças psiquiátricas como esquizofrenia, depressão, transtornos bipolares e dependências químicas como etilismo e cocaína (AGO et al., 2011).

A galantamina já foi encontrada em espécies dos gêneros *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Ungernia*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Zephyranthes*, *Hymenocallis*, e *Haemanthus*. Atualmente, esse composto é extraído principalmente de *Narcissus sp* na Europa Ocidental, *Leucojum aestivum* no Leste da Europa, *Lycoris radiata* na China, *Ungernia victoria* no Uzbequistão e no Cazaquistão (BERKOV et al., 2009). Mesmo tendo sua síntese química bem consolidada, os rendimentos são relativamente baixos em relação à grande demanda, por isso as plantas continuam sendo as principais fontes desse importante produto natural (AGO et al., 2011).

Medicamentos à base de galantamina são fabricados por grandes laboratórios farmacêuticos tais como Jansen-Cilag (Reminyl[®]) e Sandoz, e distribuídos em mais de 70 países (HEINRICH et al., 2004). O mercado mundial de drogas de Alzheimer é atualmente estimado em mais de \$ 4,2 bilhões e está crescendo rapidamente devido ao envelhecimento demográfico (NEURODYN, 2017). A empresa britânica Agroceutical Products cultiva narcisos e extrai galantamina de fonte própria bem como de produtores locais e internacionais (“terceirizados”) que atendem aos seus critérios de plantio, cultivo, colheita, armazenagem e processamento. Além disso, essa empresa declara ter desenvolvido um método pioneiro de extração de galantamina de modo escalonável e de baixo custo (AGROCEUTICAL PRODUCTS, 2017). As vendas de galantamina estão atualmente acima de US\$ 500 milhões por ano, com a necessidade clínica crescendo a 14% ao ano somente no Reino Unido (FRASER, 2018). No

Brasil, o consumo de galantamina apresenta tendência de crescimento: a quantidade consumida em 2013 aumentou quinze vezes em relação a 2008 (COSTA et al., 2015).

Como a principal fonte de obtenção da galantamina são as plantas (HANKS, 2015), principalmente os bulbos de Amaryllidaceae, espécies nativas brasileira como *Hippeastrum elegans* (sinonímia *Hippeastrum solandriflorum*), conhecida popularmente como açucena, são encontradas em áreas de cerrado e caatinga (ALVES-ARAÚJO et al., 2009), podem ser utilizadas na produção de bulbos para obtenção comercial deste fitofármaco.

1.5 Propriedades farmacológicas e biológica dos alcaloides sanguinina, pseudolicorina e narciclasina

Sanguinina. que tem um grupo hidroxila no C-9, em vez de um grupo metoxila, mostrou-se 10 vezes mais ativo que a própria galantamina em ensaios *in vitro* (GUO, 2015).

A pseudolicorina apresentou atividade virostática marcante sobre os vírus da herpes simples e da poliomielite tipo 1, além de ação antiparasitária contra *Plasmodium falciparum* (malária) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (tripanossomíase humana africana (JAVIER, 2008), contra *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) (OSORIO et al., 2010), além de diversas atividades biológicas entre elas inibição específica da biossíntese de ácido ascórbico em plantas, inibição da síntese de DNA e as síntese protéica em células tumorais *in vitro* (SEBBEN, 2005).

A narciclasina é um dos mais bioativos alcaloides de Amaryllidaceae, exibindo atividades proapoptóticas e citotóxicas marcantes. Narciclasina apresentou valores de IC50 entre 30-100 nM contra linhagens celulares de melanoma (BORRA et al., 2018; JIN et al., 2013). Além disso, a narciclasina exibe um efeito adjuvante profilático para artrite em cobaias. O alcaloide é ativo contra o *Corynebacterium fascians*, inibe a levedura patogênica *Cryptococcus neoformans* e modifica o crescimento da bactéria patogênica *Neisseria gonorrhoeae*. A atividade antiviral foi observada contra flavivírus contendo RNA e bunyavírus. (GUO, 2015).

1.6 Métodos de extração de galantamina entre outros alcaloides de Amaryllidaceae

Até agora, várias técnicas de extração de galantamina entre outros alcaloides em plantas já foram relatadas, tais como: extração sólido-líquido por micro-ondas (KATOCH et al., 2012), sólido-líquido por ultrassom (GOTTI et al., 2006), extração acelerada com solvente

(ASE) (MROCZEK, 2009), extração sólido-líquido em condições ambiente (YING et al., 2016) e extração sólido-líquido suportada por líquido iônico (SVINYAROV et al., 2016). Abaixo, serão descritos os três métodos de extração avaliados nesse trabalho.

1.6.1 Microextração sólido-líquido

Nos últimos anos, miniaturização de técnicas de extração surgiram e se desenvolveram continuamente, a microextração sólido-líquido assistida por ultrassom tem como vantagens: baixo consumo de solvente, utilização de pequenas alíquotas de amostra sólida, realização de várias extrações simultaneamente, operação simples, baixo custo, facilidade de desenvolvimento de métodos e disponibilidade para praticamente todos os laboratórios analíticos (GOUDARZI et al., 2017). Uma das técnicas modernas mais empregadas que viabiliza a redução de tempo e de solvente é a extração assistida por ultrassom, onde a solução extrativa é submetida a ondas ultrassônicas, que geram minúsculas bolhas intracelulares responsáveis pelo aumento da pressão e da temperatura interna de forma a aumentar a turgescência das células até causando colapso e o extravasamento do conteúdo metabólico. É usado com sucesso para desativar enzimas, ajuda a extração, homogeneizar emulsões e acelerar a desidratação e o efeito do poder ultra-sônico sobre o rendimento de extração de alcalóides no bulbo de *Lycoris radiata* foi estudado em Deng et al., (2011), a eficiência de extração obteve o rendimento máximo em uma potência de 140 W. No entanto, uso prolongado da maceração, assistida por ultrassom aumenta a possibilidade da formação de radicais com potencial de degradar os compostos termodinamicamente instáveis. Também, aumenta a temperatura e pressão interna da célula vegetal, que pode promover a formação de bolhas de sonicação que conduz a compressão e rarefação intermitentes até o colapso de bolhas. O aumento da temperatura e pressão na vizinhança das cavidades colapsadas é a base para alterar a conformação de metabolitos e sua reatividade (BERMUDEZ-AGUIRRE, 2017).

1.6.2 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (ELL) é uma das mais antigas técnicas de enriquecimento e isolamento que ainda é usada em numerosos procedimentos analíticos. No entanto, a técnica ELL utiliza grandes quantidades de solventes orgânicos caros e tóxicos. As

últimas tendências de pesquisa incluem a miniaturização do tradicional sistema de extração líquido-líquido, cujo objetivo principal é diminuir a relação volumétrica das fases.

1.6.3 Extração em fase sólida

Uma alternativa interessante para os métodos tradicionais de ELL é a extração em fase sólida (SPE), devido ao seu manuseio mais simples, menor consumo de solventes orgânicos e limpeza satisfatória das amostras (GOUDARZI et al., 2017). A SPE é uma alternativa econômica para extrações líquido-líquido, pois usa menos solução extratora, é mais rápida e produz menos resíduos. A SPE é uma técnica de preparação de amostras preferida em comparação à extração líquido-líquido por oferecer recuperações mais altas e mais reprodutíveis; é mais eficaz como ferramenta de limpeza; e é mais automatizável (NIGEL, 2000; ÖTLES, 2016).

1.7 Métodos de quantificação de galantamina entre outros alcalóides de Amaryllidaceae

Muitos métodos analíticos de quantificação da galantamina, entre outros alcalóides da família das Amaryllidaceae baseados em GC-FID (CONFORTI et al., 2010), GC-MS, NACE (GOTTI et al., 2006), HPLC-UV (KHONAKDARI et al., 2017), HPLC-DAD (EMIR, et al., 2016), HPTLC (ABOU-DONIA et al., 2008b) e UPLC-MS (KATOCH et al., 2012), já foram relatados. Essa última técnica é a mais moderna e a mais promissora, por isso será detalhada aqui.

Apesar de seu alto custo, o UPLC-MS se tornou popular nos últimos anos, graças a vantagens como alta sensibilidade, rapidez e amplas aplicações. UPLC consiste em um sistema cromatográfico de ultra-pressão operando em uma faixa de 6000-15000 psi, equipado com uma coluna empacotada com partículas de 1,7 μm , portanto, esse método permite uma melhor resolução, picos com formato melhorado (maior sinal-ruído (S/N) proporção) e uma corrida cromatográfica mais curta. Além disso, a sensibilidade é significativamente aprimorada quando o UPLC é hifenizado em um detector do tipo espectrômetro de massa. Além disso, a análise MS fornece mais informações estruturais sobre o perfil químico do que os detectores cromatográficos convencionais, permitindo uma identificação mais confiável (ZHAO et al., 2015). Para análises quantitativas de MS, o método de escolha baseia-se em sistemas *tandem*, compostos principalmente por detectores de triplo quadrupolo, uma vez que maior sensibilidade

é alcançada através do monitoramento de transições de íons específicos (o chamado monitoramento de reação múltipla - MRM). Essa abordagem foi empregada com sucesso para analisar fármacos como a galantamina em matrizes biológicas (WANG et al., 2018). Como alternativa, é possível filtrar o m/z de um alvo direcionado utilizando um único detector MS. De fato, esse método conhecido como SIM (monitoramento de íons selecionados) não é tão sensível quanto o MRM, no entanto, seu custo-benefício o torna atraente para muitas aplicações (YAO et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Investigar potenciais fontes tropicais de galantamina e de outros AA bioativos, determinando-se as composições químicas de bulbos de uma Coleção de Amarilidáceas da Embrapa (CAE) e de *H. elegans* cultivados, correlacionando-as com a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (anti-AchE).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar uma nova metodologia de quantificação por meio de cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS-QDA) na análise dos alcaloides galantamina, pseudolicorina, sanguinina e narciclasina em bulbos de Amaryllidaceae;
- Quantificar alcaloides supracitados em bulbos da Coleção de Amaryllidaceae da Embrapa (CAE) e bulbos cultivados de *Hippeastrum elegans*;
- Investigar a influência da época de colheita na composição química de bulbos cultivados de *Hippeastrum elegans*.
- Avaliar a atividade anti-AchE em extratos de bulbos da CAE e de *H. elegans* através de ensaios *in vitro* e *ex vivo*.
- Determinar os perfis químicos dos bulbos de *H. elegans* por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-QTOF-MS) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)
- Identificar biomarcadores nos bulbos cultivados de *H. elegans*, correlacionando os dados de UPLC-QTOF-MS e de RMN ¹H com os valores de atividade anti-AchE através do método quimométrico de regressão parcial por mínimos quadrados (PLS).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho, exceto os testes de inibição de acetilcolinesterase, foram realizados no Laboratório Multiusuário de Química e Produtos Naturais (LMQPN) localizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical).

3.1 Instrumentação

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

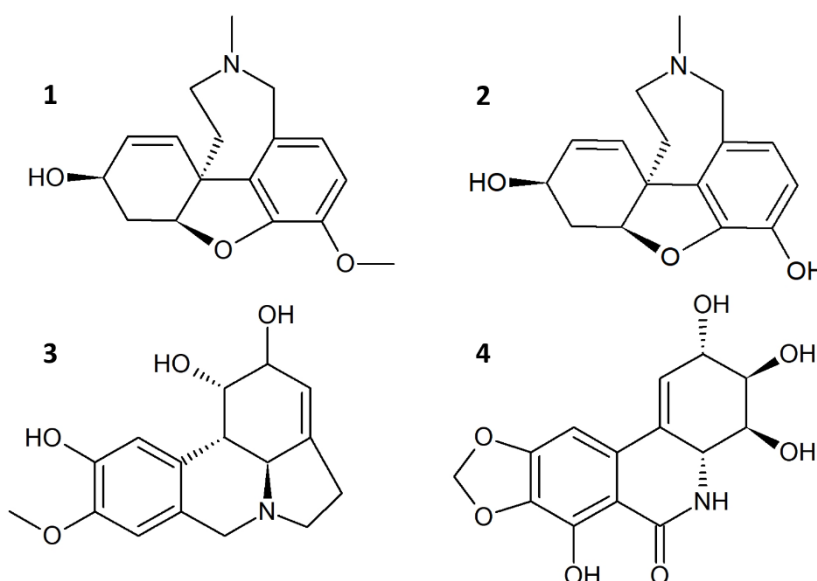
- Balança analítica (AUW220, Shimadzu);
- Banho ultrassom de potência fixa de 135 W (Q3.0L, Eco-sonics);
- Bomba de vácuo (PM-13195-820.3, Edwards);
- Espectrofotômetro de placa (ELX 800, Biotek);
- Estufa com circulação e renovação de ar (SL102, Solab)
- Estufa de secagem (SL100, Solab);
- Manifold para SPE 12 posições (Vac Elut, agilent);
- Moinho de facas tipo Willye (Star FT80, Fortinox);
- Rotaevaporador (R-210/215, Buchi);
- Ultrafreezer (CL200-86V, Coldlab);
- Vortex para agitação de tubos de ensaio (mod.772, Fisatom).

3.2 Materiais e reagentes

O padrão analítico de galantamina (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA), enquanto os padrões de pseudolicorina, sanguinina e narciclasina foram isolados de *Hippeastrum elegans* com pureza de 90 a 95%, como mostra a Figura 6, (CARVALHO et al., 2015). Os compostos isolados tiveram sua pureza calculada por análise semiquantitativa expressa pelo método da normalização de área, utilizando um detector de arranjo de diodos (PDA) exploratório de 210 a 900 nm, onde foram obtidos os cromatogramas de cada padrão, Figura 7. Foram utilizados cartuchos para extração em fase sólida (SPE) por mecanismo de troca catiônica (SCX), modelo Bond Elut-SCX (3 ml), asorvente (100 mg) constituído pela resina do polímero de divinilbenzeno modificado com ácido sulfônico adquirido da Agilent Technologies (EUA). Foram utilizados também:

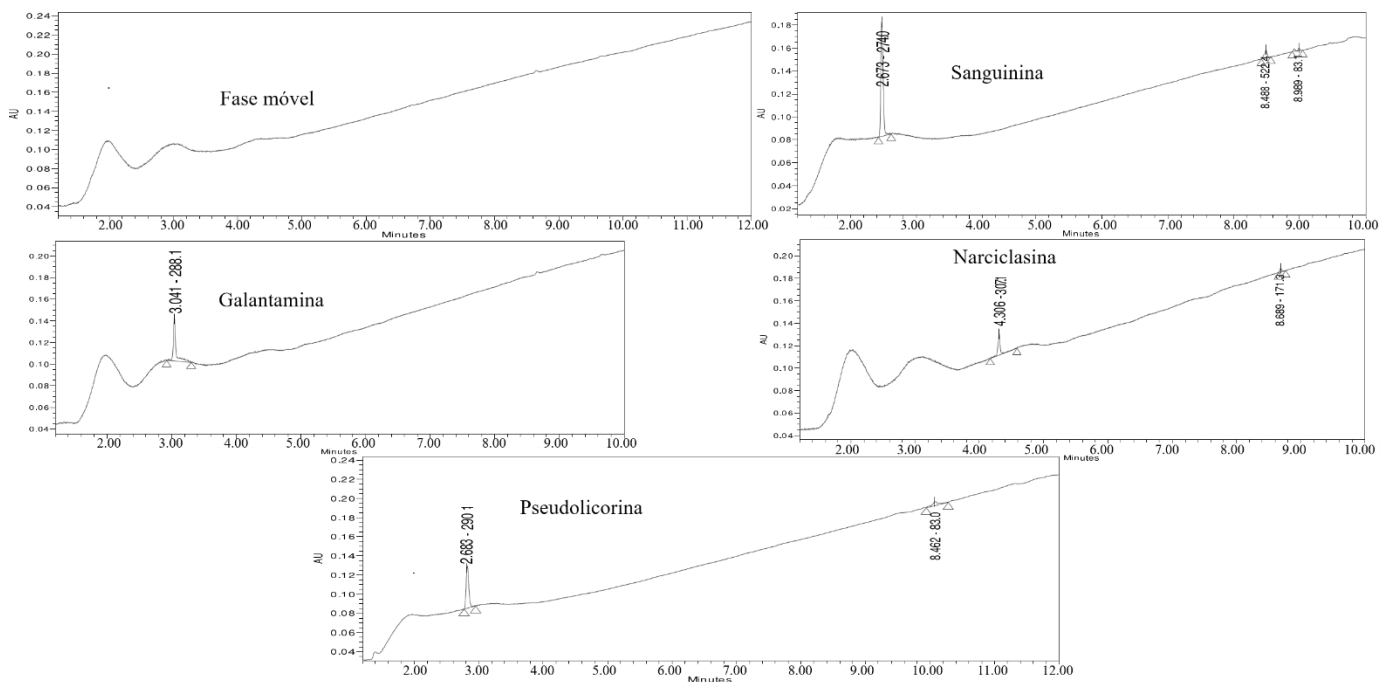
- Acetonitrila grau LC (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido fórmico (ROE Scientific INC., EUA);
- Ácido sulfúrico 96% (Synth, SP, Brasil);
- Água ultrapura (18,2 MΩ cm a 25 ° C) Millipore Alpha-Q (Millipore, Bedford, EUA);
- Espátulas (Lab1000);
- Estante para tubos de ensaio (Labpls);
- Filtros de PTFE de tamanho de poro 0,22 μm (Analítica);
- Hexano grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Hidróxido de amônio 30% (Dinâmica, SP, Brasil);
- Kit de ensaio de atividade de Acetilcolinesterase (MAK119, Sigma-Aldrich);
- Metanol grau LC (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Metanol deuterado (Cambridge Isotope Lab);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (LAB MATE e Eppendorf);
- Microplaca de 96 poços (Eppendorf);
- Pipetas de Pasteur de vidro (mod.19150, Precision);
- Seringa de vidro com agulha, 1 mL (Hamilton);
- Tubos de ensaio de 15 mL com tampa (Uniglas);
- Tubos de penicilina (BEST-9004, MELHOR);
- Vials para UPLC-MS 2,0 mL, 12 x 32 cm (Agilent Technologies);
- Vidrarias auxiliares: proveta, becker, erlenmeyer e balão volumétrico;

Figura 6. Estrutura dos padrões de alcaloides: (1) galantamina, (2) sanguinina, (3) pseudolicorina, (4) narciclasina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 7. Cromatograma dos padrões pelo método PDA exploratório de 210 a 900 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

3.3 Materiais vegetais

3.3.1 Materiais de *Hippeastrum elegans* para experimento agrônômico

As coletas de açucena silvestre foram realizadas no final do mês de janeiro/2016 na localidade Estação das flores, pertencente ao município de Pacatuba, CE (Brasil). O clima desse município caracteriza-se como tropical quente do semiárido, com pluviometria média de 1.433 mm, coordenadas geográficas: Latitude: 03° 59' 03" S, Longitude: 38° 37' 13" W e Altitude de 65 m. Por ocasião da coleta, foram escolhidas plantas isentas de danos mecânicos, ataques de pragas e incidência de doenças. Uma exsicata (#60672) desse material encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (Universidade Federal do Ceará).

3.3.2 Materiais botânicos da coleção de *Amaryllidaceae*

As espécies estudadas pertenciam à coleção de *Amaryllidaceae* (Embrapa Recursos Genéticos, Brasília-DF, Sisgen nº A3A7543), a qual foi formada a partir de materiais coletados de várias localidades do Brasil (Quadro 2). Exemplos desses materiais foram cedidos para

Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram transplantados pela pesquisadora Dra. Rita de Cássia Alves Pereira.

Quadro 2. Amaryllidaceae coletadas com seus respectivos locais de coleta e massas frescas e secas de bulbos (*continua*).

Gênero	Espécie	Código	Local de coleta (01-03/2016)	Massa de bulbo fresco/seco (g)
<i>Habranthus</i>	<i>H. bahiensis</i> Ravenna	HB1	Palmeirante (TO)	13,0100 1,36320
		HB2	Palmeirante (TO)	7,2600 0,8282
	<i>Habranthus sylvaticus</i> Herb.	HS1	Barra do ouro (TO)	2,5279 0,2976
		HS2	Divinópolis (GO)	29,8896 3,7570
	<i>H. irwinianus</i> Ravenna	HI1	Alto Paraíso (GO)	8,5100 1,2411
		HI2	Darcinópolis (TO)	11,1024 1,7194
		HI3	Barbaculândia (TO)	1,9103 0,8477
		HI4	Carolina (MA)	11,4472 2,1934
		HI5	Carolina (MA)	14,0700 2,1593
		HI6	Carolina (MA)	14,0700 2,1593
		HI7	Darcinópolis (TO)	23,9600 3,9587
		HI8	Darcinópolis (TO)	25,2100 4,1809
	<i>Habranthus lucidus</i> R.S. Oliveira	HL1	Filadélfia (TO)	7,4700 1,0430
	<i>Habranthus datensis</i> Ravenna	HD1	Alto Paraíso de Goiás	12,8300 1,4869
		HD2	Alto Paraíso de Goiás	12,2700 1,7329
	<i>Habranthus gracilifolius</i> Herb.	HG1	Esmeralda (RS)	20,5400 2,4014

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Quadro 2. Amaryllidaceae coletadas com seus respectivos locais de coleta e massas frescas e secas de bulbos (*continuação*).

Gênero	Espécie	Código	Local de coleta (01-03/2016)	Massa de bulbo fresco/seco (g)
<i>Habranthus</i>	<i>Habranthus cf. irwinianus</i> Ravenna	HI9	Arraias (TO)	29,8896 3,7570
	<i>Habranthus sp.</i>	Hsp1	Brasília (DF)	26,5100 4,7985
		Hsp2	Filadélfia (TO)	17,5300 2,6529
		Hsp3	Porto Velho (RO)	44,1500 7,9310
		Hsp4	Filadélfia (TO)	35,1300 5,8005
		Hsp5	Palmeiras do Tocantins	16,7700 2,7905
		Hsp6	Alto Paraíso de Goiás	33,9500 4,7507
		Hsp7	Feira de Santana (BA)	10,9700 1,3919
		Hsp8	Palmeiras do Tocantins	29,6700 4,7640
<i>Hippeastrum</i>	<i>H. cf. Puniceum</i>	HicP1	Niquelândia (GO)	3,2400 0,6876
	<i>H. reginae</i> (L.) Herb.	HiR1	Colinas do Sul (GO)	8,4200 1,5958
	<i>H. cf. elegans</i> (Lindl.) Herb	HiE1	Capão Alto (RS)	136,8500 33,2471
	<i>H. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	HiP1	Monte Alegre de Goiás	12,1866 2,6898
		HiP2	Divinópolis de Goiás	6,3300 0,8862
		HiP3	Palmeirópolis (TO)	12,6997 2,0255
		HiP4	Divinópolis de Goiás	1,5115 0,2329
<i>H. glaucescens</i> (Mart.) Herb.	HiG	Porto Velho (RO)	3,3900 0,6899	
<i>H. puniceum</i>	HicP	Divinópolis de Goiás	1,5115 0,2329	

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Quadro 2. Amaryllidaceae coletadas com seus respectivos locais de coleta e massas frescas e secas de bulbos (*continuação*).

Gênero	Espécie	Código	Local de coleta (01-03/2016)	Massa de bulbo fresco/seco (g)	
<i>Hippeastrum</i>	<i>Hippeastrum sp.</i>	Hisp1	Cavalcante (GO)	21,6654 3,6391	
		Hisp2	Brasília (DF)	13,1202 1,7872	
		Hisp3	Brasília (DF)	10,7170 1,5691	
		Hisp4	Cavalcante (GO)	21,6654 3,6391	
		Hisp5	Lages (SC)	33,4450 6,9867	
		Hisp6	Lages (SC)	51,0200 13,8894	
		Hisp7	Porto Velho (RO)	123,0300 42,7900	
		Hisp8	Alvorada do Norte (GO)	5,9700 1,1506	
		Hisp9	Carolina (MA)	4,9015 0,8477	
		Hisp10	Paraná (TO)	29,1232 2,7375	
		Hisp11	Porto Velho (RO)	55,9369 8,5115	
		Hisp12	Campinaçu (GO)	19,7560 2,4889	
		Hisp13	Minaçu (GO)	16,4105 1,1630	
		<i>H. goianum</i> (Ravenna) Meerow	Hig1	Brasília (DF)	72,9748 14,5897
			Hig2	Alto-Paraíso (GO)	37,6800 5,0763
		<i>H. cf. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	Hip5	Alvora do Norte (GO)	20,2332 3,1649
	Hip6		Brasília (DF)	8,6500 1,1570	
	Hip7		Minaçu (GO)	4,0500 0,6131	

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Quadro 2. Amaryllidaceae coletadas com seus respectivos locais de coleta e massas frescas e secas de bulbos (*continuação*).

Gênero	Espécie	Código	Local de coleta (01-03/2016)	Massa de bulbo fresco/seco (g)
Sem classificação	-	SC1	-	36,7140 5,6695
	-	SC2	Minaçu (GO)	16,0500 3,8940
	-	SC3	-	51,2811 8,1415
	-	SC4	Alvorada do Norte (GO)	25,2111 2,9789
	-	SC5	Alvorada do Norte (GO)	10,6354 1,0541
<i>Hymenocallis</i>	<i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb.	HyL1	Porto Velho (RO)	18,3800 3,8052
<i>Zephyranthes</i>	<i>Zephyranthes</i> sp.	Zsp1	São Desidério (BA)	7,6500 0,7601
		Zsp2	São Desidério (BA)	6,3000 0,6795
		Zsp3	Carolina (MA)	13,2400 1,5899
		Zsp4	Carolina (MA)	10,9800 1,6997
	<i>Zephyranthes robusta</i> (Herb. ex Sweet) Baker	ZR1	Celso Ramos (SC)	10,0800 1,0292
<i>Griffinia</i>	<i>Griffinia nocturna</i> Ravenna	GN1	Paraná (TO)	22,9500 3,1980
		GN2	Paraná (TO)	3,6260 0,3943
	<i>Griffinia</i> sp.	Gsp1	Guarani de Goiás	37,3500 5,3734
		Gsp2	Paraná (TO)	23,9688 3,8445

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

3.4 Experimento agrônômico com *Hippeastrum elegans*

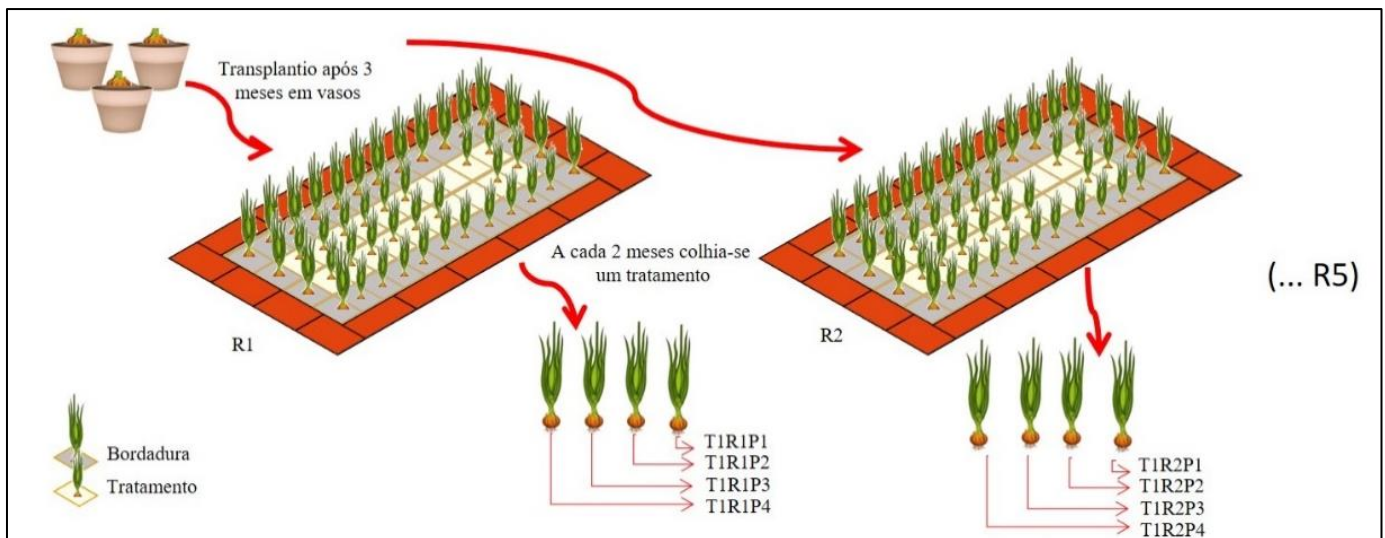
O experimento agrônômico foi conduzido na sede da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE, Latitude 03°45' 04,7" e Longitude 38°34' 38,1"), no período de janeiro/2016 a junho/2017. A produção das mudas foi realizada em viveiros cobertos com

sombrite 50% de iluminação durante 90 dias. Os bulbos foram plantados em vasos plásticos com capacidade de 5 L preenchidos com uma mistura constituída de substrato comercial com areia e vermiculita na proporção 3: 2: 1.

O transplântio foi realizado no início de maio/2016, em canteiros de alvenaria com dimensões de 8 m de comprimento por 1m de largura, previamente adubados com 20 L de húmus de minhoca/metro linear. O espaçamento utilizado foi de 30 cm entre plantas e 30 cm entre fileiras. As covas de plantio possuíam 20 cm de largura x 20 cm de altura e 20 cm de profundidade. A irrigação realizada nas plantas foi por gotejamento. Durante todo o período de cultivo, foram feitas capinas em número suficiente para o controle de plantas espontâneas. O solo permaneceu protegido pela camada de matéria seca proveniente das próprias capinas realizadas. As coletas das plantas iniciaram 90 dias após o plantio das mudas de açucena nos canteiros (Figura 8).

O experimento consistiu em seis tratamentos (épocas de colheita) com cinco replicatas, cada uma contendo quatro indivíduos. A cada 60 dias colhia-se um tratamento de *Hippeastrum elegans* (Figura 9), conforme esquema ilustrativo da Figura 8: 150, 210, 270, 330, 390 e 450 dias.

Figura 8. Esquema resumido ilustrando o experimento agrônômico.



Fonte: Elaborada por Ana Sheila de Queiroz Souza (2019).

Figura 9. *Hippeastrum elegans* (açucena) em canteiro da Embrapa Agroindústria Tropical, data do registro 09 de janeiro de 2017.



Fonte: foto registrada por Ana Sheila de Queiroz Souza (2019).

Após cada colheita, as plantas foram separadas por parte (raiz, bulbo e folhas), lavadas, pesadas e cortadas em partes menores e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C até obter peso constante. Após a secagem, os quatro indivíduos de cada replicata foram pesados separadamente, em seguida foram reunidos (amostra composta) e pulverizados em moinho de facas (Figura 10).

Figura 10. Beneficiamento de açucena com bulbo, raízes e folhas. (a) Material fresco, (b) material fatiado e fresco, (c) material fatiado e seco.



Fonte: foto registrada por Ana Sheila de Queiroz Souza (2019).

3.5 Cultivo de espécies da coleção de Amaryllidaceae

O plantio foi realizado em jarros de 5 L preenchidos com uma mistura constituída de substrato comercial de areia mais vermiculita na proporção 3: 2: 1. As plantas foram cultivadas por doze meses. Então, os materiais foram colhidos e separados em raiz, bulbo e folhas (quando presente), e lavados com água destilada para remoção de sujidades, pesados e cortados em partes menores (Figura 10). Em seguida, foram secos a 40° C em estufa de secagem com circulação de ar forçada, até obter peso constante. Os materiais secos foram triturados em moinhos de facas, embalados em sacos plásticos, lacrados e conservados em local com baixa umidade.

3.6 Condições cromatográficas

3.6.1 Condições das análises por UPLC-QTOF-MSE

As análises dos padrões galantamina, sanguinina, pseudolicorina, narciclasina, listado na Tabela 3, e extratos de Amaryllidaceae foram realizadas em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QTOF, Waters) (Figura 11). As corridas cromatográficas foram efetuadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, volume de injeção de 5 µL. A fase móvel empregada foi água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B).

A condição do massa de alta resolução – XEVO-QTOF: modo positivo (ESI⁺) foi adquirido na faixa de 110 a 1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L h⁻¹, cone de extração 0,5 V e voltagem do capilar de 3,2 kV. O modo de aquisição foi MS^E, modo centroide. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation). As condições cromatográficas em UPLC-QTOF-MS^E foram transferidas para um sistema UPLC-QDA.

Tabela 3. Massa exata dos padrões galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina (UPLC-QTOF-MS) e íons de monitoramento correspondentes com janelas de tempo (UPLC-QDA-SIM).

Compostos	UPLC-QTOF-MS ^E						UPLC-QDA-SIM			
	t _R (min)	Propriedades físico-químicas	[M + H] ⁺ m/z	Produtos de ionização	Fórmula molecular	Erro (ppm)	t _r (min)	[M + H] ⁺ m/z	Janela de tempo (min)	Referência
Galantamina	2,94	p.f: 269-270°C ¹ CS.: 10 mg/mL pKa: 14,81 LD ₅₀ :75 mg/kg	288,1266	270/231/ 225/213/17	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	4,3	2,96	288,1	2,5-3,5	ZHANG; CHEN, 2013
Pseudolicorina	2,28	LD ₅₀ :110 mg/kg ² p.f: 230-233°C ¹	290,1400	290/272/ 228/254	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	1,8	2,22	290,1	1,6-2,6	LI et al., 2019
Sanguinina	2,30	p.f : 227-230°C ³	274,1443	199/184/24	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	0,0	2,12	274,1	1,6-2,6	MROCZEK, 2016
Narciclasina	3,89	p.f : 227-230°C ⁴ CS: 10mg/mL pKa: 7.72 LD ₅₀ : 5 mg/kg	308,0777	272/244/214/186/ 172	C ₁₄ H ₁₂ NO ₇	2,3	4,45	308,0	4,0-5,0	KATOCH et al., 2012

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Siglas: p.f = ponto de fusão (°C); CS: coeficiente de solubilidade (mg/ml em água); pKa: potencial ácido; LD₅₀ dose letal mediana.

1: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/galantaminehydrobromide36827195304411?lang=pt®ion=BR>; 2: <https://www.biocrick.com/Pseudolycorine-BCN5371.html>; 3: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sanguinine>; 4: https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=narciclasine.

Figura 11. Sistema UPLC-QTOF-MS^E utilizado no trabalho.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

3.6.2 Desenvolvimento do método cromatográfico usando UPLC-QDA-SIM

As análises dos padrões dos alcaloides (Tabela 3) e as soluções dos extratos de Amarillidaceae foram realizadas através de um sistema ACQUITY UPLC[®] (Waters Corp, Milford, MA, USA), Figura 12. A separação foi efetuada em coluna BEH C18 (150 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 1,7 μm) (Waters Crop, Milford, MA, USA). Os parâmetros finais estabelecidos foram: temperatura da coluna a 40 °C, volume de injeção de 5 μL e temperatura da amostra de 20 °C. Utilizou-se uma combinação de solventes contendo 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B) com vazão de 0,4 mL min⁻¹. O gradiente estabelecido está representado na Tabela 4.

Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo numa gama de massa entre m/z 110 a m/z 1180. O método no modo SIM foi estabelecido utilizando: gás de dessolvatação N₂ (600 L/h), cone de extração 15 V e voltagem do capilar de 0,8 kV. As massas $[\text{M} + \text{H}]^+$ e as janelas de tempo dos padrões de alcaloides estão representadas na Tabela 3.

Figura 12. Sistema UPLC-QDA utilizado no trabalho.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 4. Gradientes estabelecidos em UPLC-QTOF e UPLC-QDA: 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B).

UPLC-QTOF			UPLC-QDA		
Tempo (min)	%A	%B	Tempo (min)	%A	%B
0,00	98	2	0,00	98	2
15,00	5	95	5,00	67	33
15,01	0	100	5,01	0	100
17,00	0	100	7,00	0	100
17,01	98	2	7,01	98	2
21,01	98	2	10,31	98	2

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

3.7 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras foram preparadas solubilizando 2 mg em 600 μ L de MeOD (Cambridge Isotope Lab). As experiências de RMN foram realizadas em um espectrômetro Agilent de 600-MHz equipado com uma detecção inversa de 5 mm One ProbeTM com z-

gradiente ativamente blindado. Os espectros de ^1H RMN foram adquiridos usando a sequência de pulsos PRESAT para supressão de água (δ 4,75). Os dados foram obtidos em quintuplicatas, usando as seguintes condições quantitativas: pulsos calibrados a 90° , 32 varreduras, 64 k de pontos no domínio do tempo com uma janela espectral de 20,0 ppm, tempo de aquisição de 5,325 s, atraso de relaxamento de 20 s. O valor pré-fixado para o ganho do receptor foi alcançado previamente pela comparação entre espectros usando a mesma relação sinal/ruído, que foi usada para todas as aquisições. A temperatura foi controlada para 298 K. Os espectros foram processados aplicando multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz e transformada de Fourier de 64 k pontos. A identificação dos alcaloides foi realizada por RMN 2D (*g*-COSY, *g*-HSQC e *g*-HMBC), além de comparação com dados da literatura (CARVALHO *et al.*, 2015).

3.8 Otimização do método de extração de alcaloides e preparo de amostra

Esta etapa teve como objetivo determinar a metodologia de extração e preparo de amostra mais eficiente para os alcaloides de Amaryllidaceae de modo a maximizar a extração dos mais variados alcaloides. As análises foram realizadas em UPLC-QDA-SIM.

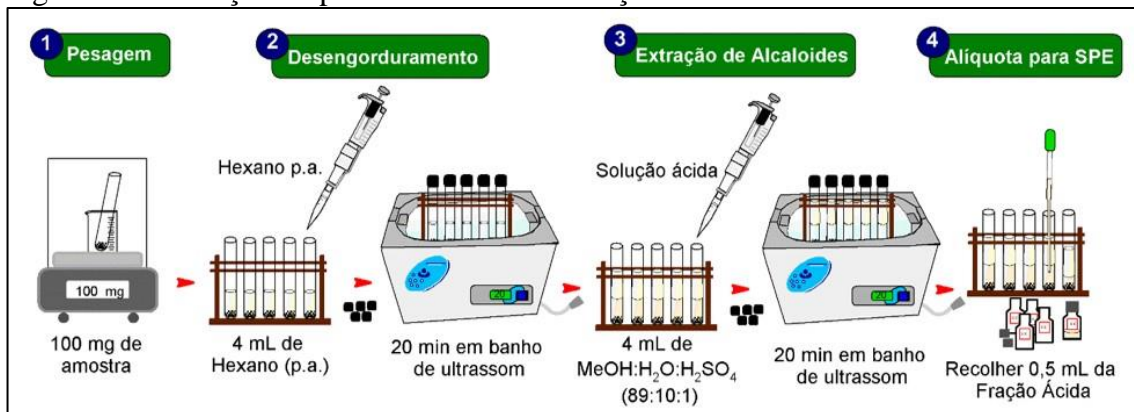
O material botânico selecionado da coleção da embrapa para as extrações e preparo de amostra foi *Hippeastrum elegans* (subseção 3.3.2) em virtude de conter galantamina e os mais variados alcaloides do gênero. Para as análises comparativas foram monitorados os alcaloides galantamina, sanguinina, narciclasina e pseudolicorina.

Neste estudo foram investigados três métodos de extração, todos assistidos por banho ultrassônico: microextração sólido-líquido em banho ultrassônico (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015; SVINYAROV, 2016; NEHME *et al.*, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2016), partição líquido-líquido (GUO *et al.*, 2016) e microextração sólido-líquido seguido de extração em fase sólida (SPE) por mecanismo de troca catiônica, utilizando-se Bond Elut-SCX, 3 mL, 100 mg (REINWALDT, 2017). Os experimentos foram realizados com cinco replicatas e ao final todas as soluções foram evaporadas sob pressão reduzida em rota-evaporador a 100 rpm e 40°C . Os extratos obtidos foram ressuspensos em 1 mL de metanol e filtrados através de uma membrana de filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ para serem alisados em UPLC-QDA-SIM. Os dados experimentais relativos aos sinais das áreas cromatográficas foram submetidos à análise de variância de único fator (ANOVA) seguido do método de múltiplas comparações de Tukey, utilizando o software PAleontological STatistics (Past)[®] versão 3.20, de acordo com o nível de confiança de cada período (95%).

3.8.1 Microextração

A extração de alcaloides por microextração sólido-líquido assistida por ultrassom foi adaptada de trabalhos da literatura (CHAGAS-PAULA et al., 2015; SVINYAROV, 2016; NEHME et al., 2008; SAMPAIO et al., 2016). O material vegetal seco em pó (100 mg) foi inicialmente macerado com 4 mL de hexano por 20 min em um banho de ultrassom à temperatura ambiente, depois foram adicionados 4 mL de uma solução ácida hidroalcoólica (1% de H₂SO₄, 10% de água destilada e 89% metanol), e deixada por mais 20 min em banho de ultrassom. Em seguida, a solução hidroalcoólica ácida (pH 2) foi recolhida e filtrada através de uma membrana de filtro de 0,22 µm antes das análises cromatográficas em UPLC-QDA-SIM, de acordo com esquema mostrado na Figura 13.

Figura 13. Ilustração do processo de microextração.



Fonte: Elaborada por Ana Sheila de Queiroz Souza (2019).

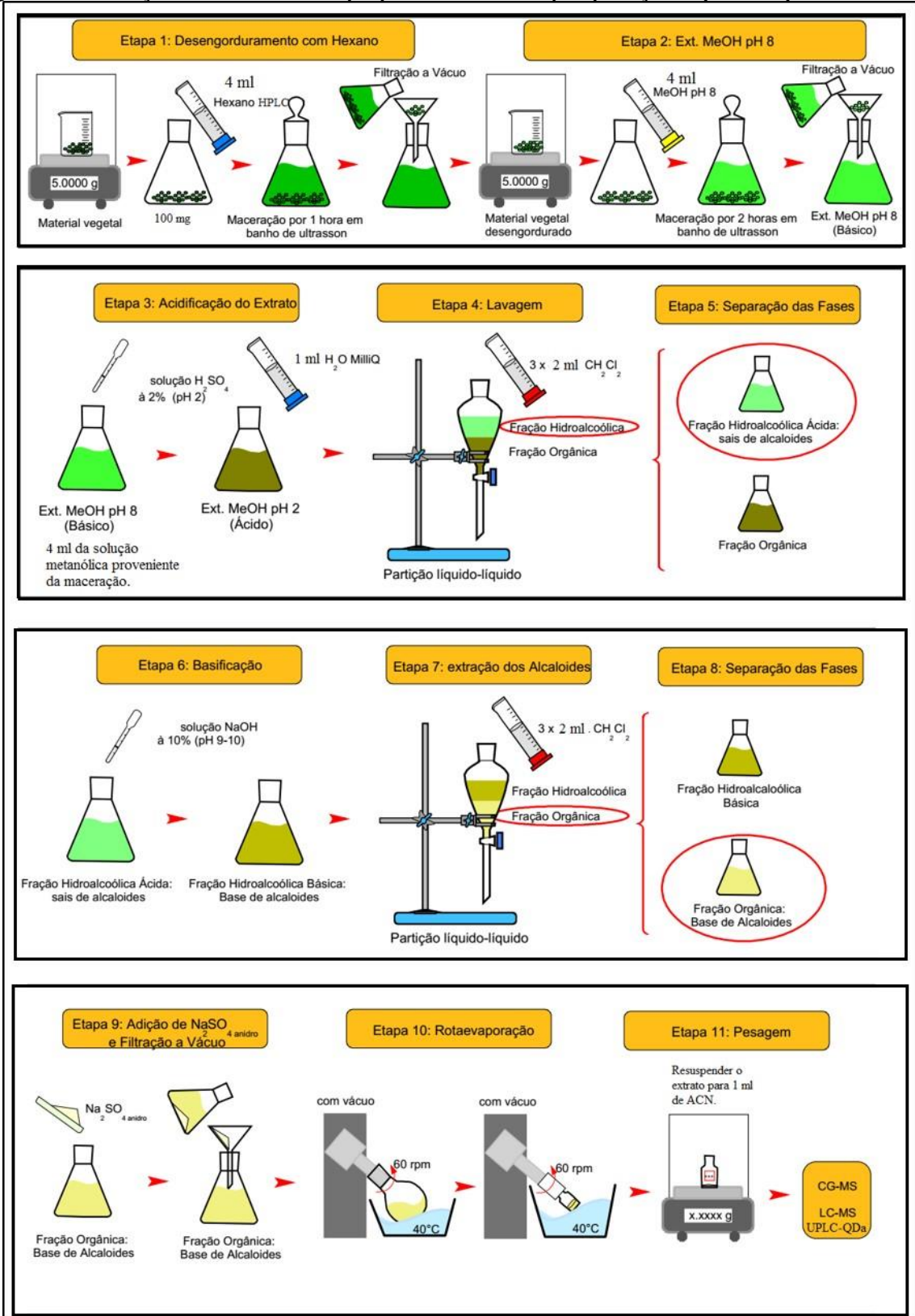
3.8.2 Partição líquido-líquido

A extração dos alcaloides se deu por maceração em banho ultrassônico de cinco replicatas realizadas com alíquota de 100 mg do bulbo seco em pó de *H. elegans*. Inicialmente adicionou-se 4 mL de *n*-hexano para remover lipídios e pigmentos da amostra. Após 1 hora de dissolução, o solvente foi descartado e o material vegetal foi filtrado a vácuo e uma solução alcalina de metanol (pH 8), preparada com hidróxido de sódio, foi adicionada e submetida novamente a extração em ultrassom por 2h.

Logo depois a solução metanólica básica foi filtrada a vácuo e sujeita as partições líquido-líquido. Inicialmente foi acrescentado 1 mL de água destilada a 4 ml da solução

alcoólica básica e acidificada para pH 2 (H_2SO_4 , 2%), sendo então particionada com 2 ml de diclorometano (3x CH_2Cl_2). Em seguida, a solução hidroalcoólica foi alcalinizada para pH 9-10 com NaOH e submetida novamente a partições com 2 ml de diclorometano (3x CH_2Cl_2). A solução orgânica foi tratada com Na_2SO_4 (anidro) e evaporada sob pressão reduzida em rota- evaporador a 100 rpm e 40 °C e ressuspensas em 1 mL de metanol e filtrada através de uma membrana de filtro de 0,22 μm antes das análises cromatográficas em UPLC-QDA-SIM, como demonstrado na Figura 14 (GUO et al., 2016).

Figura 14. Extração em ultrassom e preparo de amostra por partição líquido-líquido.



Fonte: Elaborada por Ana Sheila de Queiroz Souza (2019).

3.8.3 Microextração sólido-líquido seguida de extração em fase sólida (SPE)

Uma alíquota de 0,5 mL da solução extratora ácida hidroalcoólica (1% de H₂SO₄, 10% de água destilada e 89% metanol), proveniente da microextração (subseção 3.7.1), foi aplicada em cartuchos para extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) por mecanismo de troca catiônica (Agilent, Bond Elut - SCX, 3 ml, 100 mg). O método foi adaptado da literatura (REINWALDT, 2017) e teve como finalidade obter uma fração rica em compostos catiônicos, preferencialmente alcaloides. O cartucho inicialmente foi condicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de solução aquosa ácida (H₂SO₄ 0,05 M) e logo após introdução da amostra foi realizado o *clean-up* com 2 mL de água destilada e 2 mL de metanol para eluição dos compostos não básicos. Os 4 mL de eluato proveniente do *clean-up* foi coletado para o monitoramento do alcaloide narciclasina, que diferentemente dos outros alcaloides, não é um metabolito básico, por possuir um nitrogênio de amida (KORNIENKO et al., 2008). A eluição dos alcaloides foi realizada por aplicação de 4 x 2 mL de uma solução básica NH₄OH/metanol (25/75 v/v). Todas as eluições foram realizadas sob pressão reduzida a um fluxo de 1mL/min. Tanto as soluções do *clean-up* (4 mL água/metanol, 1/1) quanto as soluções da eluição dos alcaloides (8 mL NH₄OH/metanol, 25/75, v/v) foram filtradas através de uma membrana de filtro de 0,22 µm antes das análises cromatográficas.

3.9. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de alcaloides em bulbos de Amaryllidaceae

3.9.1 Preparação de padrões analíticos

Inicialmente, visando à obtenção de soluções analíticas estoque dos alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina, narciclasina foram preparadas soluções de 100 µg mL⁻¹ de cada alcaloide (10 mL), considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila e as soluções estoque foram armazenadas em frascos com tampa rosqueada e conservados em ultra-freezer a - 80 °C.

A partir das soluções-estoque, foi preparada uma mistura composta de todos alcaloides (10 mL), de modo que a concentração de cada analito fosse 10 µg mL⁻¹. Essa solução padrão foi utilizada para a preparação das soluções de trabalho empregadas para a curva de calibração.

3.9.2 *Curvas analíticas*

As curvas analíticas dos alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina foram construídas por meio de padronização externa usando metanol como solvente. Os níveis de concentração que compõem as curvas analíticas foram preparados a partir da solução com mistura de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada alcaloide, onde foi preparado soluções padrão nas concentrações: 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 e 1250 ng mL^{-1} . As áreas dos picos cromatográficos referentes aos íons foram usadas para os cálculos de quantificação. Cada solução padrão individual foi injetada três vezes durante dois dias no sistema cromatográfico sob as condições descritas na subseção 3.6.2.

3.9.3 *Validação do método*

O protocolo de validação foi estabelecido de acordo com o método recomendado pela *International Conference Harmonization (ICH)* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (ANVISA, 2018; SCHILLER et al., 1998; ICH, 2015). Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, recuperação, precisão inter e intradia, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

3.9.3.1 *Seletividade*

A seletividade foi avaliada através da análise de amostras em branco e amostras fortificadas com soluções padrão de galantamina, pseudolicorina, sanguinina e narciclasina com o auxílio do detector espectrômetro de massas (EM). Foi executada a avaliação da “pureza” dos picos cromatográficos relativos a cada um dos alcalóides, avaliando também a possível coeluição de componentes da matriz com os analitos de interesse.

3.9.3.2 *Linearidade*

O processo de validação da curva de calibração foi iniciado com o teste estatístico da falta de ajuste, avaliando a homocedasticidade dos dados pelo Teste de Hartley e analisando

cuidadosamente os resíduos deixados pelo modelo. Com o modelo ajustado, é realizado teste F de significância da regressão linear. O teste T de Student foi aplicado visando avaliar a significância estatística dos coeficientes angular e linear da equação da reta obtida (ICH, 2015).

3.9.3.3 Análise estatística

Antes de analisar os parâmetros de regressão linear, as curvas foram avaliadas em termos de homocedasticidade dos dados, levando em consideração o teste F de Hartley (F_{Hart}) e o gráfico dos resíduos, considerando a hipótese nula (H_0) em que as variâncias sejam todas iguais. Os valores do F_{Hart} foram obtidas pela seguinte equação (SKOOG et al., 2014; PIMENTEL et al., 1995):

$$F_{Hart} = \frac{S_{max}^2}{S_{min}^2}, \quad (1)$$

em que S_{max}^2 e S_{min}^2 é a maior e menor variância dos dados de calibração, respectivamente. Para que seus valores numéricos não sejam significativamente diferentes, o valor de F_{Hart} deve ser menor que o valor crítico correspondente ao grau de liberdade da regressão ao nível de confiança conhecido. Os valores críticos foram obtidos de valores tabelados, com nível de confiança de 95 % para $n - 1$ graus de liberdade em seis grupos, indicando que os resíduos da regressão são homocedásticos. Nas situações em que os erros apresentarem desvios sistemáticos, um modelo linear de calibração será considerado inadequado, e então, um modelo não linear deverá ser avaliado (JAMES, 2018).

Tão importante quanto fazer o teste F de Hartley é examinar os resíduos deixados pelo modelo. Num modelo ajustado, a função distribuição de probabilidade dos resíduos deve se aproximar de uma distribuição normal. Os resíduos foram calculados pela seguinte equação:

$$R = S_{exp} - S_{int}, \quad (2)$$

que é a diferença entre o desvio padrão dos dados experimentais (S_{exp}) e o desvio padrão dos dados interpolados (S_{int}) do modelo de regressão. Os dados dos resíduos foram apresentados em relação as concentrações das curvas analíticas (DA SILVA et al., 2015; JAMES, 2018; NETO et al., 2010).

3.9.3.4 Teste da significância estatística da regressão linear

Com um modelo ajustado, a análise da variância é aplicada para testar a significância estatística da equação de regressão linear. Para que seja comprovada a correlação

entre x e y (comprovação fundamental para a linearidade), é necessário demonstrar que a variação devida à regressão (modelo) é suficientemente maior que o erro (resíduos). Uma boa maneira de avaliar isso foi comparando a variância média da soma quadrática explicada no modelo ($QMReg$) pela a média da soma quadrática do resíduo ($QMRes$) expressa no seguinte teste F ($F_{(calculado)}$) da significância do modelo linear:

$$F_{(calculado)} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}} = \frac{QMReg}{QMRes}, \quad (3)$$

em que y_i é um valor individual de y obtido experimentalmente em um determinado ponto (i -ésimo ponto), \bar{y} é a média aritmética dos valores de y no centroide, \hat{y} é um valor individual de y calculado pelo modelo (equação) em um determinado ponto (i -ésimo ponto), n é o número total de pontos e p é o número de parâmetros do modelo. Quanto maior for $QMReg$ em relação a $QMRes$, menor o erro do modelo.

Para o teste F dado pela Equação (3), o valor crítico ($F_{(crítico)}$) tem distribuição de probabilidade F de Snedecor com 1 grau de liberdade no numerador e $n - 2$ graus de liberdade no denominador ao nível de significância de 5%. Se o valor do $F_{(calculado)}$ for maior que o $F_{(crítico)}$, a hipótese nula (H_0), em que o coeficiente angular é nulo ($b = 0$), será rejeitada. Então, assumiremos que y efetivamente varia em função de x e que o modelo pode ser considerado linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (ANVISA, 2018; PIMENTEL; BARROS, 1995; SCHILLER; JENA; CURRIET, 1998). O coeficiente angular b foi calculado pela seguinte equação:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2]}, \quad (4)$$

em que \bar{x} é a média aritmética dos valores de x .

A avaliação da significância dos parâmetros estatísticos (coeficiente angular (b) e linear (a)) nas curvas analíticas foi realizada mediante uso do teste t de Student. De modo que para que o parâmetro seja estatisticamente significativo, a razão entre o valor do parâmetro e o desvio deve ser maior que o valor tabelado para o t de Student, como calculado pelas seguintes equações (LIGIERO, 2009):

$$t_{calculado} = \frac{a}{s_a}, \quad (5)$$

$$t_{calculado} = \frac{b}{s_b}, \quad (6)$$

em que a é o coeficiente linear e b coeficiente angular.

3.9.3.5 Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade, pela análise de três concentrações da mistura de padrões 100 ng mL⁻¹ (nível mais baixo), 500 ng mL⁻¹ (nível intermediário) e 1000 ng mL⁻¹ (nível mais alto) em medidas sucessivas (cinco vezes) sob as mesmas condições, assim como os desvios padrão da repetibilidade (r). Os coeficientes de variação (CV) para cada analito foram calculados de acordo com as equações (ICH, 2015):

$$dp = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

(7)

e

$$CV(\%) = \frac{dp}{X} \cdot 100 \quad (8)$$

em que x_i é o valor para cada concentração em cada replicata ao nível de concentração i , X são valores médios de concentração em um dado nível i , n é o número replicado em cada nível e dp é o desvio padrão de repetibilidade. As condições de repetitividade e o coeficiente de variação devem ser inferiores a dois terços dos valores de acordo com o intervalo de concentração.

A exatidão do método foi analisada pelo método dos ensaios de recuperação utilizando uma matriz botânica de *Hippeastrum* isenta do alcaloide galantamina. Os alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina foram adicionados em três níveis de concentrações: baixa, 100 ng mL⁻¹ (10⁻⁵ %); média, 500 ng mL⁻¹ (5.10⁻⁵ %) e alta, 1000 ng mL⁻¹ (10⁻⁴ %) em cinco replicatas independentes. Os valores de recuperação média ($R\%$) para estas concentrações devem estar dentro dos critérios de aceitação de 80 a 110 $R\%$ (ANVISA, 2018). A recuperação é calculada pela Equação (GONZÁLEZ et al., 2007):

$$\text{Recuperação (R\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (9)$$

em que C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 concentração do analito adicionado à amostra fortificada. A precisão foi avaliada testando a repetibilidade da recuperação e precisão intermediária através de cálculos de coeficientes de variação (CV) (DA SILVA et al., 2015).

3.9.3.6 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) foi estabelecido inicialmente por diluições sucessivas até o menor nível detectável, que resultou na relação sinal/ruído (S/N) de 3:1. O limite de

quantificação (LQ) foi estabelecido também por diluições sucessivas até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis, relação sinal/ruído 10:1 (ICH, 2015).

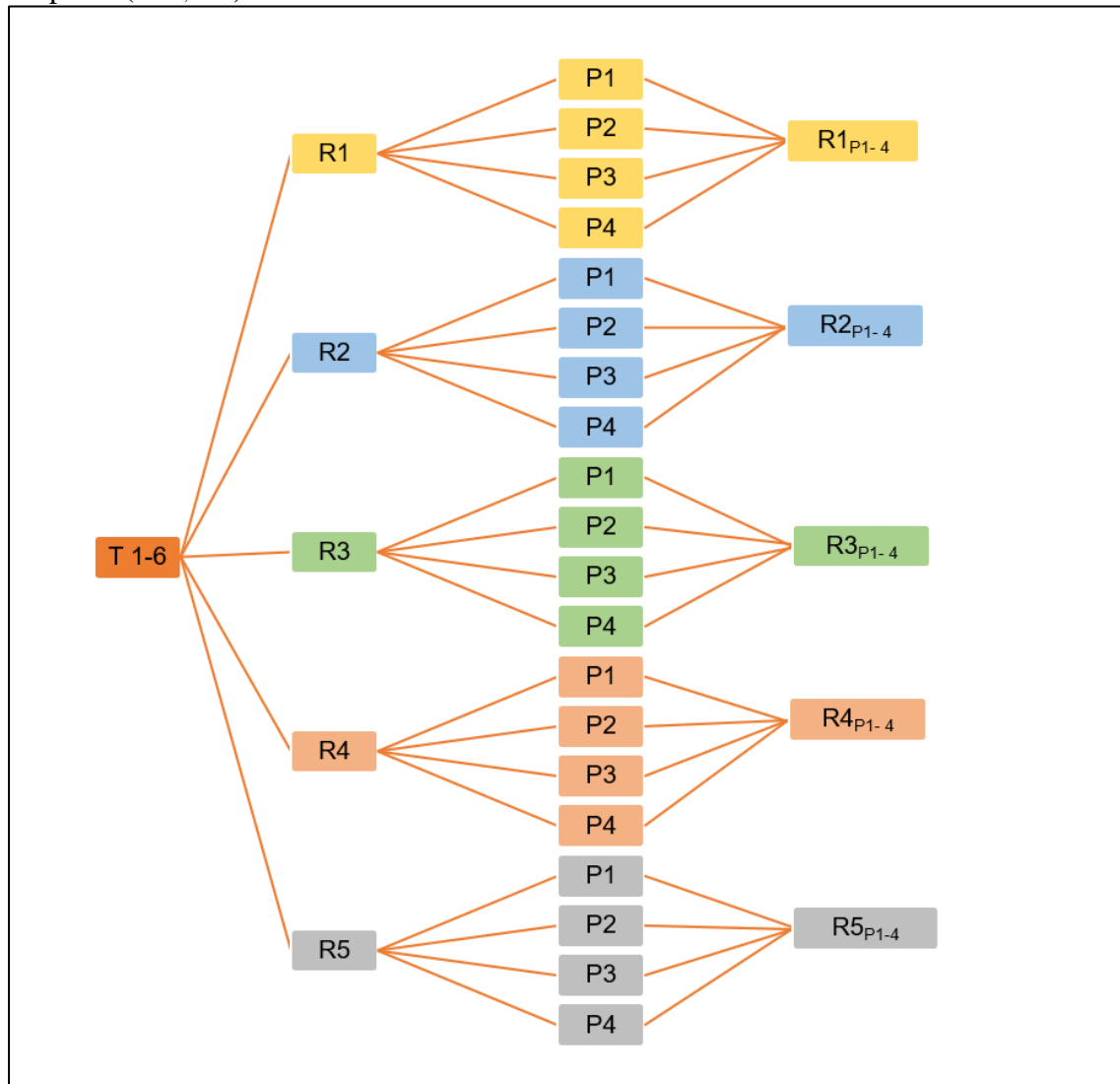
3.10 Estudo dos teores de galantamina, sanguinina, pseudolicorina, narciclasina e avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase por extratos de *Hippeastrum elegans* em diferentes épocas de colheita.

3.10.1 Extração e quantificação dos alcaloides

Para a extração dos alcaloides (alíquotas de 100 mg dos bulbos moídos) de cada tratamento, em cinco replicatas (R₁₋₅, P₁₋₄), Figura 15, foram submetidas à microextração seguida por extração em fase sólida (SPE – 100 mg) de troca catiônica, Bond Elut SCX, Agilent, (subseção 3.7.3). A solução rica em alcaloides (8 mL, NH₄OH/metanol, 25/75 v/v) provenientes da SPE foi quantificada em UPLC-QDA-SIM e expresso em ng alcaloide/g bulbo seco (subseção 3.6.2).

Para obter a massa final de extrato para análise em UPLC-QTOF-MS^E e testes da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase como será mostrado na subseção 3.10, as cinco replicatas dos seis tratamentos (T₁₋₆: R₁₋₅, P₁₋₄) foram reunidas de forma a obter um extrato representativo das diferentes épocas de colheita da planta (T₁₋₆), como representado na Figura 15, e evaporadas sob pressão reduzida em rota-evaporador a 100 rpm e 40 ° C.

Figura 15. Fluxograma com a disposição dos tratamentos (T₁₋₆) replicatas (R₁₋₅ e P₁₋₄) e amostra composta (R_{1-5, P1-4}).



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

3.10.2 Análise estatística dos teores de alcaloides nas diferentes épocas de colheita de *Hippeastrum elegans*

O software PAleontological STatistics (Past)[®], versão 3.2, foi utilizado para análise estatística. Os dados foram ajustados por regressão polinomial para analisar o comportamento das variáveis ao longo do ciclo da cultura. Os dados agrônômicos foram submetidos à análise de variância de único fator (ANOVA), com o objetivo de avaliar o efeito da variedade nos principais parâmetros biométricos e produtivos, seguido do método de múltiplas comparações de Tukey, ajustando o nível de confiança de cada período (5%).

3.11 Testes de Inibição de Acetilcolinesterase por extratos de alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae

Os testes de inibição da acetilcolinesterase para extratos de *H. elegans* (experimento agrônomico) e da Coleção de Amaryllidaceae foram realizados pela Profa. Geanne Matos de Andrade no Departamento de Fisiologia e Farmacologia (Universidade Federal do Ceará). Os dados foram comparados utilizando a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) e realizando análise de variância (ANOVA) seguido por comparações múltiplas entre pares pelo teste de Tukey, considerando significativos valores de $P < 0,05$.

3.11.1 Ensaios *in vitro*

Os extratos de alcaloides testados corresponderam às frações eluídas com solução básica NH₄OH/metanol (25/75 v/v) no procedimento de SPE de troca catiônica (subseção 3.7.3), reunidas em triplicata.

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada através de método colorimétrico segundo Ellman et al (1961), utilizando-se leitora Elisa BIOTEK ELX 800, software “Gen5 V2.04.11” e placas de 96 poços de fundo chato. Foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução Tris/HCl (50 nM, pH = 8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂ .6H₂O. (3 mM, DTNB ou reagente de Ellman), 50 µL da solução Tris/HCl (50 nM, pH = 8, com 0,1% de albumina sérica bovina - BSA), 25 µL da amostra de extrato dissolvida em acetato de etila e diluída 10 vezes na solução Tris/HCl (50 mM, pH = 8) para obter uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹.

A absorbância foi medida a 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,25 U mL⁻¹) e a absorbância foi aferida por minuto até o total de 25 min de incubação da enzima. Como branco foram utilizadas todas as soluções, excetuando-se a amostra.

As diluições das amostras e dos padrões foram obtidas a partir da solução mãe na concentração de 20 mg/mL: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 µg/mL.

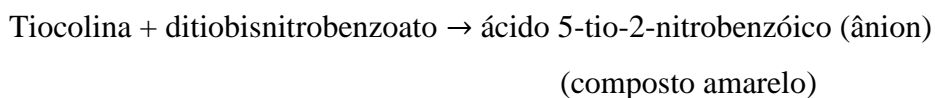
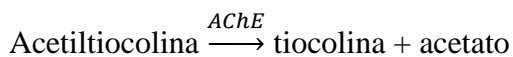
A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada por meio da comparação entre as velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao

branco (considerada atividade total da AChE, 100%). Os padrões utilizados para controle foram a fisostigmina e galantamina.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Após normalização dos dados, foi realizado teste de curva de regressão não linear pelo software estatístico GraphPad Prism v5.01. Os resultados foram analisados pela metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) da AChE passou por análise de variância (ANOVA) seguida por comparação múltipla entre pares pelo teste de Tukey.

3.11.2 Ensaios *ex vivo*

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo Ellman *et al* (1961). Esse método se baseia na medida da velocidade de produção de tiocolina, a qual é gerada na proporção que a acetiltiocolina (ACTI), utilizada como substrato, é hidrolisada (vide equações abaixo). A coloração é medida em 405 nm, através de um espectrofotômetro.



A atividade enzimática foi medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 5 min. A atividade específica foi expressa em micromol de ACTI hidrolisados por miligrama de proteína por minuto (micromol/mg de proteína/min).

Os tecidos cerebrais (córtex) foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7,4. A concentração de proteínas foi determinada pelo método Bradford, usando como padrão o BSA (*bovine serum albumin*), a concentração foi ajustada para 2 mg/mL de proteínas totais. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 33,4 µL de homogenato (2 mg/mL), 66,7 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,75 mM, 66,7 µL dos extratos em diferentes concentrações 2 mg/mL a 0,031 mg/mL. A mistura foi incubada a 25 C por 30 min.

Em seguida, a absorbância foi registrada a 405 nm por 1 min e logo após 33,4 µL de iodeto de acetiotiocolina (ACTI) 9 mM foi adicionado, e absorbância foi registrada novamente a 405 nm por 5 min. A atividade da enzima foi calculada com as modificações na absorbância durante os 5 minutos, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (KHALIL; ABASS, 2017). Foram feitos dois controles: o primeiro o branco com DTNB + homogenato + substrato + tampão fosfato (controle positivo) e o segundo com DTNB + homogenato+ galantamina + substrato (controle negativo), como descrito na equação abaixo.

$$\text{Atividade da AchE} = \frac{(\Delta \text{ D.O.} \times \text{Micromol} \times \text{Tamanho da reação ml})}{(\text{Mín.} \times 13,6 \times \text{Tamanho da amostra ml} \times \text{peso do tecido g})} = \text{Micromol / g de proteína/ min} \quad (10)$$

3.12 Identificação dos alcaloides de *Hippeastrum elegans*

Os dados gerados pelas análises em UPLC-QTOF-MS^E foram processados através do software *MassLynx* 4.1. A comparação de todos os picos no cromatograma de massas foi realizada considerando uma variação de $\pm 0,05$ min para o tempo de retenção e $\pm 0,05$ Da para a massa exata. Todas as possíveis fórmulas moleculares foram extraídas (elementos C, H, O, N) com tolerância de 10 ppm, usando a ferramenta *Elemental Composition*. A fórmula molecular extraída foi corrigida retirando-se um hidrogênio (em modo positivo) para posterior pesquisa na literatura. O erro em ppm é calculado pela seguinte relação:

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{massa observada} - \text{massa calculada})}{\text{massa observada}} \times 10^6 \quad (10)$$

3.13 Análise multivariada

Para determinar os possíveis biomarcadores responsáveis pela atividade anticolinesterase, foi desenvolvida uma modelagem de regressão multivariada por PLS (*Partial Least Squares*) para correlacionar as impressões digitais metabólicas dos conjuntos de dados UPLC-ESI-QTOF-MS e RMN de ¹H em bulbos de *H. elegans* com suas atividades anticolinesterásicas dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* (ARRUDA *et al.*, 2018). O algoritmo SIMPLS (*Simplified PLS*) foi aplicado para construir o modelo da atividade anticolinesterase, e o número de variáveis latentes (LV) foi selecionado de acordo com o perfil de diminuição da variância capturada (%), parâmetros estatísticos como erro médio de raiz quadrada de calibração (RMSEC), erro médio quadrático de raiz de validação cruzada (RMSECV) e respectivos coeficientes de correlação de Pearson ao quadrado (r^2). A validação cruzada (CV) foi aplicada ao método para avaliar o desempenho da modelagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

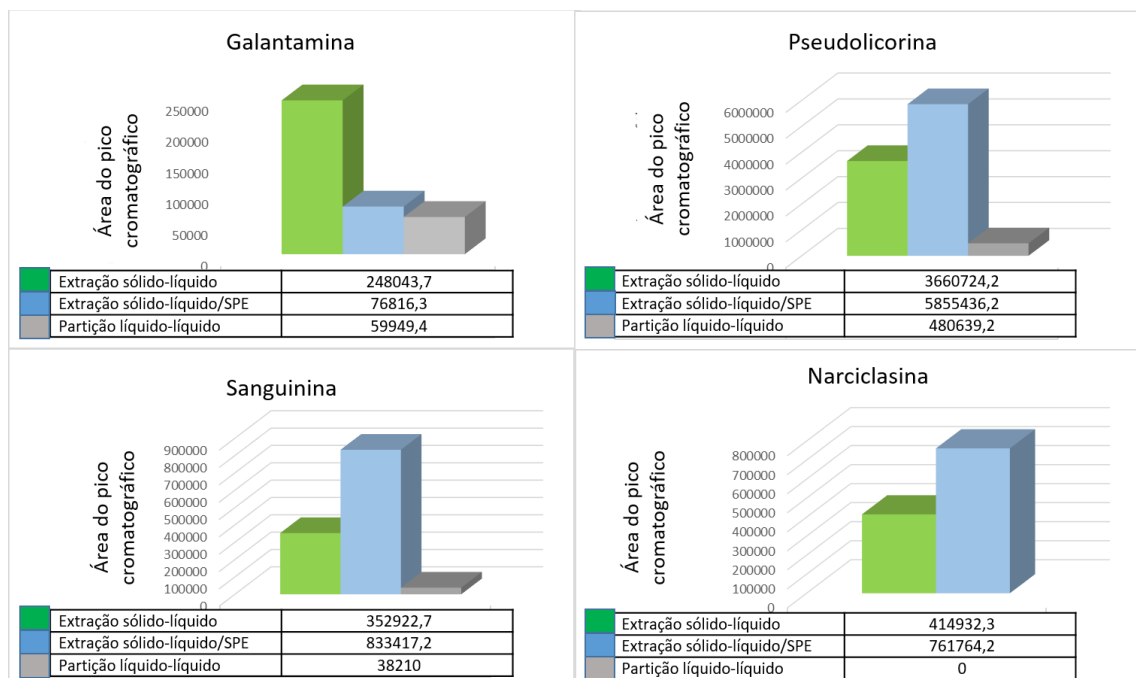
4.1 Otimização do método de extração

4.1.1 Seleção do método de extração para alcalóides de *Amaryllidaceae*

No preparo da amostra, foram avaliados três procedimentos de extração: (I) partição líquido-líquido ácido-base (II) extração sólido-líquido e (III) extração sólido-líquido seguida de extração em fase sólida. Este último foi escolhido em virtude de ter resultado em extratos com maiores teores de alcalóides (com base em suas áreas de pico Figura 16) e menos compostos interferentes, como pode ser observado em seus cromatogramas UPLC-QDA (Figura 17).

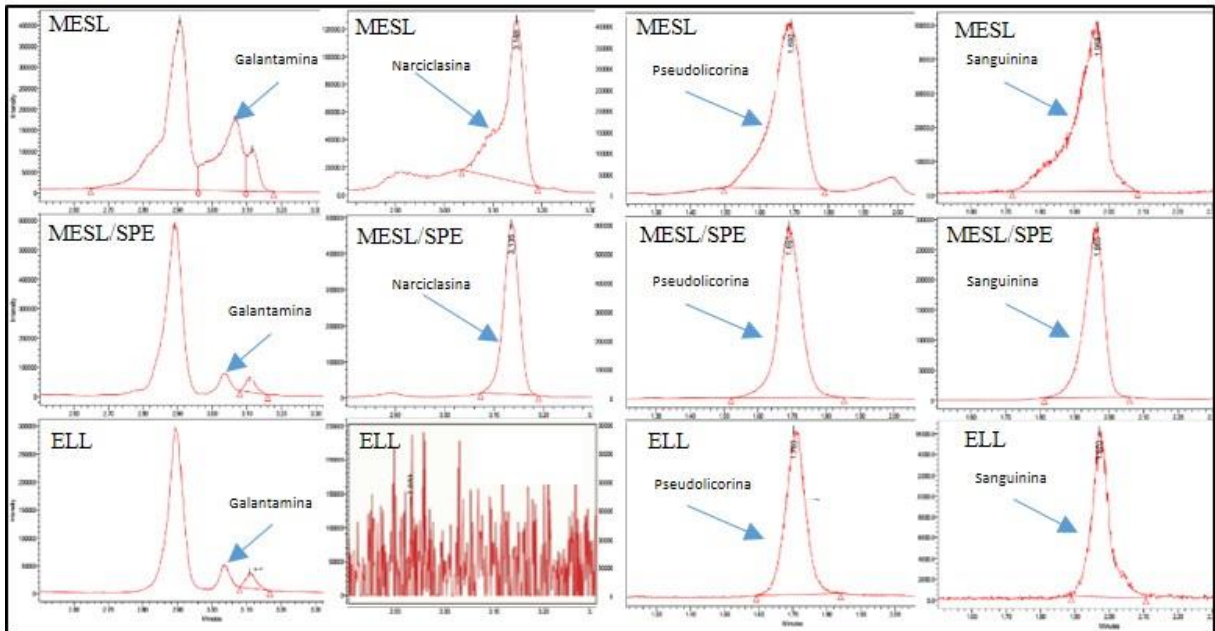
De fato, as amostras limpas pela SPE permitem análises mais reprodutíveis e menos suscetíveis ao efeito da matriz, além de prolongar a vida útil do sistema cromatográfico (CHAMBERS *et al.*, 2007). Os cartuchos de troca catiônica da SPE retêm moléculas seletivamente carregadas positivamente do alcaloide devido à ionização de seu nitrogênio básico em meio ácido. Essa estratégia parece ser particularmente útil quando os alcalóides de interesse não são abundantes ou a disponibilidade de material vegetal é limitada (DA SILVA *et al.*, 2017). Os dados da ANOVA e do testes de Tukey encontram-se no Apêndice A e B.

Figura 16. Áreas de picos de alcalóides extraídos dos bulbos de *Hippeastrum elegans* usando três métodos de extração.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 17. Cromatogramas no modo SIM dos alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina para os três métodos de extração: microextração sólido-líquido (MESL), microextração sólido-líquido seguido de extração em fase sólida (MESL/SPE) e extração líquido-líquido (ELL).



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.2 Validação do método de quantificação por UPLC-QDA

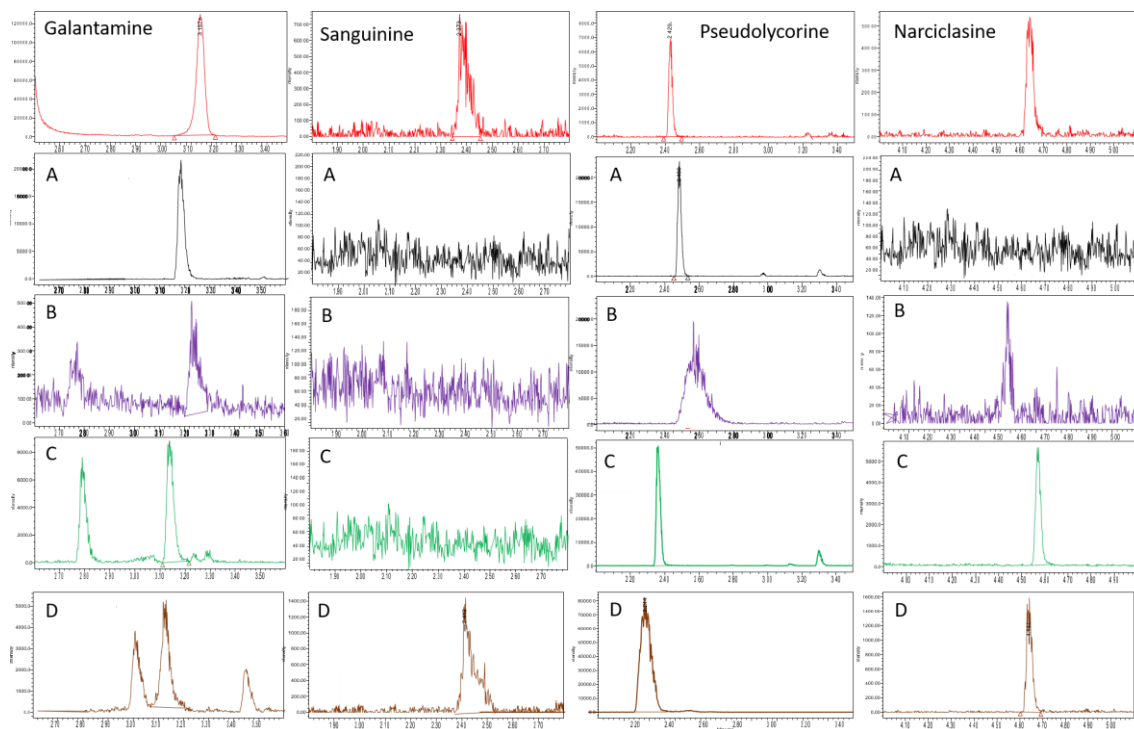
O presente estudo explorou a viabilidade de usar a técnica UPLC-QDA no modo SIM para quantificar os alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina simultaneamente. Inicialmente, a separação cromatográfica dos alcaloides foi otimizada para obter uma separação total, sensibilidade e a boa resolução de picos, verificando-se a influência da temperatura da coluna (30, 40 e 50°C), do volume de injeção (2 μ L e 5 μ L) e da temperatura da amostra (10 e 20°C). A temperatura da amostra e o volume de injeção não afetaram a resposta cromatográfica. Por outro lado, a temperatura da coluna mostrou um efeito deletério. As corridas a 30 ° C foram mais longas, enquanto as a 50 ° C resultaram em picos reduzidos, provavelmente devido à degradação térmica. Assim, considerando as condições mais favoráveis, o melhor resultado foi alcançado por um tempo de corridas de 10,5 min, injetando 2 μ L de amostra a 20 ° C na coluna mantida a 40 ° C.

4.2.1 Seletividade e efeito matriz

A seletividade do método pôde ser evidenciada através dos cromatogramas da mistura de padrões de alcalóides e amostras de extratos de espécies de Amaryllidaceae, os quais exibiram picos bem resolvidos para os íons de m/z pré-selecionados em seus respectivos intervalos de tempo (Figura 18).

O valor calculado para o efeito matriz foi de 13,1%. De acordo com a literatura, valores inferiores a 20% revelam que o efeito da matriz não é significativo (CHOI et al., 2015). Esse resultado pode ser pelo menos em parte atribuído ao alto fator de diluição da amostra (100 vezes). Portanto, o comportamento do analito na matriz da planta foi similar ao dele no solvente.

Figura 18. Cromatogramas de UPLC-SIM-MS dos padrões de alcalóides e amostras exibidas de acordo com seus respectivos íons quantitativos (m/z e intervalo de tempo): (A) *Habranthus cf. irwinianus* Ravena; (B) *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.; (C) *Griffinia nocturna* Ravenna e (D) *Hippeastrum elegans*.

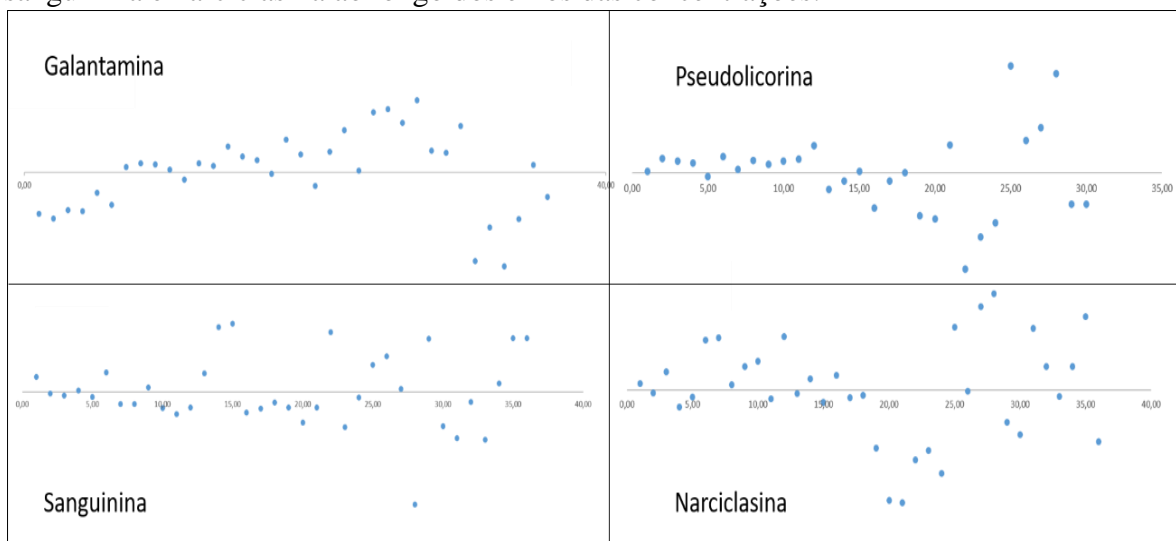


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.2.2 Linearidade

A boa linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação (R) das quatro curvas de calibração ($R > 0,9968$) e endossada pelos testes F de Hartley, bem como homocedasticidade. O teste F de Hartley revelou que não há evidência de falta de ajuste dos modelos lineares, dados os baixos valores de $F_{\text{calculado}}$ versus $F_{\text{crítico}}$ ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$) (Tabela 5). Além disso, em um modelo bem ajustado, os resíduos devem exibir uma distribuição normal na qual os resíduos variam independentemente da concentração. Assim, uma distribuição aleatória dos resíduos, onde sua variância pode ser considerada constante, indica a homocedasticidade do modelo (MILLER et al., 2018). A partir da análise dos gráficos residuais (Figura 19), verificou-se o comportamento aleatório dos resíduos ao redor do eixo de concentração. Além disso, foram estimados os erros dos parâmetros de calibração, intervalos de confiança e previsões das equações de regressão. A indicação de uma relação linear entre as variáveis x e y foi altamente significativa para todos os alcaloides, dado o alto valor de $F_{\text{calculado}}$. Como assumimos que os erros são distribuídos normalmente, a distribuição de Student pode ser usada para testar a significância do valor estimado para o coeficiente angular e a interceptação. A análise estatística para os parâmetros das curvas analíticas (Tabela 5) revelaram que todas as inclinações são significativas ($T_{\text{calculado}} < T_{\text{tabulado}}$) e nenhuma das intercepções apresenta significância estatística ($T_{\text{calculado}} < T_{\text{tabulado}}$) (MILLER et al, 2018).

Figura 19. Gráficos de resíduo das curvas de calibração de galantamina, pseudolicorina, sanguinina e narciclasina ao longo dos eixos das concentrações.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 5. Dados estatísticos dos quatro alcalóides quanto, as curvas de calibração, coeficientes de correlação (r), linearidade, $T_{calculado}$ em relação ao coeficiente angular (b) e linear (a) para $T_{calculado}$ 0,68; F de significância da regressão linear e F_{crit} da distribuição Snedecor para 1 grau de liberdade (Gl) no numerador e $n - 2$ graus de liberdade no denominador, teste F de Hartley (F_{Hart}) e o valor tabelado de Hartley (F_{tab}), todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%.

Alcalóides	Curva de calibração	r	linearidade (ng mL ⁻¹)	$T_{calculado}$		F	F_{crit}	F_{Hart}	F_{tab}
				b	a				
Galantamina	$y = 399,6x + 16977$	0,9986	50-1000	79,7	12,2	13911,0	4,17 ($Gl = 33$)	0,36	2,91 ($Gl = 33$)
Sanguinina	$y = 52,967x - 90,16$	0,9987	100-1250	54,8	16,6	9230,7	4,17 ($Gl = 33$)	0,01	2,91 ($Gl = 33$)
Pseudolicorina	$y = 62,037x + 1012,1$	0,9978	75-1000	24,3	17,5	5383,1	4,35 ($Gl = 27$)	0,09	3,76 ($Gl = 27$)
Narciclasina	$y = 1,13x + 39,823$	0,9968	350-1250	21,9	10,5	2407,8	4,17 ($Gl = 33$)	0,18	2,91 ($Gl = 33$)

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 6. Porcentagem de recuperação média (*R*%) juntamente com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método UPLC-MS para quantificação dos quatro alcaloides (*n* = 5).

Alcaloides	100 ng/mL	500 ng/mL	1000 ng/mL	Média de	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
	($10^{-5}\%$)	($5 \cdot 10^{-5}\%$)	($10^{-4}\%$)	<i>R</i> %		
Galantamina	92,3	96,1	100,5	96,2	5	20
Pseudolicorina	84,5	86,2	91,6	87,5	25	80
Sanguinina	89,7	90,3	92,1	90,3	27	90
Narciclasina	62,1	73,0	76,3	70,5	100	350

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 7. Coeficientes de variação (CV%) para precisão intradia e interdia do método UPLC-MS para quantificação dos quatro alcaloides (*n* = 5).

Alcaloide	Precisão intradia e interdia, CV %			
	100 ng/mL	500 ng/mL	1000 ng/mL	Média CV %
Galantamina	2,1; 5,5	1,4; 7,1	0,3; 4,4	1,3; 5,7
Pseudolicorina	16,0; 11,7	4,4; 4,7	5,0; 4,6	8,4; 7,0
Sanguinina	7,1; 10,2	3,6; 8,0	1,2; 6,0	4,0; 8,1
Narciclasina	8,7; 18,9	3,9; 8,1	11,0; 11,7	7,9; 12,9

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.2.3 Exatidão e precisão

O método mostrou-se confiável e reprodutível com base nos resultados obtidos para recuperação, repetibilidade e precisão intermediária, expressos em porcentagem ($R\%$) e coeficientes de variação ($CV\%$), Tabela 6 e 7. Todos os resultados estavam dentro dos limites aceitáveis de recuperação (87,5- 96,2%), exceto a narciclasina (70,5%). Da mesma forma, todos os valores médios para precisão intradia (1,3-8,4%) e interdias foram satisfatórios (5,7-8,1%) nos três níveis de concentração ($n = 5$), no entanto a narciclasina apresentou uma precisão interdica baixa (12,9%) (ICH, 2015), pois a narciclasina pode estar relacionada à sua baixa retenção no cartucho SPE, que varia de acordo com o pH.

4.2.4 Limites de detecção e quantificação

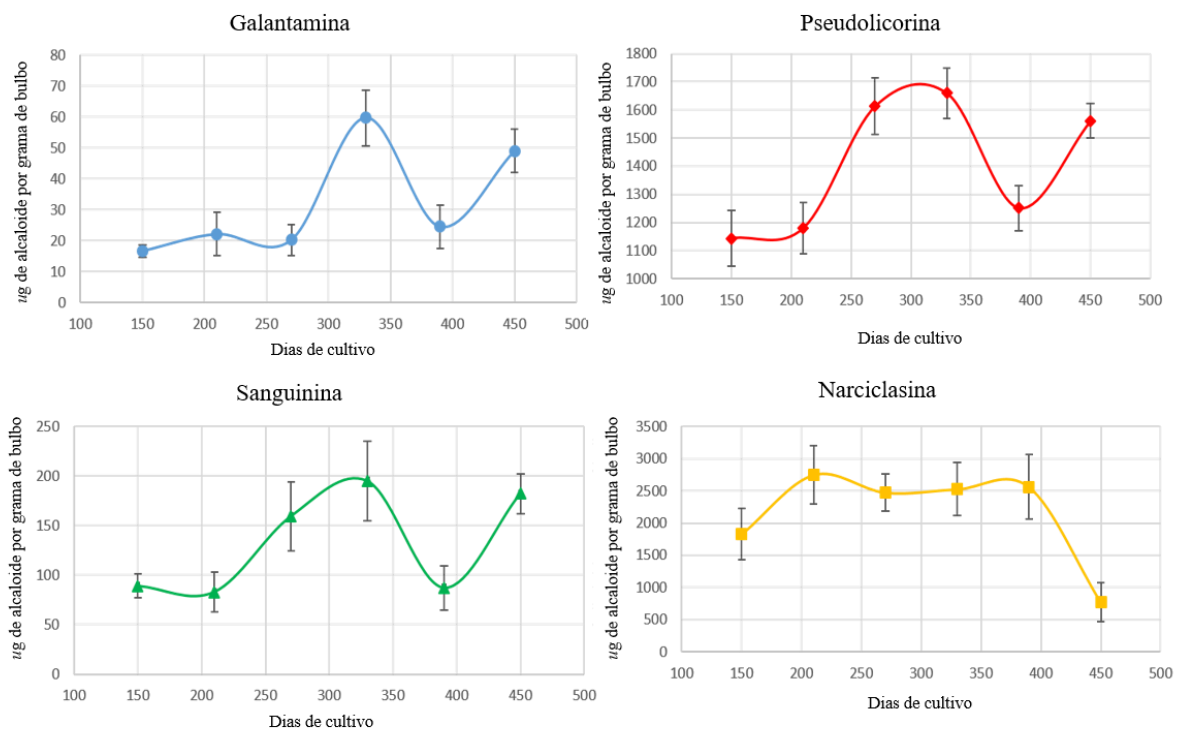
O método UPLC-MS proposto mostrou-se altamente sensível, principalmente pelo uso do modo SIM. Os resultados para LD e LQ variaram de 5-100 e 20-350 ng mL^{-1} , respectivamente, como pode ser visto na Tabela 6. Os menores LD e LQ foram alcançados para galantamina, 5 e 20 ng mL^{-1} , respectivamente. Até onde sabemos, o método LC mais sensível para galantamina em materiais vegetais tinha um LQ de 37 ng mL^{-1} usando um DAD como detector e demorando 45 minutos para quantificar dois alcaloides (EMIR; ÖNÜR, 2016). Mroczek (2009) desenvolveram um método HPLC-ESI-MS para três alcaloides, entre eles a galantamina, cujo LD era de 1210 ng mL^{-1} . Katoch et al (2012) desenvolveram um método UPLC-DAD para quantificar quatro alcalóides de *Zephyranthes grandifolia* em 8 min, porém foi quase 300 vezes menos sensível que o nosso. Além disso, Gotti et al (2006) quantificaram quatro alcaloides por GC-MS em 30 min, obtendo um LQ de 6150 ng mL^{-1} . Além das vantagens mencionadas, nosso método UPLC-MS é o primeiro relatado para quantificação simultânea de galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina.

4.3 Estudo químico e atividade anticolinesterásica dos extratos de *Hippeastrum elegans* em diferentes épocas de colheita

4.3.1 Quantificação dos teores de alcaloides nos bulbos de *H. elegans* em diferentes épocas de colheita

Os quatro alcaloides galantamina, pseudolicorina, sanguinina e narciclasina foram quantificados por UPLC-ESI-SIM-MS (teor, $\mu\text{g/g}$ bulbo seco) nas seis épocas de colheita e seus dados analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey. A Figura 20 mostra que o teor de galantamina atingiu um valor máximo em 330 dias ($59,7 \mu\text{g/g}$), após o qual caiu, mas aumentou imediatamente. Da mesma forma, essa tendência foi observada para sanguinina e pseudolicorina. Por outro lado, a narciclasina permaneceu estável até 390 dias, depois houve um intenso declínio em sua concentração.

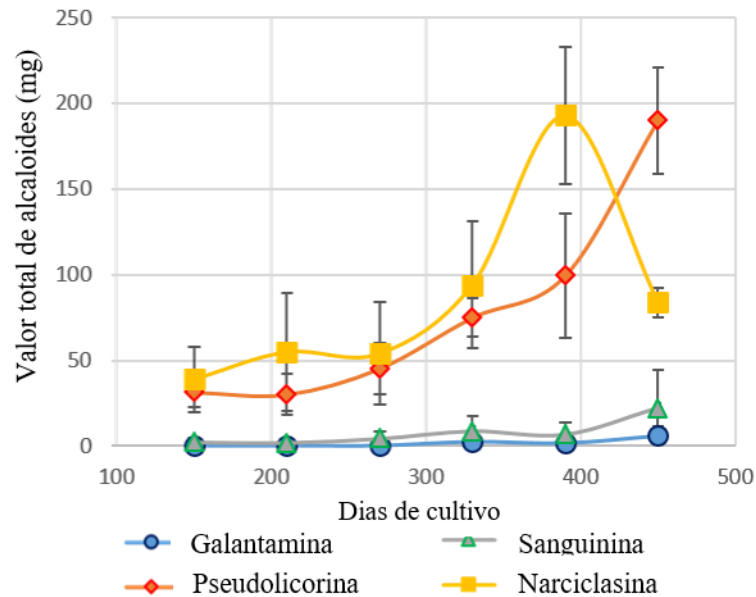
Figura 20. Teores de alcaloides (μg de alcaloide por grama de bulbo) em épocas de colheita em dias para galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Em relação à quantidade de alcaloides estimada pela massa total de bulbos ($n = 5$) para cada estação de colheita (Figura 21), todos os compostos apresentaram um aumento ao longo do plantio, resultante do crescimento dos bulbos, conforme descrito anteriormente para este experimento, em termos agrônômicos, por meio da medida de sua umidade, biomassa seca e fresca e diâmetro (PEREIRA, 2018). No entanto, a narciclasina exibiu uma queda repentina no final do ciclo como resposta à acentuada diminuição na produção desse metabólito, conforme mencionado acima. Uma Tabela com os dados da ANOVA encontra-se no Apêndice C.

Figura 21. Teor total de alcaloide (mg) em dias de cultivo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

H. elegans demonstrou ser uma espécie rica em narciclasina (768-2.749 $\mu\text{g/g}$) e pseudolicorina (1.143-1.659 $\mu\text{g/g}$), além de concentrações razoáveis de sanguinina (88,8-194 $\mu\text{g/g}$). Anteriormente, nosso grupo de pesquisa relatou que apenas *Griffinia nocturna* entre as quatro espécies brasileiras de Amaryllidaceae continha maiores níveis para um desses quatro alcaloides quantificados em comparação com *H. elegans*: galantamina (79,2 $\mu\text{g/g}$). Katoch e Sharma (2019) encontraram menor conteúdo de pseudolicorina (768,5 $\mu\text{g/g}$) e narciclasina (71,23 $\mu\text{g/g}$) em bulbos de *Narcissus tazetta*. Nos bulbos de *Lycoris radiata* cultivadas na China, o conteúdo de pseudolicorina era de 15 $\mu\text{g/g}$ (DENG et al., 2011). Khonakdari et al. (2017) avaliaram os bulbos de *N. tazetta* e *Galanthus nivalis* coletadas em diferentes regiões do Irã e encontraram níveis de galantamina entre 30 e 360 $\mu\text{g/g}$.

De acordo com CHERKASOV e TOLKACHEV (2002), para a exploração comercial de galantamina, é desejável que a planta tenha grande teor e biomassa. No entanto, um alto nível de galantamina nem sempre é acompanhado por uma grande biomassa. Por exemplo, *Galanthus woronowii* possui alto teor de galantamina (0,10 - 0,9% em bulbos e 0,05 - 0,70% em folhas), porém não foi explorado economicamente devido à baixa biomassa e seu difícil cultivo (CHERKASOV; TOLKACHEV, 2002; BERKOV et al., 2009). Da mesma forma, embora algumas cultivares de *Narcissus pseudonarcissus* apresentem maiores teores de galantamina, a cv. 'Carlton' tem sido a principal fonte comercial para a produção desse

fitofármaco por causa de seu maior tamanho de bulbo (4-5 cm de diâmetro) e alto teor de galantamina (0,10-0,13%) (BERKOV et al., 2009; TORRAS-CLAVERIA et al., 2013).

Nesse sentido, uma vez que *H. elegans* é uma planta robusta com bulbos grandes atingindo circunferência maior que 16 cm e 21 cm após 330 e 450 dias, respectivamente (PEREIRA et al., 2018), pode ser uma espécie tropical promissora para exploração comercial de galantamina e outros alcaloides bioativos, como pseudolicorina e narciclasina (agentes antineoplásicos) (CARVALHO et al., 2015; DENG et al., 2011; LUBBE et al., 2013). Sanguinina também pode servir de substrato para a semi-síntese de galantamina, aumentando assim a viabilidade econômica dessa fonte (BERKOV et al., 2009).

4.3.2 Análise do perfil químico de alcaloides em Hippeastrum elegans

Seguindo a metodologia de extração descrita na subseção 3.7.3, foi possível obter os extratos metanólicos das amostras de bulbos de *Hippeastrum elegans* e posteriormente os extratos foram analisados pela técnica UPLC-QTOF-MS^E seguindo os parâmetros descritos na subseção 3.6.1, de modo que, observado os dados referentes ao modo positivo de ionização ESI⁺, foi possível traçar o perfil químico de alcaloides nas amostras.

A cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), acoplada ao espectrômetro de massa com fonte de ionização por *electrospray* e analisadores quadrupolo/tempo de voo, foi de grande relevância para o desenvolvimento do trabalho, visto a capacidade de analisar pequenas quantidades de amostra e em baixos níveis de concentração, em corridas curtas com 20 minutos e obtenção de espectros em alta resolução com exatidão de massas de m/z com 4 casas decimais. A combinação do UPLC com a espectrometria de massa (QTOF-MS^E), foi um fator essencial na identificação dos alcaloides extraídos.

A identificação desses alcaloides foi determinada da literatura com o auxílio de bases de dados disponíveis na internet, tais como: KNApSAcK, PubChem, ChemSpider e Scifinder. Além disso, foram realizadas buscas de artigos referentes à família Amaryllidaceae, ao gênero *Hippeastrum* e a espécie *H. elegans* para comparação.

4.3.2.1 Identificação dos alcaloides

O perfil químico dos bulbos de *Hippeastrum elegans* foi estabelecido mediante a análise dos cromatogramas do modo positivo (ESI⁺), tal como ilustrado na Figura 22, em conjunto com os cromatogramas foram analisados os espectros de massa. Para facilitar a posterior manipulação dos dados, os picos exibidos no cromatograma foram enumerados consecutivamente de acordo com a ordem de eluição. Foram considerados, também, os picos com baixa intensidade.

Na Tabela 8, são exibidos os metabólitos identificados nos bulbos de *H. elegans*, juntamente com a m/z dos seus respectivos íons moleculares protonados [M+H]⁺ e seus íons fragmentos bem como o erro em partes por milhão (ppm), i-FIT e sua possível fórmula molecular. As estruturas dos compostos identificados estão demonstradas na Figura 23.

Figura 22. Cromatogramas UPLC-q-TOF-MS/MS de extratos de bulbos de *Hippeastrum elegans* (A-F) 150 a 450 dias, utilizados para a análise de alcaloides.

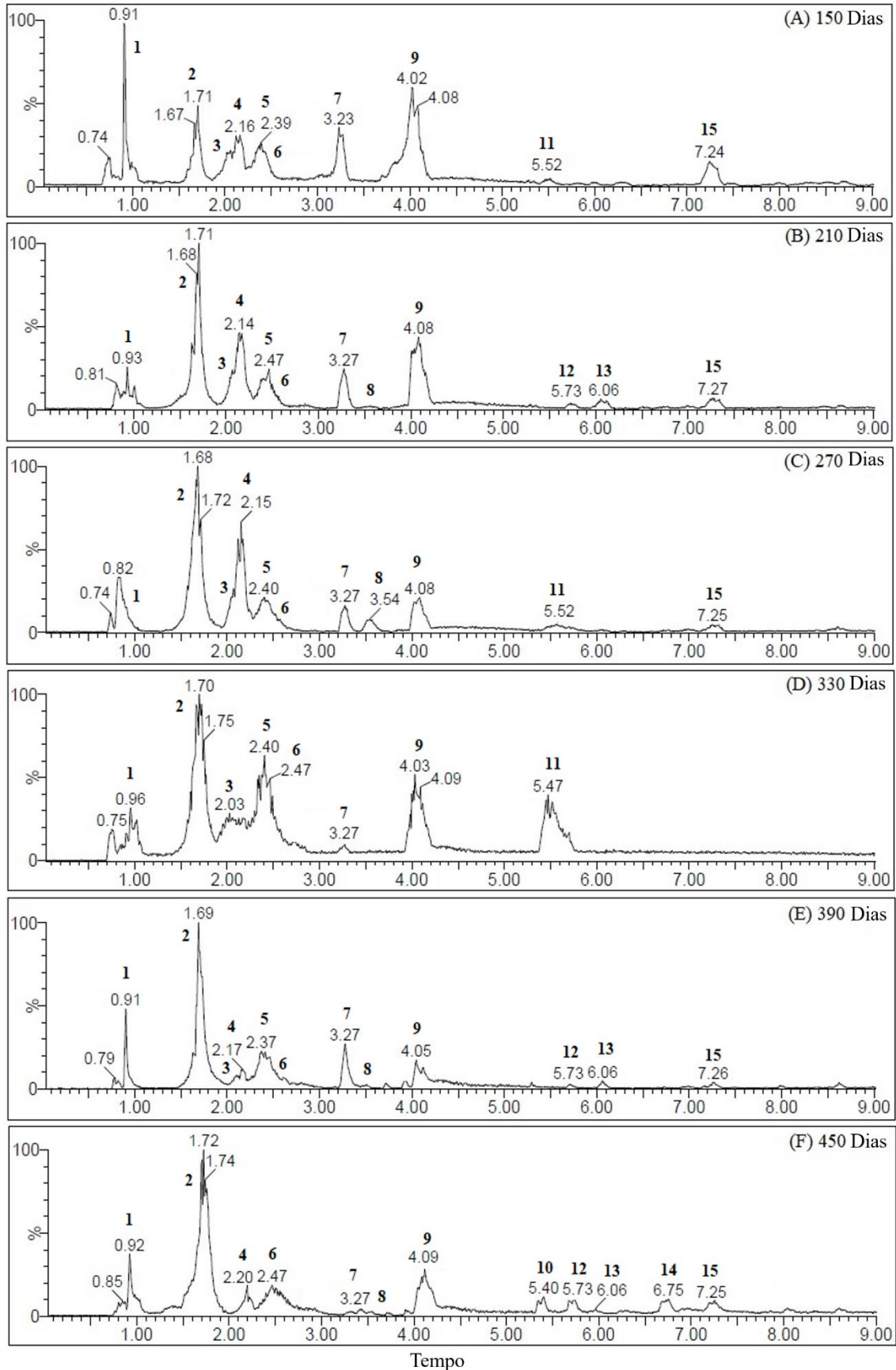
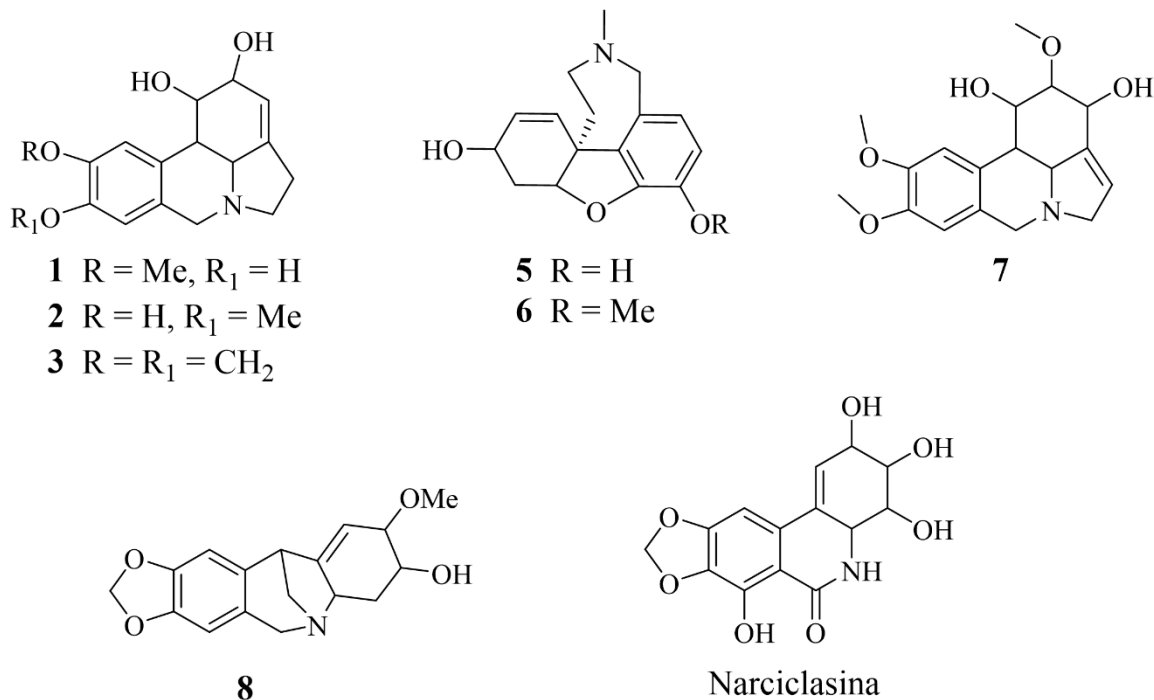


Tabela 8. Alcaloides identificados em extrato de bulbo de *Hippeastrum elegans* em UPLC-QTOF-MS^E.

Pico N°.	t _R min	[M+H] ⁺ Observado	[M+H] ⁺ Calculado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	i-fit (Norm)	Tentativa de Identificação	Referências
1	0,948	290,1393	290,1392	272.1235, 254.1000, 179.0670, 147.0415, 119.0488	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	0,3	0,4	Isopseudolicorina	LI et al., 2019
2	1,682	290,1350	290,1352	272.1235, 254.1024, 222.0913, 179.0663, 147.0432, 119.0433	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	0,7	0,2	Pseudolicorina ^a	LI et al., 2019
3	2,060	288,1237	288,1236	270.1092, 252.1002, 222.0907, 177.0526, 147.0441, 119.0415	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	0,3	0,3	Licorina ^a	LI et al., 2019
4	2,172	316,1182	316,1185	288.1263, 270.1122, 252.0940, 177.0533, 147.0421, 109.0889	C ₁₇ H ₁₇ NO ₅	0,9	0,7	desconhecido	-
5	2,406	274,1443	274,1443	256.1331, 225.0873, 217.0843, 199.0740, 184.0537, 181.0671	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	0,5	0,4	Sanguinina ^a	MROCZEK, 2016
6	2,482	288,1610	288,1600	270.1223, 231.1088, 213.0891, 198.0682, 181.0625	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	2,0	0,2	Galantamina ^a	ZHANG; CHEN, 2013
7	3,275	334,1632	334,1614	316.1425, 284.1234, 224.0737, 165.0879, 124.0777, 108.0436	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	2,4	1,2	Narcissidina	LI et al., 2019
8	3,545	302,1385	302,1392	270.1160, 252.1103, 223.0739, 185.0571, 165.0656, 137.0656	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	-0,7	0,5	Montanine	SCHWEDERSKY et al., 2020
9	4,035	336,1804	336,1811	290.1315, 261.1149, 257.1155, 225.0852, 167.0679, 133.085	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	2,1	0,2	desconhecido	BESSA et al., 2017
10	5,400	401,1029	401,1025	385.1438, 285.1014, 225.0771, 173.0808, 155.0593, 111.0439	C ₂₄ H ₁₆ O ₆	1,0	1,7	desconhecido	-
11	5,486	330,1343	330,1341	299.0870, 283.0621, 239.0711, 225.0792, 195.0792, 124.9635	C ₁₈ H ₁₉ NO ₅	0,6	0,5	desconhecido	-
12	5,740	489,1740	489,1761	473.2046, 433.2040, 217.1060, 173.0800, 155.0689, 111.0424	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₀	2,7	1,4	desconhecido	-
13	6,732	517,1714	517,1710	501.1890, 289.1278, 217.1067, 173.0765, 155.0691, 111.0408	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	0,8	1,9	desconhecido	-
14	7,284	350,1612	350,1604	299, 276, 170	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	2,3	0,3	desconhecido	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2019). ^aEstes compostos correspondem a padrões autênticos analisados nas mesmas condições cromatográficas.

Figura 23. Compostos identificados em extratos de *Hippeastrum elegans* por UPLC-QTOF-MS^E: isopseudolicorina (**1**), pseudolicorina (**2**), licorina (**3**), sanguinina (**5**), galantamina (**6**), narcissidina (**7**), montamina (**8**) e narciclasina, composto esse que sai na etapa de *clean up*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Os picos **1** (tr = 0,919 min) e **2** (tr = 1,682 min) dão um íon precursor $[M + H]^+$ em m/z 290,1379 e 290,1389 (C₁₆H₁₉NO₄), respectivamente. Seus íons de fragmento em m/z 272 $[M + H - H_2O]^+$ e 254 $[M + H - 2H_2O]^+$ eram consistentes com perdas sucessivas de água dos grupos hidroxila em C-1 e C-2, enquanto os íons de fragmento em m/z 222 foram devidos à eliminação da formação de metoxi e epóxido. Além disso, o íon do produto em m/z 179 foi gerado por um rearranjo retro-Diels-Alder (RDA) resultante da eliminação do C₆H₉NO. As eliminações de MeOH e CO do íon m/z 179 levaram à formação dos íons principais m/z 147 e 119, espectro de massa e mecanismo encontra-se na Figura 24 e 25. Após comparação com um padrão autêntico, os compostos foram identificados como isopseudolicorina (**1**) e pseudolicorina (**2**) (LI et al., 2019).

Figura 24. (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para isopseudolicorina (**1**, $t_r = 0,919$ min).

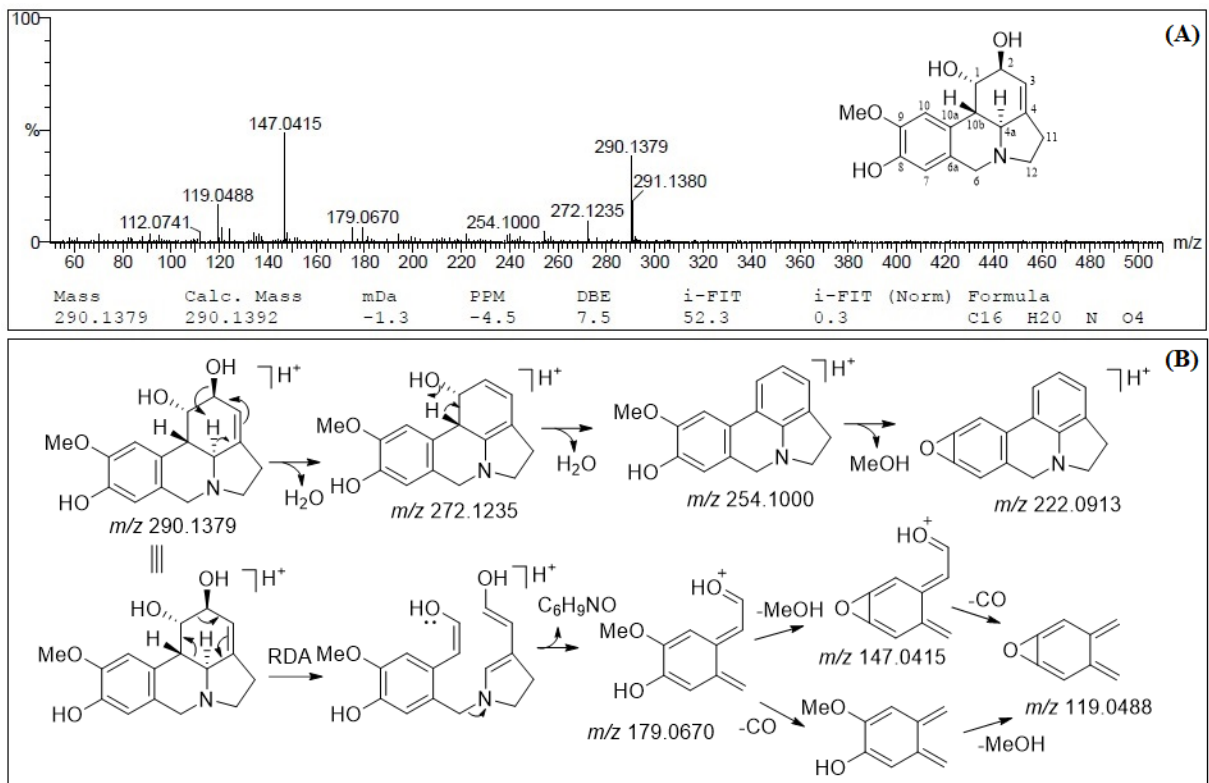
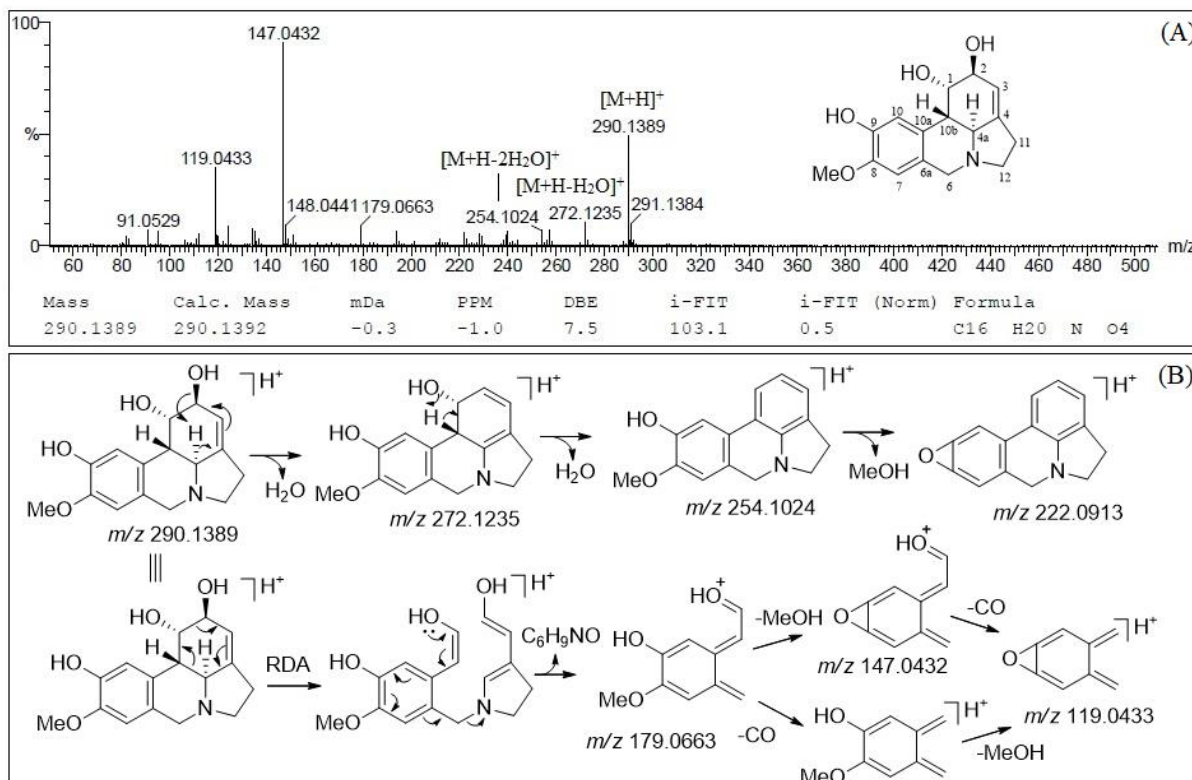
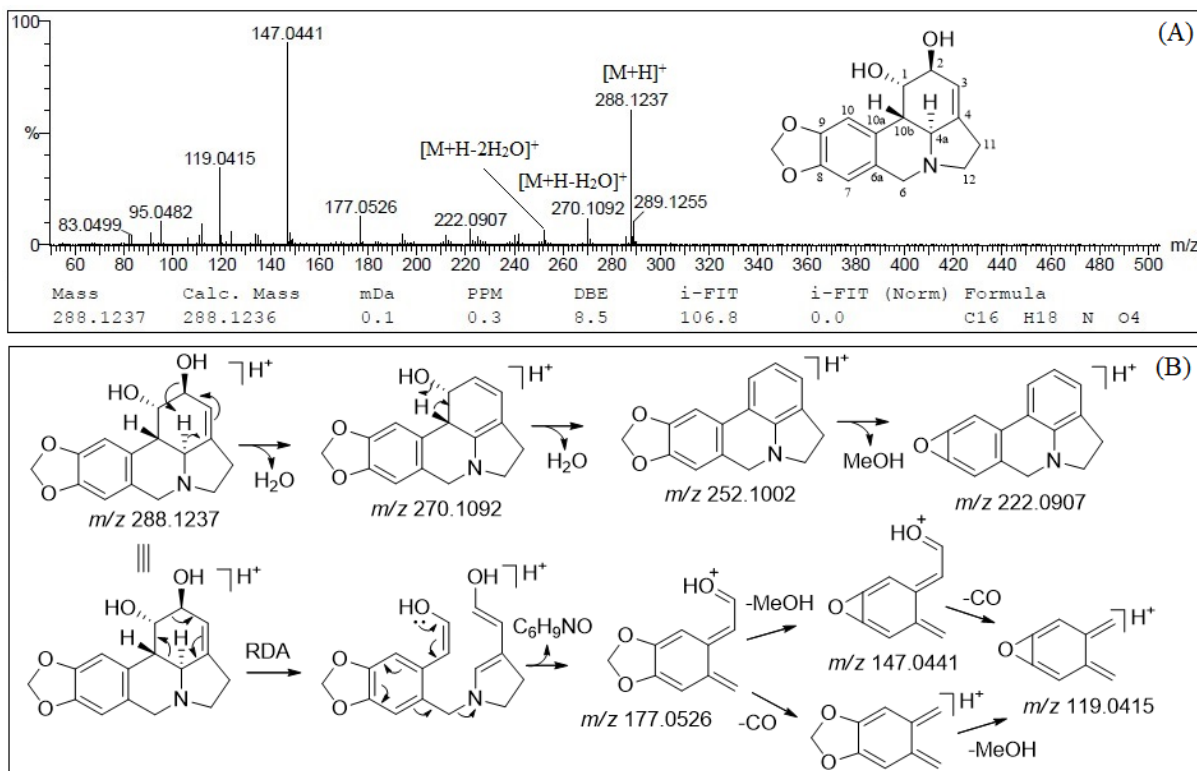


Figura 25. (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para pseudolicorina (**2**, $t_R = 1,682$ min).



O pico **3** ($t_R = 2,039$ min) teve um íon molecular protonado $[M + H]^+$ em m/z 288,1237 ($C_{16}H_{17}NO_4$) cujos fragmentos de MS/MS foram detectados em m/z 270 e m/z 252 correspondendo à eliminação de água. O íon em m/z 177 é produzido pela quebra do anel isoquinolina através de um rearranjo RDA, correspondente à parte aromática. Foram observados fragmentos em comum com pseudolicorina (**2**) em m/z 222, 147 e 119, espectro de massa e mecanismo encontra-se na Figura 25. Assim, este composto foi caracterizado como licorina (**3**) e a fragmentação da ESI está de acordo com estudos anteriores (LI et al., 2019).

Figura 26. (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para o licorina (**3**, tr = 2,039 min).



Os picos **5** (tr = 2,401 min) e **6** (tr = 2,487 min) mostraram íons precursores $[M + H]^+$ em m/z 274,1452 (C₁₆H₁₉NO₃) e $[M + H]^+$ m/z 288,1600 (C₁₇H₂₁NO₃), respectivamente e mostrou o mesmo mecanismo de fragmentação: desidratação (m/z 256/270), clivagem do anel azepina (m/z 199/213), seguida pela remoção do radical metil (m/z 184/198). Os compostos foram identificados experimentalmente comparando-se os dados de fragmentação MS/MS com os relatados na literatura, 5,32 nos íons m/z 217 e 199 para sanguinina (**5**) (MROCZEK, 2016) (Figura 27) e m/z 231 e 213 para galantamina (**6**) (ZHANG; CHEN, 2013) (Figura 28). Após comparação com padrões autênticos, estes compostos foram confirmados.

Figura 27. (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para a sanguinina (**5**, $t_r = 2,401$ min).

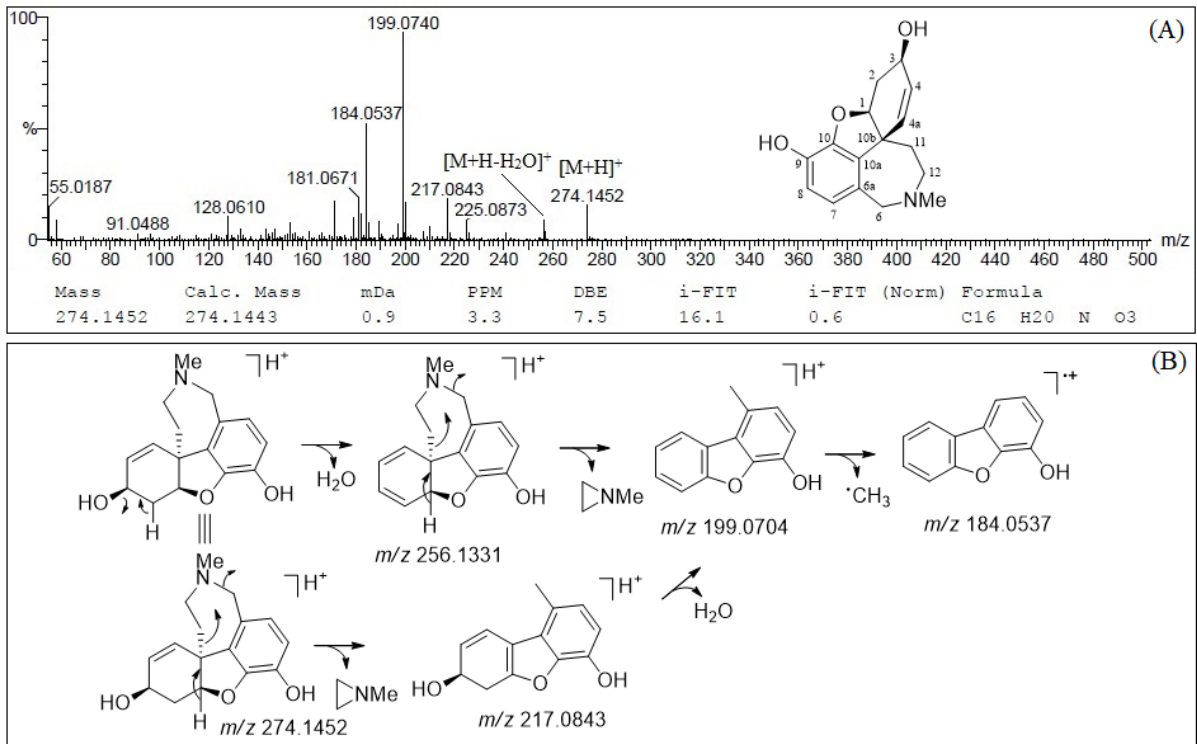
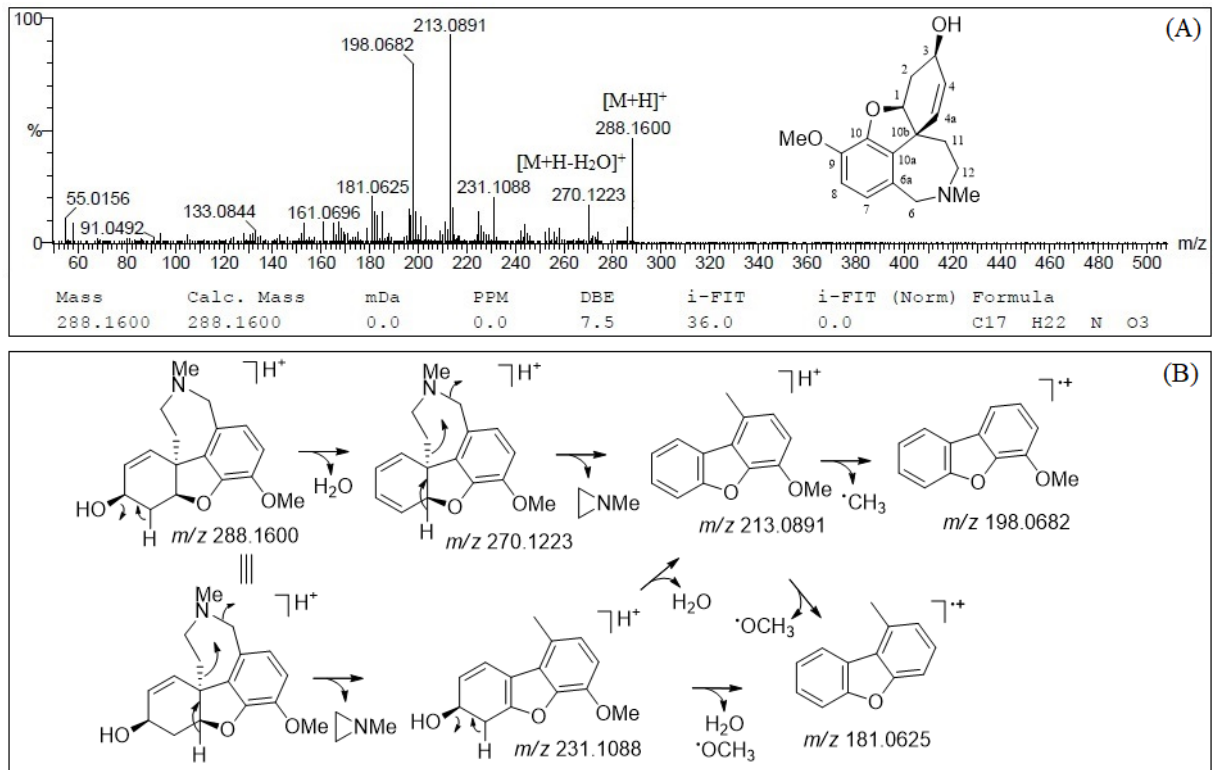
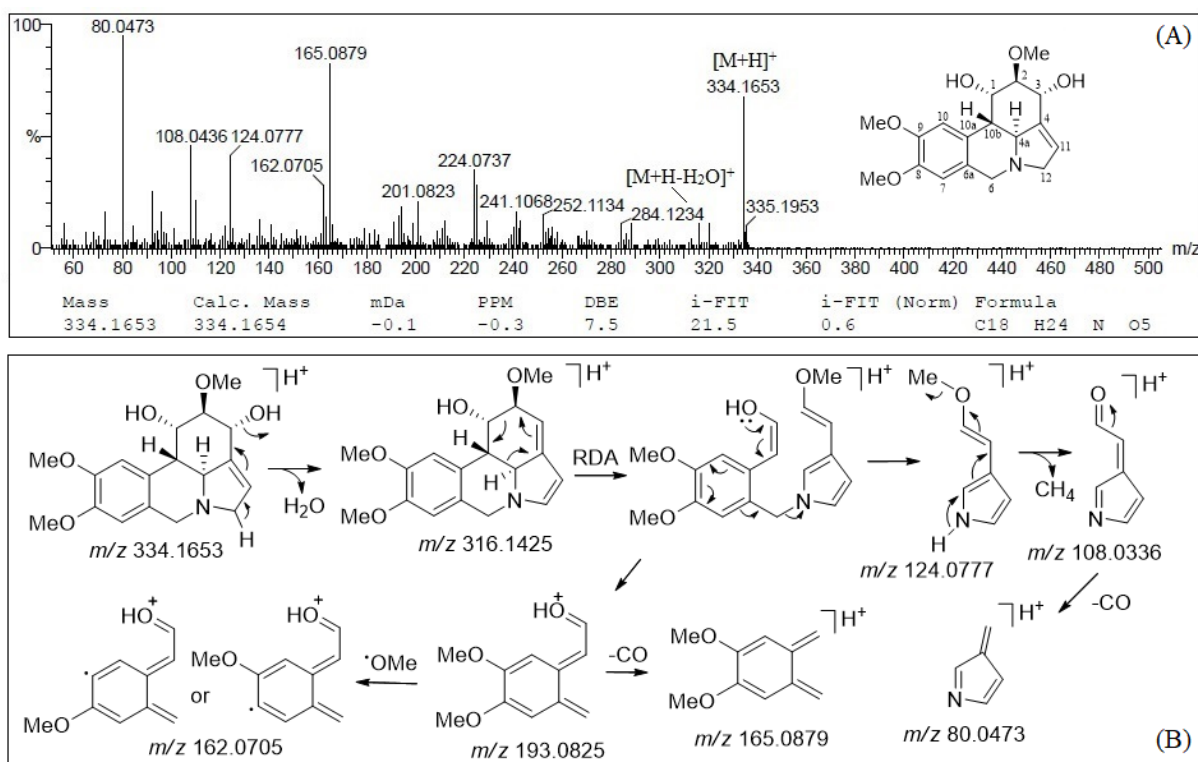


Figura 28. (A) O espectro MS/MS e (B) fragmentação proposta para galantamina (**6**, $t_r = 2,487$ min).



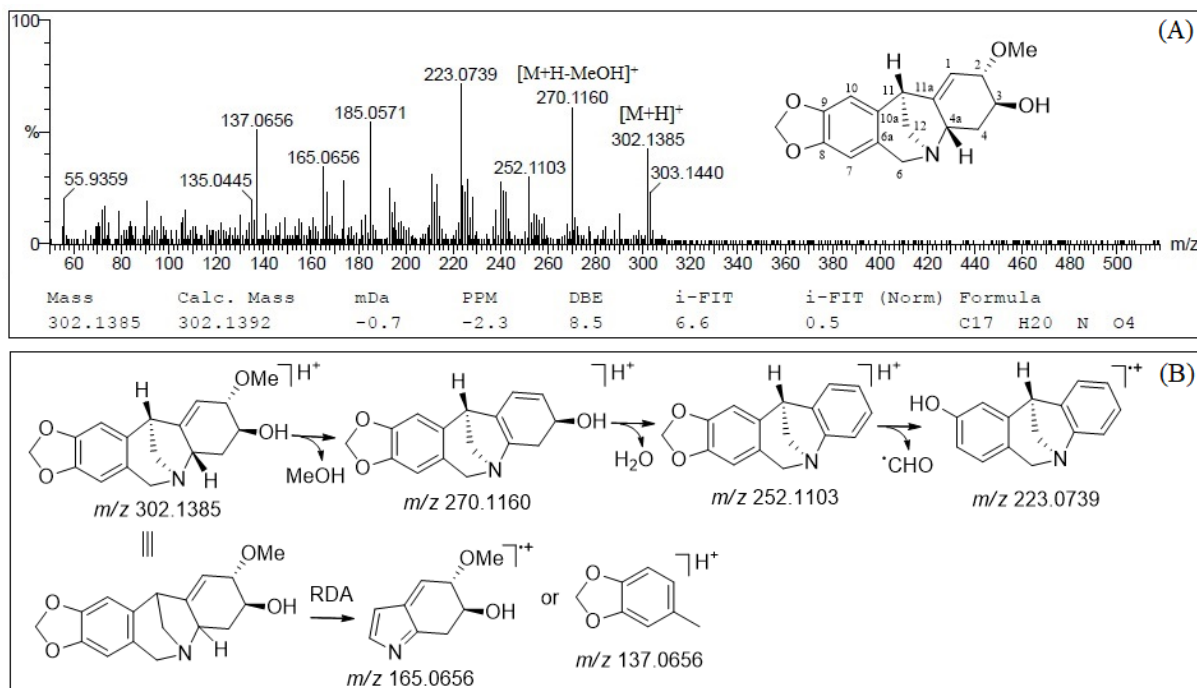
Os picos **7** (tr = 3,275 min) têm um íon precursor $[M + H]^+$ em m/z 334.1653, consistente com a fórmula molecular ($C_{18}H_{23}NO_5$). Os íons de diagnóstico MS/MS em m/z 316 e 284 formaram por desidratação sucessiva em C-1 e C-3, respectivamente. A clivagem do anel C via rearranjo de RDA levou à formação de íons em m/z 193 ou 124. A partir desses íons, outros fragmentos em m/z 165 ou 162, bem como em m/z 108 e 80 foram formados, espectro de massa e mecanismo encontra-se na Figura 29. Os dados de fragmentação são consistentes com os disponíveis na literatura, 31 portanto, este composto foi caracterizado como narcissidina (**7**) (LI et al., 2019).

Figura 29. (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para a narcissidina (**7**, tr = 3,275 min).



O pico **8** (tr = 3,545 min) forneceu um íon precursor $[M + H]^+$ em m/z 302.1385 ($C_{16}H_{17}NO_4$), bem como íons de fragmento em m/z 270 e 252 produtos da eliminação de metanol e água. Além disso, os íons em m/z 165 e 137 são gerados pela clivagem do anel B via rearranjo de RDA, espectro de massa e mecanismo encontra-se na Figura 30. Assim, sugeriu-se que esse composto seja montanina (**8**) (SCHWEDERSKY et al., 2020).

Figura 30. (A) O espectro MS/MS e (B) a fragmentação proposta para a montanina (**8**, tr = 3,545 min).



O pico **9** (tr = 4,084 min) exibiu um íon precursor $[M + H]^+$ em m/z 336,1819 cuja fórmula molecular foi determinada como sendo $C_{18}H_{25}NO_5$. Além disso, seus íons de produto em m/z 268, 261, 225, 167 e 133 eram compatíveis com um alcaloide desconhecido relatado anteriormente para *H. aulicum* (BESSA et al., 2017).

Em suma, os picos 1, 2, 3 e 7 correspondiam a compostos com esqueleto do tipo licorina. Os picos 5 e 6 eram dos alcaloides do tipo galantamina, enquanto o pico 8 é do tipo montanino. Como mostra a Figura 23.

4.3.3 Ensaios da Inibição de Acetilcolinesterase por extratos de alcaloides de *H. elegans* em diferentes épocas de colheita

4.3.3.1 Ensaios in vitro em seis épocas de colheita de *H. elegans*

O ensaio de inibição da AChE foi realizado com o eeAChE (*Electrophorus electricus*) e enzimas de hAChE (*human*). Embora os ensaios de inibição sejam geralmente feitos com a fonte da enguia elétrica, a enzima humana recombinante é um modelo próximo do objetivo desta investigação. Além disso, embora ambas enzimas têm o mesmo sítio catalítico,

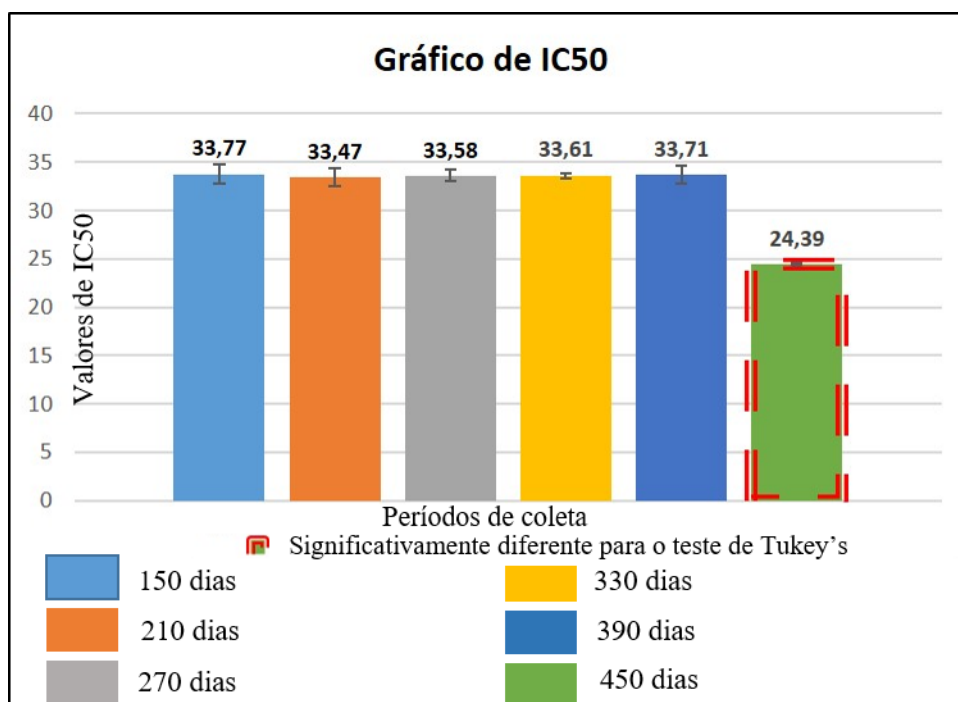
algumas modificações estruturais das proteínas podem mostrar diferenças na potência enzimática, portanto, a eficácia dos inibidores pode não ser reprodutível em modelos enzimáticos (CORTES et al., 2018b).

Ensaio em microplacas foram utilizados para rastrear as substâncias que podem ser inibidoras da enzima acetilcolinesterase. Todos os extratos alcaloídicos de *Hippeastrum elegans* apresentaram resultado positivo na inibição *in vitro* da enzima AChE.

Os padrões utilizados como controle, usados como referência para os ensaios enzimáticos, foram a fisostigmina que foi isolada pela primeira vez no século XIX de *Physostigma venenosum* (Fabaceae) e usado durante muito tempo como um inibidor da AChE, que apresentou bons resultados, mas a utilização clínica foi limitada pelos efeitos colaterais e tempo de meia-vida curto. Já o fitofármaco galantamina tem efeitos colaterais inferiores e ação de longa duração, sendo por isso largamente utilizado para o tratamento do mal de Alzheimer (AGO et al., 2011; HUANG et al., 2013; NAIR et al., 2000). Os seis grupos (períodos de coleta, 150, 210, 270, 330, 390 e 450 dias), com três populações cada, foram avaliados quanto aos resultados dados pela metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) da AChE por análise de variância (ANOVA) de único fator em um nível de confiança 95% e grau de liberdade 17 (Apêndice C), seguida por comparação múltipla entre pares pelo teste de Tukey (Figura 31).

Segundo os valores médios de IC₅₀ expressos na Figura 31 dos extratos de *H. elegans* nas seis épocas de colheita, todos os extratos apresentaram boa inibição da AChE, os valores de IC₅₀ para *H. elegans* no trabalho de CORTES et al., (2018b) foi aproximadamente de $24,00 \pm 3,0$.

Figura 31. Diagrama de inibição da AChE em experimentos *in vitro* nos períodos de coleta com destaque ao período que foi diferenciado no teste de Tukey's.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O teste de Tukey's expresso na Figura 31, ao nível de significância de 5%, as médias dos tratamentos dos seis períodos quanto a IC₅₀ apresentaram diferenças significativas para o sexto período (450 dias). Esse período foi onde ocorreu a diminuição do número de folhas ocasionada pela senescência e abscisão foliar, finalizando o ciclo (450 dias) com aumento do comprimento das folhas restantes e uma acumulação máxima de massa do bulbo e raiz. Os bulbos são produzidos em resposta a algum estímulo (como temperatura, fotoperíodo), recebido pelas folhas e transmitido à região de formação dessa estrutura de reserva. Durante o seu crescimento ocorre na planta o fenômeno de mobilização semelhante ao verificado na frutificação (TOMBOLATO, 2004). Como no último estágio de desenvolvimento da planta, há perda de peso das estruturas que culminam com sua abscisão final, porém reflete um aumento em tamanho e peso (massa) nos bulbos, podendo ser, por isso, o último estágio do ciclo da planta (450 dias, sexto período) ter apresentado maior inibição da AChE. Isso pode estar relacionado com o maior acúmulo de alcaloides no bulbo, sendo que estes compostos não mais se distribuem para as partes aéreas da planta.

O papel da orientação espacial da *N*-metila em alcaloides como do tipo galantamina podem interagir diferentemente no centro ativo da AchE e influenciar de forma positiva ou negativa na inibição da enzima (BARTOLUCCI et al., 2001). Nos estudos do de Andrade et

al., (2016) a galantamina que possui o grupo *N*-metil em disposição equatorial apresentou melhor atividade inibitória da AChE (IC₅₀ 24,1 uM) que a narwedina e a 11β-hidroxi-galantamina, em que o grupo *N*-metil é orientado axialmente. No entanto, a sanguinina exibe os melhores valores de inibição em termos de IC₅₀ e possui o grupo *N*-metil nas orientações axial e equatorial. Sabe-se que os confórmeros relativos ao ligante *N*-metil ligados de forma natural são trocados rapidamente, restringindo assim a orientação de *N*-metil a um papel secundário na inibição da enzima.

Um outro fator que pode influenciar na maior inibição da AChE, para o sexto período do ciclo de *H. elegans*, é a combinação de substâncias ativas com efeito sinérgico que podem aumentar a biodisponibilidade com ações relacionadas à atuação simultânea sobre o mesmo alvo inter-relacionado. Contribuindo dessa forma para o aumento da eficácia na inibição de AChE (CASANOVA; COSTA, 2017). Compostos como a sanguinina identificada nos extratos *H. elegans* apresenta inibição da AChE em termos de IC₅₀: 0,10 ± 0,01 μg mL⁻¹ (LÓPEZ et al., 2002). Essa inibição é maior que a da galantamina (1,07 ± 0,29), compostos como esse podem ter efeito sinérgico aumentando a eficácia da inibição e são passíveis de isolamento na busca de novos inibidores da AChE.

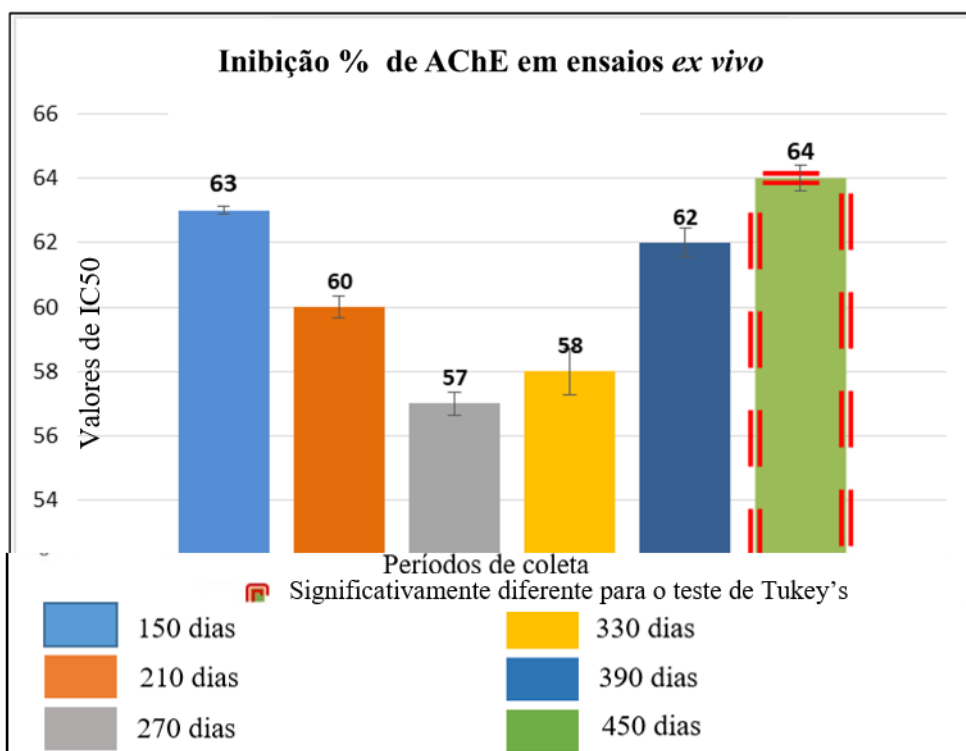
O efeito antagonista competitivo de substâncias com potencial inibitório baixo ou nulo da AChE podem influenciar negativamente (CASANOVA; COSTA, 2017). Substâncias com essa característica foram identificadas para essas amostras na subseção 4.3.2.1 (Tabela 8) como sendo, pseudolicorina (IC₅₀ = 152,32 ± 32,06; μg mL⁻¹), licorina (sem atividade) (LÓPEZ et al., 2002).

4.3.3.2 Ensaios *ex vivo* em seis épocas de colheita de *H. elegans*

Foi testada atividade específica da AChE, obtida de tecido encefálico (córtex) de camundongo, exposto a diferentes concentrações de extratos de alcaloides (2,0; 1,0; 0,5. 0,25; 0,12; 0,061 e 0,031 mg.ml⁻¹). Foi observada inibição significativa da AChE em todas as concentrações testadas, exceto 0,061 e 0,031 mg.ml⁻¹, quando comparados ao controle. Nos ensaios optou-se a utilizar a concentração 1,0 mg.ml⁻¹. Os cálculos estatísticos foram realizados seguindo a mesma metodologia dos ensaios *in vitro*. Os dados da ANOVA encontra-se no Apêndice E e teste de Tukey's no Apêndice F.

O sexto período (450 dias), assim como nos ensaios *in vitro*, demonstrou a maior inibição da AChE (Figura 32). Os dados da ANOVA encontra-se no Apêndice G.

Figura 32. Diagrama de inibição da AChE em experimentos *ex vivo* para extratos alcaloídicos de *H. elegans* em diferentes épocas de colheita: 150, 210, 270, 330, 390 e 450, com destaque ao período que foi diferenciado no teste de Tukey's.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

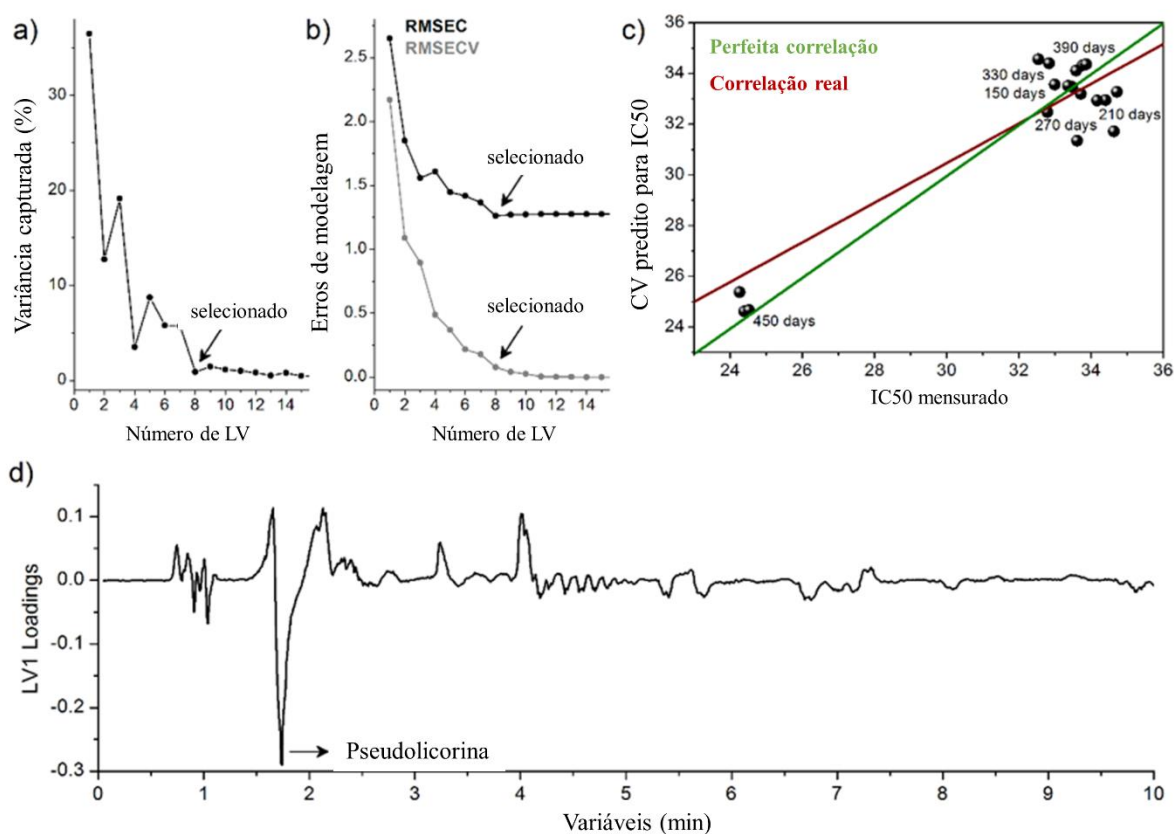
Esse resultado mostra que a composição alcaloídica dessas frações tem grande relevância do ponto de vista químico e farmacológico, porque um tipo de alcaloide diferente dos alcaloides do tipo galantamina estão influenciando possivelmente na atividade de inibição da AChE bastante significativa e que apoiam a relevância química das espécies de Amaryllidaceae para a inibição de colinesterases e como potentes fontes de metabólitos para o tratamento paliativo da DA.

4.3.4 Modelagem PLS

4.3.4.1 Análise de regressão baseada na atividade anticolinesterase e no conjunto de dados de UPLC-ESI-QTOF-MS

As atividades anticolinesterásicas *in vitro* descritas na Figura 31 foram utilizadas como variáveis categóricas para a análise de regressão PLS (Figura 33), cujos parâmetros estatísticos são mostrados no Apêndice H.

Figura 33. Respostas estatísticas da modelagem PLS para dados UPLC-ESI-QTOF-MS usando a atividade inibidora da acetilcolinesterase *in vitro* (AChE) como variáveis categóricas (coluna Y): a) variância capturada de acordo com o número f LV; b) erros de RMSEC e RMSECV com base no número f LV; c) valores de anti-AChE medido (real) \times predito pelo modelo de validação cruzada; d) Cargas de LV1 dos compostos fortemente indicados como compostos biomarcadores para a atividade anticolinesterase.



Os baixos erros encontrados para os valores de RMSEC e RMSECV, alto coeficiente de correlação para o método de calibração ($r^2_{cal} = 0,999$), bem como a proximidade entre a atividade anticolinesterase medida e a predita pelo modelo (Figura 33c) indicaram que o modelo para os resultados experimentais *in vitro* foram bem ajustados usando oito variáveis latentes (8 LV). No entanto, o baixo coeficiente de correlação relativo para o modelo de validação cruzada ($r^2_{cv} = 0,87$) e a diferença acentuada entre os valores de RMSEC e RMSECV

podem ser atribuídos ao baixo número de repetições experimentais. Por outro lado, não encontramos correlação relevante entre os compostos e o efeito biológico para o conjunto de dados do ensaio *ex vivo* (dados não mostrados). É mais provável que este último ensaio apresente variações, pois emprega uma mistura de isoformas da enzima acetilcolinesterase (tipos G1 e G4) a partir de substratos cerebrais de murino, em vez de uma única isoforma encontrada na enzima humana pura (tipo G2 ou G4) (DAS *et al.*, 2001).

O gráfico de *loading* do LV mostrou que o pico 2, em 1,68 min, foi responsável por discriminar o extrato de 450 dias de cultivo de outras amostras. Este composto foi identificado como pseudolicorina. Como não há diferença significativa no conteúdo de galantamina e sanguinina (dois potentes inibidores da AChE) para amostras entre 330 e 450 dias, inferimos que a pseudolicorina deveria ter contribuído significativamente para a atividade anticolinesterase.

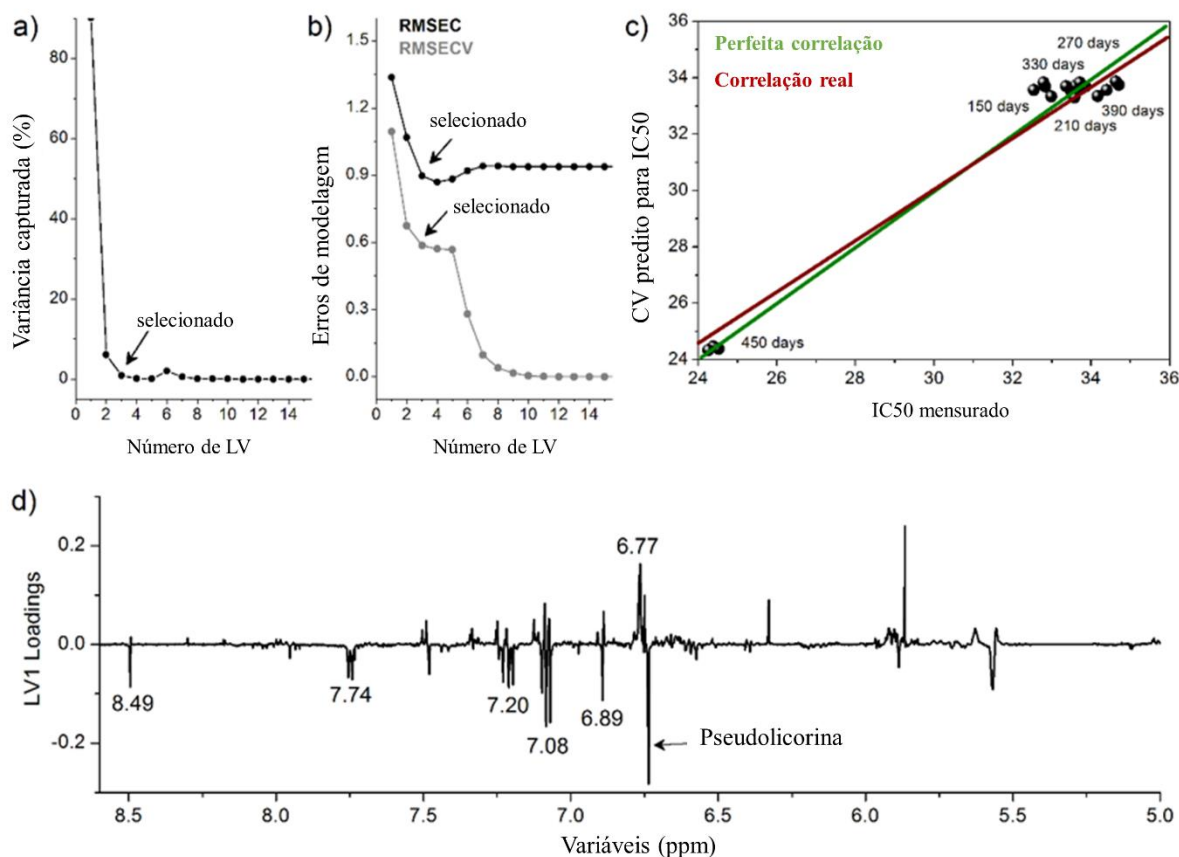
4.3.4.2 Análise de regressão baseada na atividade anticolinesterase e no conjunto de dados de RMN

Como realizado para o conjunto de dados UPLC-ESI-QTOF-MS, realizamos análises de regressão PLS combinando as atividades anticolinesterase *in vitro* e *ex vivo* com o conjunto de dados RMN. Os parâmetros estatísticos determinados para esses modelos de PLS estão descritos no Apêndice I. Todos os espectros de RMN para extratos dos seis períodos de coleta dos bulbos de *H. elegans* são mostrados no Apêndice J-P.

A análise PLS baseada em dados de RMN mostrou baixos valores para RMSEC e RMSECV, alto coeficiente de correlação do método de calibração ($r^2_{\text{cal}} = 0,999$), modelagem de validação cruzada ($r^2_{\text{CV}} = 0,93$), bem como a proximidade entre os valores medidos e preditos para a atividade anticolinesterase (Figura 34), indicando que o modelo para os resultados experimentais *in vitro* foi bem ajustado usando três variáveis latentes (3 LV). No entanto, como observado para a análise PLS do conjunto de dados UPLC-ESI-QTOF-MS, não foi encontrada correlação significativa entre os compostos e o efeito biológico para o conjunto de dados do ensaio *ex vivo* (dados não mostrados).

Figura 34. Respostas estatísticas da modelagem PLS para dados de RMN usando a atividade inibidora da acetilcolinesterase *in vitro* (AChE) como variáveis categóricas (coluna Y): a)

variância capturada de acordo com o número fLV; b) erros RMSEC e RMSECV baseados no número fLV; c) valores de atividade anti-AChE medida (real) \times predita pelo modelo de validação cruzada; d) cargas de LV1 dos compostos fortemente indicados como compostos biomarcadores para a atividade anticolinesterase.



O gráfico de *loading* do LV (Figura 34d) revelou que as ressonâncias em δ_H 5,62, 6,78 e 6,89 foram responsáveis por discriminar o extrato de 450 dias de cultivo (maior atividade inibidora da AChE) das outras amostras. Além disso, o espectro HSQC (Apêndice O) mostrou correlações cujos desvios químicos são compatíveis com os relatados para pseudolicorina (CARVALHO *et al.*, 2015): δ_H/δ_C 6,89 (s)/112,45 (C-10), 6,78 (s)/111,50 (C-7), 5,62 (s br)/120,00 (C-3), 4,19 (s br)/72,47 (C-2) e 4,49 (br s)/71,13 (C-1). Assim, esse achado corrobora o resultado da UPLC-ESI-QTOF-MS, que apontou a pseudolicorina como biomarcador para o extrato de 450 dias.

Portanto, presumimos que a pseudolicorina, juntamente com a galantamina e a sanguinina (dois inibidores conhecidos da AChE), deve contribuir para a inibição da acetilcolinesterase por meio de um mecanismo sinérgico, uma vez que a pseudolicorina exibe apenas um efeito moderado contra essa enzima ($IC_{50} = 152,3 \mu M$) (BASTIDA *et al.*, 2002).

4.4 Estudo das espécies de Amaryllidaceae coletadas em várias regiões do Brasil

4.4.1 Quantificação dos alcaloides galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina em espécies de Amaryllidaceae coletadas em várias regiões do Brasil (coleção de Amaryllidaceae da Embrapa)

O método desenvolvido em UPLC-QDA-SIM na subseção 3.8 foi aplicado para a quantificação simultânea dos quatro alcaloides na coleção de Amaryllidaceae da Embrapa ,67 amostras. A identificação dos quatro alcaloides em todas as amostras coletadas foi estabelecida pela comparação do tempo de retenção e do espectro de massas, além da área do pico do padrão.

A quantificação desses alcaloides em uma grande gama de espécies da família Amaryllidaceae nativas brasileiras é de fundamental importância, haja visto que não há relatórios disponíveis sobre a estimativa quantitativa destes alcaloides nesses números de populações selvagens. Os teores desses alcaloides estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Quantificação dos alcaloides galantamina (Gal), sanguinina (Sang), pseudolicorina (Pseu) e narciclasina (Narc) em Amaryllidaceae de várias regiões brasileiras (continua).

Gênero	Espécie	Código	µg alcaloide/ 1g bulbo seco (sdt)			
			Gal	Sang	Pseu	Narc
<i>Habranthus</i>	<i>H. bahiensis</i> Ravenna	HB1	3,14 (± 0,1)	-	227,7 (± 18,4)	978,2 (± 4,1,)
		HB2	-	-	226,5 (± 3,0)	-
	<i>H. sylvaticus</i> Herb.	HS1	-	-	5.097,5 (± 5,0)	-
		HS2	-	-	217,1, (± 1,5)	-
	<i>H. irwinianus</i> Ravenna	HI1	2,5 (± 0,4)	-	309,0 (± 2,8)	1.23,7 (± 2,9)
		HI2	2,3 (± 0,5)	-	1.53,1 (± 3,5)	197,9 (± 5,4)
		HI3	1,3 (± 0,3)	-	131,4 (± 6,0)	-
		HI4	2,0 (± 0,1)	-	205,1 (± 2,3)	-
		HI5	-	-	-	272,5 (± 5,3)
		HI6	1,9 (± 0,1)	-	-	-
		HI7	2,1 (± 0,2)	-	293,2 (± 4,5)	122,2 (± 2,0)
		HI8	2,6 (± 0,1)	-	154,9 (± 3,5)	-
	<i>H. lucidus</i> R.S. Oliveira	HL1	1,7 (± 0,0)	-	150,1 (± 2,6)	174,3 (± 3,6)
		HD1	5,0 (± 0,1)	-	1.890,8 (± 78,8)	-
	<i>H. datensis</i> Ravenna	HD2	-	-	-	244,7 (± 1,6)
		HG1	-	-	227,0 (± 2,8)	-

Tabela 9. Quantificação dos alcaloides galantamina (Gal), sanguinina (Sang), pseudolicorina (Pseu) e narciclasina (Narc) em Amaryllidaceae de várias regiões brasileiras (continuação).

Espécie	Código	µg alcaloide/ 1g bulbo seco (sdt)				
		Gal	Sang	Pseu	Narc	
<i>Habranthus</i>	Hsp2	2,1 (± 0,1)	-	189,6 (± 3,0)	426,2 (± 15,6)	
	Hsp3	-	-	241,8 (± 1,7)	791,7 (± 0,0)	
	Hsp4	-	-	481,8 (± 1,4)	448,6 (± 0,0)	
	<i>Habranthus sp.</i>	Hsp5	3,7 (± 0,2)	-	127,3 (± 1,8)	367,8 (± 15,0)
	Hsp6	-	-	-	648,5 (± 11,2)	
	Hsp7	1,8 (± 0,1)	-	121,8 (± 0,0)	-	
	Hsp8	1,8 (± 0,1)	-	137,9 (± 1,1)	-	
	<i>H. cf. Puniceum</i>	HicP	2,4 (± 0,1)	-	-	385,8 (± 8,0)
<i>H. reginae</i> (L.) Herb.	HiR	-	-	1.26,5 (± 0,8)	-	
<i>Habranthus cf. irwinianus</i> Ravenna	HcI	41,7(± 0,9)	-	372,6 (± 2,8)	-	
<i>Hippeastrum</i>	<i>H. cf. elegans</i> (Lindl.) Herb	HiE	-	-	324,1 (± 1,5)	6.873,0 (± 45,0)
	HiP1	-	4,5 (± 0,2)	275,6 (± 90,)	2.888,2 (± 30,0)	
	HiP2	-	-	-	732,4 (± 14,0)	
	<i>H. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	HiP3	-	-	313,8 (± 1,5)	-
	HiP4	-	-	175,9 (± 1,1)	-	

Tabela 9. Quantificação dos alcaloides galantamina (Gal), sanguinina (Sang), pseudolicorina (Pseu) e narciclasina (Narc) em Amaryllidaceae de várias regiões brasileiras (continuação).

Gênero	Espécie	Código	µg alcaloide/ 1g bulbo seco (sdt)			
			Gal	Sang	Pseu	Narc
<i>Hippeastrum</i>	<i>H. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	Hip5	39,3,0 (±0,5)	284,1 (± 4,3)	237,5 (± 2,6)	-
		Hip6	-	-	7119,4 (± 35,0)	1529,3 (± 4,4)
	<i>H. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	Hip7	-	-	144,5 (± 6,0)	-
		HiG	4,9(± 0,3)	11,2 (± 0,3)	132,0 (± 1,0)	158,2 (± 2,0)
	<i>H. cf. puniceum</i>	HicP	3,6 (± 0,1)	-	-	-
		Hisp1	1,8 (± 0,1)	-	204,6 (± 1,0)	-
		Hisp2	-	-	176,8 (± 1,5)	-
		Hisp3	-	-	432,6 (± 0,9)	-
		Hisp4	-	-	514,8 (± 1,6)	-
		Hisp5	-	-	139,9 (± 1,9)	-
		Hisp6	-	-	118,6 (± 0,5)	-
		Hisp7	-	-	159,7 (± 1,0)	-
		Hisp8	-	16,3 (± 0,2)	134,4 (±1,5)	740,8 (± 11,0)
		Hisp9	-	-	421,8 (± 2,8)	-
		Hisp10	4,4 (± 0,5)	136,5 (± 5,0)	119,2 (± 3,0,)	-
	Hisp11	17,2 (± 0,6)	-	201,3 (± 3,8)	-	

Tabela 9. Quantificação dos alcaloides galantamina (Gal), sanguinina (Sang), pseudolicorina (Pseu) e narciclasina (Narc) em Amaryllidaceae de várias regiões brasileiras (continuação).

Gênero	Espécie	Código	µg alcaloide/ 1g bulbo seco (sdt)			
			Gal	Sang	Pseu	Narc
<i>Hippeastrum</i>	<i>Hippeastrum</i> sp.	His12	2,1 (± 0,1)	30,9 (± 1,0)	1118,3 (± 16,5)	-
		His13	19,7 (± 0,4)	-	324,1 (± 6,5)	-
		His14	13,3 (± 0,2)	-	-	-
	<i>H. goianum</i> (Ravenna)	Hig1	26,7 (± 0,5)	1.57,4 (± 2,5)	1.551,3 (± 4,2)	-
		Meerow	Hig2	-	-	179,3 (± 7,1)
	Sem classificação	-	SC1	1,7 (± 0,1)	-	690,4 (± 7,9)
-		SC2	-	-	1.093,5 (± 76,2)	-
-		SC3	-	-	838,1 (± 14,1)	-
-		SC4	-	-	331,9 (± 5,4)	-
-		SC5	-	-	233,9 (± 8,0)	-
<i>Hymenocallis</i>	<i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb.	HyL1	39,4 (± 3,0)	-	409,6 (± 6,3)	219,0 (± 1,4)
<i>Zephyranthes</i>	<i>Zephyranthes</i> sp.	Zsp1	31,7 (± 0,5)	-	126,0 (± 0,0)	-
		Zsp2	15,5 (± 0,1)	-	326,5 (± 2,4)	-

Tabela 9. Quantificação dos alcaloides galantamina (Gal), sanguinina (Sang), pseudolicorina (Pseu) e narciclasina (Narc) em Amaryllidaceae de várias regiões brasileiras (continuação).

Gênero	Espécie	Código	µg alcaloide/ 1g bulbo seco (sdt)			
			Gal	Sang	Pseu	Narc
<i>Zephyranthes</i>	<i>Zephyranthes sp.</i>	Zsp3	-	-	316,2 (± 25,1)	-
		Zsp4	-	-	187,9 (± 1,3)	-
	<i>Zephyranthes robusta</i> (Herb. ex Sweet) Baker	ZR1	-	1.28,1 (± 1,5)	199,7 (± 1,5)	318,2 (± 11,1)
		GN1	79,2 (± 0,5)	-	358,2 (± 3,2)	418,4 (± 0,0)
<i>Griffinia</i>	<i>Griffinia nocturna</i> Ravenna	GN2	-	-	5.232,6 (± 26,8,)	-
		Gsp1	1,7 (± 0,1)	-	269,7 (± 7,0,)	462,9 (± 34,9)
	<i>Griffinia sp.</i>	Gsp2	140,2 (± 4,0)	-	3.066,7 (± 5,8)	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O teor de galantamina variou nas espécies de Amaryllidaceae de 1,2 a 140,2 µg/g de bulbo seco (bs), apresentando maior teor em *Griffinia* sp (GN2). Até o presente momento não havia relatórios disponíveis sobre a estimativa quantitativa de galantamina em populações do gênero *Griffinia*. Esse teor de galantamina está entre valores encontrados por Abou-Donia et al.,(2008b), 33,0 a 354 de µg/g bs em *Narcissus* cv.

Os teores de sanguinina variaram de 4,5 a 284,1 µg/g bs com maior teor de sanguinina em *Hippeastrum* cf. *puniceum* (Lam.) Kuntze (Hip5); pseudolicorina de 113,8 a 7119,4 µg/g BS com maior teor de pseudolicorina em *Hippeastrum* cf. *puniceum* (Lam.) Kuntze (Hip6) e narciclasina 122,2 a 6.873,0 µg/g bs apresentando maior teor em *Hippeastrum*. cf. *elegans* (Lindl.) Herb (HiE). Com exceção da galantamina que apresentou maior teor no gênero *Griffinia*, os outros alcaloides apresentaram maiores teores no gênero *Hippeastrum*, esse que é distribuído quase que exclusivamente na América Latina em especial o Brasil (GIORDANI et al., 2011).

A influência do meio-ambiente (origem geográfica) e práticas culturais sobre a composição química das plantas é bem documentada na literatura (AGHAEI et al., 2013; HADIAN et al., 2011; KHADIVI-KHUB, 2014). No entanto, as variações dos teores dos quatro alcaloides investigados evidenciam que o fator genético desempenha um papel importante na biossíntese desses compostos dentro de um mesmo gênero e espécie, haja visto que todas as plantas estudadas foram cultivadas em vasos e submetidas às mesmas condições climáticas e de cultivo.

Esse estudo forneceu dados inéditos quanto à presença do alcaloide galantamina em *Hippeastrum reginae* (L.) Herb (HiR), *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow (Hig), *Hippeastrum* cf. *puniceum* (Lam.) Kuntze (HiP), *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb (HyL) e para todo o gênero *Griffinia* (GN). A sanguinina é inédita em *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow (Hig), *Hippeastrum* cf. *puniceum* (Lam.) Kuntze (Hip), *Zephyranthes robusta* (Herb. Ex Sweet) Baker (ZR). Foi relatado na literatura pseudolicorina e narciclasina apenas para *Hippeastrum elegans* (HiE) das espécies investigadas nesse trabalho (CARVALHO et al., 2015; SILVA, 2009).

Contudo, é necessária uma seleção intensiva em Amaryllidaceae silvestres para obtenção de cultivares para a extração destes alcaloides. A esse respeito, destacam-se o gênero nativo *Hippeastrum* que apresentou as maiores concentrações de sanguinina, pseudolicorina e narciclasina, enquanto o gênero nativo *Griffinia* apresentou os maiores teores de galantamina.

4.4.2 Ensaio da Inibição da Acetilcolinesterase

Os ensaios *in vitro*, subseção 3.10.1, foram utilizados como triagem para seleção dos melhores estratos que posteriormente foram submetidos a ensaios *ex vivo* como descrito na subseção 3.10.2.

4.4.2.1 Ensaio *in vitro* em extratos de alcaloides das 67 plantas da família Amaryllidaceae (coleção Embrapa)

Ensaio em microplacas foram utilizados para rastrear as substâncias que podem ser inibidoras da enzima acetilcolinesterase. Todos os extratos ricos em alcaloides das 67 plantas da família Amaryllidaceae, apresentaram resultado positivo na inibição da enzima AchE, com as análises na leitora ELISA, como representado na Tabela 10.

Tabela 10. Ensaios da Inibição de Acetilcolinesterase *in vitro* por extratos de alcaloides das 67 plantas da família Amaryllidaceae (continua).

Gênero	Espécie	Código	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	Gênero	Espécie	Códi	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	
<i>Habranthus</i>	<i>H. bahiensis</i>	HB1	17,68 ± 0,05	<i>Hippeastrum</i>	<i>H. cf. Puniceum</i>	Hsp2	32,87 ± 0,01	
	Ravenna	HB2	14,12 ± 0,53			Hsp3	13,01 ± 0,01	
	<i>H. sylvaticus</i>	HS1	37,91 ± 0,19			Hsp4	16,97 ± 0,47	
	Herb.	HS2	30,17 ± 0,36			Hsp5	35,34 ± 0,02	
		HI1	35,34 ± 0,99			Hsp6	16,64 ± 0,17	
		HI2	28,51 ± 0,49			Hsp7	23,67 ± 0,05	
		HI3	20,15 ± 0,14			Hsp8	10,71 ± 0,26	
	<i>H. irwinianus</i>	HI4	20,15 ± 0,09			HiP1	35,58 ± 0,29	
	Ravenna							
		HI5	26,74 ± 0,80			HiR1	17,72 ± 0,57	
						Herb.		
		HI6	15,42 ± 0,05			<i>H. cf. elegans</i>	25,03 ± 0,17	
						(Lindl.) Herb	HiE1	
		HI7	17,19 ± 0,19				HiP2	17,54 ± 0,85
		HI8	27,15 ±			<i>H. puniceum</i>	HiP3	15,11 ± 0,30
	<i>H. lucidus</i> R.S.	HL1				(Lam.) Kuntze	HiP4	36,36 ± 0,23
	Oliveira		26,74 ± 0,06					
	<i>H. datensis</i>	HD1	24,77 ± 0,08				HiP5	24,66 ± 0,48
Ravenna	HD2	26,87 ± 0,09	<i>H. glaucescens</i>	HiG	27,22 ± 0,01			
			(Mart.) Herb.					
<i>H. gracilifolius</i>	HG1		<i>H. puniceum</i>	HiP6	24,66 ± 0,18			
Herb.		35,35 ± 0,40						
<i>Habranthus sp.</i>	Hsp2	32,87 ± 0,01	<i>H. cf. ir.</i>	HiI	20,76 ± 0,37			
	Hsp3	13,01 ± 0,01	Ravenna					

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Tabela 10. Ensaios da Inibição de Acetilcolinesterase *in vitro* por extratos de alcaloides das 67 plantas da família Amaryllidaceae (continuação).

Género	Espécie	Código	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	Género	Espécie	Código	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	
<i>Hippeastrum</i>	<i>H. cf. Puniceum</i>	HiP1	17,68 ± 0,29	<i>Hippeastrum</i>	<i>Hippeastrum sp.</i>	Hisp9	37,91 ± 0,17	
	<i>H. reginae</i> (L.) Herb.	HiR1	17,72 ± 0,57				Hisp10	35,31 ± 0,30
	<i>H. cf. solandriiflorum</i> (Lindl.) Herb	HiE1	22,07 ± 0,17				Hisp11	11,82 ± 0,40
		HiP2	17,54 ± 0,85				Hisp12	17,71 ± 0,71
	<i>H. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	HiP3	15,11 ± 0,30				Hisp13	24,69 ± 0,41
		HiP4	21,81 ± 0,23				Hisp14	23,60 ± 0,15
		HiP5	26,24 ± 0,48			<i>H. goianum</i> (Ravenna) Meerow	Hig1	11,91 ± 0,36
	<i>H. glaucescens</i> (Mart.) Herb.	HiG	22,11 ± 0,01				Hig2	28,54 ± 0,87
	<i>H. puniceum</i>	HiP6	24,23 ± 0,18			<i>H. cf. puniceum</i> (Lam.) Kuntze	Hip1	35,23 ± 0,20
	<i>Hippeastrum sp.</i>	Hisp	26,44 ± 0,24				Hip2	28,54 ± 0,31
		Hisp1	17,67 ± 0,25				Hip3	26,32 ± 0,23
		Hisp2	23,76 ± 0,21				SC1	24,77 ± 0,46
		Hisp3	13,43 ± 0,24			Sem classificação	SC2	24,23 ± 0,73
		Hisp4	35,34 ± 0,60				SC3	13,15 ± 0,21
		Hisp5	25,64 ± 0,48				SC4	23,52 ± 0,21
		Hisp6	35,03 ± 0,53				SC5	27,24 ± 0,28
	Hisp7	22,98 ± 0,23		<i>Hymenocallis</i>	HL1	25,49 ± 0,80		
	Hisp8	30,17 ± 0,16						

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Tabela 10. Ensaio da Inibição de Acetilcolinesterase *in vitro* por extratos de alcaloides das 67 plantas da família Amaryllidaceae (continuação).

Género	Espécie	Código	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	Género	Espécie	Código	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹
<i>Zephyranthes</i>	<i>Zephyranthes</i> <i>sp.</i>	Zsp1	26,68 ± 0,75	<i>Griffinia</i>	<i>Griffinia</i> <i>nocturna</i> Ravenna	GN1	17,88 ± 0,56
		Zsp2	22,94 ± 0,26		GN2	17,64 ± 0,15	
		Zsp3	24,69 ± 0,70		GL	17,11 ± 0,60	
	Zsp4	23,60 ± 0,45	Gsp1		25,54 ± 0,60		
	<i>Zephyranthes</i> <i>robusta</i> (Herb. ex Sweet) Baker	ZR1	17,68 ± 0,10		<i>Griffinia sp.</i>	Gsp2	89,05 ± 0,58

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Baseado em uma vasta pesquisa na literatura quanto a inibição da AChE *in vitro* por extratos de bulbos de Amaryllidaceae, em termos de IC₅₀, adotamos que extratos com inibição até vinte vezes o valor do padrão positivo galantamina (IC₅₀ 1,07 ± 0,25 µg.mL⁻¹) são considerados bons inibidores da AChE *in vitro* (CAVALLARO et al., 2014; CORTES et al., 2015b, 2018b; LOPEZ, 2018; MURRAY et al., 2013; ORTIZ et al., 2012; MALI et al., 2015).

As espécies do gênero *Habranthus* apresentaram os seguintes resultados: *H. bahiensis* Ravenna (plantas HB1 e HB2) apresentou o teor de 3,14 ± 0,1 µg/g de galantamina (GAL) para HB1, *H. irwinianus* Ravenna (plantas HI3, HI6 e HI7) com 1,3 ± 0,3; 1,9 ± 0,1 e 2,1 ± 0,2 µg/g de GAL, respectivamente, *Habranthus sp* (plantas Hsp3, Hsp4, Hsp6 e Hsp8) com 1,8 ± 0,1 µg/g de GAL. Espécies do gênero *Hippeastrum* apresentaram: *H. cf. Puniceum* (planta HicP) com 3,6 ± 0,1 µg/g de GAL, *H. reginae* (L.) Herb. (planta HiR), *H. puniceum* (Lam.) Kuntze (plantas HiP1 e HiP2) com 4,5 ± 0,2 µg/g de sanguinina (SAN) para amostra HiP1, *Hippeastrum sp.* (plantas Hsp1, Hsp3, Hsp11 e Hsp12) apresentou 1,8 ± 0,1 (Hsp1); 17,2 ± 0,6 (Hsp11) µg/g de GAL e amostra Hsp12 que além de conter 2,1 ± 0,1 µg/g de GAL apresentou 30,9 ± 1,0 µg/g de SAN; *H. goianum* (Ravenna) Meerow (planta Hig1) com 26,7 ± 0,5 µg/g de GAL e 157,4 ± 2,5 µg/g de SAN. Espécies do gênero *Griffinia*: *Griffinia nocturna* Ravenna (plantas GN1 e GN2) com 79,2 ± 0,5 µg/g de GAL (GN1) e *Griffinia liboniana* (planta GL). Todas essas amostras apresentaram ótimos resultados de IC₅₀ na inibição da AChE *in vitro*. Amostras contendo fortes inibidores da AChE como os alcaloides GAL e SAN corroboraram de forma efetiva na inibição direta ou por sinergismo na AChE (CASANOVA; COSTA, 2017).

Quanto as espécies que demonstram boa inibição frente AChE *in vitro*, essa é primeira vez que *Habranthus bahiensis* Ravenna (plantas HB1 e HB2), *Hippeastrum reginae* (L.) Herb. (planta HiR), *Griffinia nocturna* Ravenna (plantas GN1 e GN2) e *Griffinia liboniana* (planta GL) foram avaliados quanto à inibição da AChE. Da mesma forma esse é o primeiro relato na literatura da avaliação das espécies *Habranthus sylvaticus* Herb. (planta HS1), *H. lucidus* R.S. Oliveira (planta HL1), *H. datensis* Ravenna (planta HD1 e HD2), *H. gracilifolius* Herb. (planta HG1), *Hippeastrum glaucescens* (Mart.) Herb. (planta HiG) e *Zephyranthes robusta* (Herb. Ex Sweet Baker) (planta ZR1) que demonstraram baixa inibição da AChE *in vitro*.

Extratos dos bulbos do gênero *Habranthus*, especificamente das espécies *jamesonii* (ORTIZ et al., 2012), *tubispathus* (CAVALLARO et al., 2014) e *irwinianus* (LOPEZ, 2018) já foram estudados quanto a inibição da AChE com valores de IC₅₀ 2,00; 12,5 e 121,0 µg.mL⁻¹, respectivamente. Dessas espécies de *Habranthus*, apenas a *irwinianus* Ravenna (plantas HI1 a

HI8) foi avaliada neste trabalho com IC_{50} variando de $15,42 \pm 0,05$ a $35,39 \pm 0,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando ser mais eficiente na inibição da AChE que a na literatura. Esse resultado pode está relacinado a presença de $2,1 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ de GAL.

Quanto ao gênero *Hippeastrum*, já foram estudados extratos dos bulbos das espécies *psittacinum* (LOPEZ, 2018), *puniceum* (CORTES et al., 2015a), *barbatum* (CORTES et al., 2015b), *elegans* (CORTES et al., 2018b) e *goianum* (LOPEZ, 2018) com valores de IC_{50} 14,30; 25,73; 28,13; 40,00 e 45,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Dessas espécies citadas as estudadas neste trabalho foram: *Puniceum* (plantas HiP1 a HiP5) com IC_{50} variando de $15,11 \pm 0,30$ a $26,24 \pm 0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde a planta Hip1 ($IC_{50} 17,68 \pm 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou $4,5 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ de SAN e Hip5 ($IC_{50} 17,68 \pm 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com $39,3 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ de GAL e um alto teor $284,1 \pm 2,6 \mu\text{g/g}$ de SAN; *elegans* (planta HiE1) com $IC_{50} 22,07 \pm 0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$; *goianum* (plantas Hig1 e 2) com IC_{50} $11,91 \pm 0,36$ a $28,54 \pm 0,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde a planta Hig1 continha $26,7 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ de GAL e $157,4 \pm 2,5 \mu\text{g/g}$ de SAN, essa amostra e as demais mencionadas neste trabalho que continham GAL e SAN corroboram com a boa inibição da AChE. Todas demonstram ser mais eficientes na inibição da AChE em ensaios *in vitro*, que as listadas na literatura para o mesmo gênero de planta de Amaryllidaceae.

Os extratos dos bulbos do gênero *Zephyranthes* já foram estudados para as espécies *filifolia* (ORTIZ et al., 2012), *carinata* (CORTES et al., 2015b) e *grandiflora* (MURRAY et al., 2013) com valores de IC_{50} 1,00; 17,96 e 39,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A espécie de *Zephyranthes* estudada neste trabalho foi a *robusta* (planta ZR1) com $IC_{50} 36,36 \pm 0,10$ contendo $128,1 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$ de SAN. Também foram estudadas espécies não identificadas (plantas Zsp1 a 4) com IC_{50} $24,69 \pm 0,70$ a $33,67 \pm 0,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde as plantas Zsp1 e Zsp2 apresentaram $31,7 \pm 0,5$ e $15,5 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ de GAL, respectivamente. Os resultados de inibição frente a ensaios *in vitro* da AChE foram menos eficientes que os listados na literatura para o mesmo gênero, exceto para a espécie *grandiflora*.

Quanto ao gênero *Hymenocallis*, já foram estudados os bulbos para as espécies *caribaea* (CORTES et al., 2015a), *litorallis* (LOPEZ, 2018), ‘Sulphur Queen’ e *Hymenocallis* x *festalis* ‘Zwanenburg’ (ABU-REIDAH et al., 2015) com valores de IC_{50} 44,16; 132,3; 63,04 e 38,32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A única espécie de *Hymenocallis* estudada neste trabalho foi a *litorallis* (planta HiL1) que apresentou valor de $IC_{50} 25,49 \pm 0,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e teor de $39,4 \pm 3,0 \mu\text{g/g}$ de GAL. A inibição foi cerca de cinco vezes maior em relação à amostra estudada na literatura, evidenciando o potencial destas plantas na inibição da AChE frente a outras variações do mesmo gênero.

Tais diferenças entre os mesmos gêneros corroboram a interferência das características da área de coleta na composição micromolecular da amostra analisada e a necessidade de monitoramento da área de obtenção de qualquer material vegetal para utilização como insumo para fitoterápicos ou matéria-prima na obtenção de fitofármacos, além das alterações genéticas entre gêneros de regiões e períodos distintos de coleta (FANG; LUO, 2019).

4.4.2.2. Ensaios *ex vivo* por extratos de alcaloides da família Amaryllidaceae

Os melhores resultados dos testes *in vitro* das espécies de Amaryllidaceae foram selecionados para realização dos ensaios *ex vivo* no monitoramento da atividade específica da AChE, obtida de tecido encefálico (córtex) de camundongo. Os resultados das mostras dados por percentuais de inibição enzimática, calculado com base na maior concentração testada em relação ao controle positivo que apresenta uma atividade de 100%, estão listados na Tabela 11.

Tabela 11. Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase *ex vivo* em frações de alcaloides de Amaryllidaceae.

Gênero	Espécie	Amostra	Inibição AChE (%)
<i>Hippeastrum</i>	<i>H. puniceum</i> Kuntze	HiP3	58 ± 0,11
		Hig1	17 ± 0,43
	<i>Hippeastrum sp.</i>	Hisp1	18 ± 1,00
		Hisp11	45 ± 0,74
		Hisp12	30 ± 0,32
<i>Habranthus</i>	<i>H. irwinianus</i> Ravenna	HI6	41 ± 0,79
		HI7	37 ± 1,31
		Hsp4	29 ± 0,53
		Hsp5	40 ± 0,88
	<i>Habranthus sp.</i>	Hsp8	26 ± 1,09
		Hsp3	33 ± 1,06
		<i>H. bahiensis</i> Ravenna	HB1
	HB2		51 ± 1,00
	<i>Habranthus datensis</i> Ravenna	HD	31 ± 1,11
<i>Griffinia</i>	<i>Griffinia nocturna</i> Ravenna	GN1	48 ± 0,53
		GL	69 ± 0,53
	<i>Griffinia gardneeanana</i>	GG	79 ± 0,62

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Os ensaios *ex vivo* da Tabela 11 revelaram que o gênero *Griffinia*, mais especificamente as espécies *liboniana* e *gardneeinana*, inibiram significativamente a AChE quando comparados ao controle, no entanto as outras amostras não apresentaram bons resultados inibitórios nos ensaios *ex vivo*. *Griffinia liboniana* já havia apresentado boa inibição nos ensaios *in vitro* com IC₅₀ 17,11 e a *Griffinia gardneeinana* não fez parte dos ensaios *in vitro*. Quanto a *Griffinia liboniana* conhecida como amarílis-azul, é originária e endêmica da Mata Atlântica e ainda rara em cultivo. O habitat seriamente alterado pelo desmatamento, aliado à coleta predatória, tornam a *Griffinia liboniana*, uma espécie ameaçada de extinção (MEEROW et al., 2000).

Estes resultados inéditos para a literatura revelam que o gênero *Griffinia* exerce um forte efeito inibitório da AChE *in vitro e ex vivo*. Esses resultados abrem um novo leque de pesquisas que podem ajudar a entender as bases moleculares para a atividade de inibição da AChE, podendo ser úteis no planejamento racional de anticolinesterásicos e no tratamento de algumas doenças associadas à AChE no futuro.

5. CONCLUSÃO

O método UPLC-SIM-QDA desenvolvido apresentou boa linearidade e seletividade, recuperação satisfatória, precisão, limites de detecção e quantificação para a análise simultânea de galantamina, sanguinina, pseudolicorina e narciclasina em diferentes espécies de Amaryllidaceae. De fato, o referido método mostrou ser rápido, sensível e confiável, por isso foi aplicado na análise quantitativa de alcaloides de extratos de bulbos da Coleção de Amaryllidaceae da Embrapa (CAE) e de materiais cultivados de *Hippeastrum elegans*. Além do mais, o método pode ser aplicado em programas de melhoramento de plantas ricas em galantamina e na prospecção de novas fontes desse composto e dos outros três alcaloides bioativos.

Na avaliação dos materiais da CAE, a qual reúne várias espécies de Amaryllidaceae de todo o Brasil, o gênero *Hippeastrum* apresentou os maiores teores de sanguinina, pseudolicorina, narciclasina e o gênero *Griffinia* os maiores teores de galantamina, sendo inédito a presença desse alcaloide para esse gênero de Amaryllidaceae. Esse monitoramento quantitativo de alcaloides em gêneros e espécies de Amaryllidaceae contribui com dados inéditos para literatura e proporciona informações importantes na produção de cultivares ricos em alcaloides com importância farmacológica e biológica. Os gêneros *Habranthus*, *Hippeastrum* e *Griffinia*, além de demonstrarem ser uma fonte promissora de alcaloides, apresentaram boa inibição frente a AchE. As amostras *Hippeastrum puniceum*, *H. elegans*, *H. goianum* e *Hymenocallis litorallis* demonstram ser mais eficiente na inibição da AChE, frente a ensaios *in vitro* do que as relatadas na literatura para o mesmo gênero. Assim, este trabalho contribuiu com dados quantitativos inéditos, sobre inibição da AChE em ensaios *in vitro* e *ex vivo*, onde destacou-se a *Griffinia gardneriana* com $79 \pm 0,62$ % de inibição frente a AChE.

O cultivo de *H. elegans* revelou uma espécie rica em alcaloides bioativos, cujas concentrações variam de maneira diferente ao longo do tempo: pseudolicorina (1.143,4-1.659,1 $\mu\text{g/g}$ de bulbo seco); narciclasina (768,1-2.749,3 $\mu\text{g/g}$ de bulbo seco); sanguinina (82,8-194,8 $\mu\text{g/g}$ de bulbo seco); galantamina (16,7-59,7 $\mu\text{g/g}$). Os maiores teores de sanguinina e pseudolicorina foram obtidos em 270 dias de cultivo, enquanto a galantamina atingiu seu valor máximo em 330 dias. Para esses três alcaloides, a quantidade total foi crescendo ao longo da plantação. Por outro lado, a narciclasina manteve-se estável até 390 dias, quando houve uma queda intensa em sua concentração e quantidade. Nos ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase, o extrato 450 dias apresentou uma maior inibição da AchE (% AChE = 69,5 e 64,4 %; IC_{50} = 24,9 e 18,3 $\mu\text{g/mL}$). Esse período foi marcado por um maior acúmulo dos

alcaloides galantamina e sanguinina em termos de massa total de bulbo. Esses resultados inéditos para *H. elegans* fornecem informações importantes na produção de alcaloides para exploração econômica.

A análise quimométrica por regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) aplicada aos dados de UPLC-QTOF e RMN de ^1H e aos resultados dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* permitiu correlacionar a variabilidade química dos extratos alcaloides de bulbos de *H. elegans* com sua atividade anticolinesterase. A PLS indicou a pseudolicorina como composto discriminante para este extrato, logo responsável por sua maior atividade anticolinesterase juntamente com os conhecidos inibidores de acetilcolinesterase como galantamina e sanguinina.

Portanto, nosso estudo indica que espécies de *Griffinia* e *H. elegans* são fontes promissoras de alcaloides bioativos. No entanto, são necessários estudos agrônômicos de melhoramento genético e de desenvolvimento de sistema de produção para torná-las materiais comercialmente competitivos com suas congêneres cultivadas em países de clima temperado.

REFERÊNCIAS

- ABOU-DONIA, A. H. *et al.* Phytochemical and biological investigation of *Hymenocallis littoralis* Salisb. **Chemistry & Biodiversity**, [s.l], v. 5, n. 2, p. 332-340, 2008a.
- ABOU-DONIA, A. H.; SOAD, M. T.; HALA, M. H.; EMAN, S. New rapid validated HPTLC method for the determination of galanthamine in Amaryllidaceae plant extracts. **Phytochemical Analysis**, [s.l], v. 19, n. 4, p. 353–358, 2008b.
- ABU-REIDAH, I. M. *et al.* HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, [s.l], v. 166, p. 179–191, 2015.
- AGHAEI, Y.; MIRJALILI, M.; NAZERI, V. Chemical diversity among the essential oils of wild populations of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) from Iran. **Chemistry and Biodiversity**, [s.l], v. 10, p. 262–273, 2013.
- AGO, Y.; KODA, K.; TAKUMA, K., MATSUDA, T. Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s.l], v. 116, p. 6 – 17, 2011.
- ALVES-ARAÚJO, A.; DUTILH, J. H. A.; ALVES, M. Amaryllidaceae ss e *Alliaceae* ss no Nordeste Brasileiro. **Rodriguésia**, [s.l], p. 311-331, 2009.
- ALI, M. A.; EL-ABHAR, H. S.; KAMEL, M. A.; ATTIA, A. S. Antidiabetic effect of galantamine: novel effect for a known centrally acting drug. **Public Library of Science One**, [s.l], v. 10, n. 8, 2015.
- ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, D. M. **Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr, 2017. 352 p.
- ANVISA. Guia para tratamento estatístico de validação. **Guia N° 10/2017 - Versão 1**, p. 19, 2018.
- AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. B. *Habranthus* (Amaryllidaceae) do Brasil. **Rodriguésia**, [s.l], v. 66, n. 1, p. 203–220, 2015.
- AHMAD, S. Recent advances in Pharmacology and Toxicology of Phytopharmaceuticals. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, [s.l], v. 7, n. 4, p. 222–224, 2018.
- AIELLO, *et al.* **Modern Alkaloids**. Napoli: Wiley-VCH, 2007. 689 p.
- ALLIED ACADEMIES. **5th world Congress on Natural Products Chemistry and Research**. International Conference on Natural Products, Medicinal Plants & Marine Drugs. Anais. Dubai: Allied Academies, 2018.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **2018 Alzheimer's disease facts and figures Alzheimer's & Dementia**. Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526018300414>. Acesso em: 5 jul. 2019.

ARRUDA, C. G. J. *et al.* Metabolic Profile and Cytotoxicity of Non-Polar Extracts of Pineapple Leaves and Chemometric Analysis of Different Pineapple Cultivars. **Industrial Crops and Products**, [s.l], 124, 466-474, 2018.

ATTA-UR-RAHMAN. Alkaloids as potential multi-target drugs to treat Alzheimer's disease. **In Studies in Natural Products Chemistry**, [s.l], v. 61, p. 521, 2019.

BALLABIO, D. A MATLAB toolbox for Principal Component Analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s.l], v. 149, p. 1–9, 2015.

BARTOLUCCI, C. *et al.* Three-dimensional Structure of a Complex of Galanthamine (Nivalint) with Acetylcholinesterase From *Torpedo californica*: Implications for the Design of New Anti-Alzheimer Drugs. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, [s.l], v. 42, p. 181–191, 2001.

BASTIDA, J. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, [s.l], v. 71, p. 2521–2529, 2002.

BERKOV, S. Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l], v. 23, n. 2, p. 1170–1176, 2009.

BERMUDEZ-AGUIRRE, D. **Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation**. Cambridge, USA: Academic Press, Elsevier, 2017. 556 p.

BESSA, C. D. *et al.* Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l], v. 28, n. 5, p. 819–830, 2017.

BORRA, S. *et al.* Isolation, Synthesis, and Semisynthesis of Amaryllidaceae Constituents from *Narcissus* and *Galanthus sp.*: De Novo Total Synthesis of 2-epi-Narciclasine. **Journal of Natural Products**, [s.l], v. 81, n. 6, p. 1451–1459, 2018.

BOZKURT, S. B. *et al.* Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. **Phytochemistry Letters**, [s.l], v. 5, n. 2, p. 367–370, 2012.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie Phytochimie Plantes Médicinale**. 5 ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1999. 1504 p.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica – Plantas Medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia S.A, 2001. 1120 p.

CARVALHO, K. R. **Prospecção química e farmacológica de *hippeastrum solandriflorum* (Lindl.)**. 2014. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

CARVALHO, K. R. *et al.* Cytotoxic alkaloids from *Hippeastrum solandriflorum* lindl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l], v. 26, n. 10, p. 1976–1980, 2015.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais. **Revista**

Virtual de Química, [s.l], v. 9, n. 2, p. 575–595, 2017.

CAVALLARO, V. *et al.* Alkaloids from *Habranthus tubispathus* and *H. jamesonii*, two amaryllidaceae with acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition activity. **Natural Product Communications**, [s.l], v. 9, n. 2, p. 159–162, 2014.

CHAGAS-PAULA, D. A. *et al.* Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. **Planta Medica**, [s.l], v. 81(06), p. 450–458, 2015.

CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D. M.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, [s.l], v. 852, n. 1-2, p. 22-34, 2007.

CHAVES, K.; SOANE; FEITOSA, C. M.; ARAÚJO, L. S. Alkaloids Pharmacological Activities - Prospects for the Development of Phytopharmaceuticals for Neurodegenerative Diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s.l], v. 17, n. 7, p. 629-635, 2017.

CHERKASOV, O. A.; TOLKACHEV, O. N. **Narcissus and other Amaryllidaceae as sources of galanthamine**. In: *Narcissus and Daffodil*. United Kingdom: Taylor & Francis Online, 2002. p. 242-255.

CHOI, S. *et al.* Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chemistry**, [s.l], v. 173, p. 1236-1242, 2015.

CONFORTI, F. *et al.* Quantitative determination of Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus reginae-olgae* subsp. vernalis and *in vitro* activities relevant for neurodegenerative diseases. **Pharmaceutical Biology**, [s.l], v. 48(1), p. 2–9, 2010.

CORTES, N. *et al.* Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l], v. 102, p. 222–228, 2015a.

CORTES, N. *et al.* Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. **Life Sciences**, [s.l], v. 122, p. 42–50, 2015b.

CORTES, N. *et al.* Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. **Life Sciences**, [s.l], v. 203, p. 54–65, 2018a.

CORTES, N. *et al.* Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs): An Integrated Bioguided Study. **Phytochemical Analysis**, [s.l], v. 29, n. 2, p. 217–227, 2018b.

COSTA, R. D. F. D. *et al.* Aquisição de medicamentos para a Doença de Alzheimer no Brasil: uma análise no sistema federal de compras, 2008 a 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l], v. 20, n. 12, p. 3827–3838, 2015.

DA SILVA, C. P.; EMÍDIO, E. S.; DE MARCHI, M. R. R. Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples. **Talanta**, [s.l], v.

131, p. 221–227, 2015.

DA SILVA, L. F. *et al.* Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. **Food Chemistry**, [s.l], v. 227, p. 158-165, 2017.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, [s.l], v. 68, n. 13, 1545-1555, 2001.

DENG, B. *et al.* Determination of pseudolycorine in the bulb of *lycoris radiata* by capillary electrophoresis combined with online electrochemiluminescence using ultrasonic-assisted extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s.l], v. 879, n. 13–14, p. 927–932, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. 2. ed. New York: Chichester, 2002. 507 p.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [s.l], v. 7, p. 7–88, 1961.

EMIR, A.; ÖNÜR, M. A. Simultaneous Quantification of Galanthamine and Lycorine in *Galanthus fosteri* by HPLC-DAD. **Marmara Pharmaceutical Journal**, [s.l], v. 20(3), p. 320–324, 2016.

FANG, C.; LUO, J. Metabolic GWAS-based dissection of genetic bases underlying the diversity of plant metabolism. **Plant Journal**, [s.l], v. 97, n. 1, p. 91–100, 2019.

FRASER, M. D. **Yellow Gold: Innovative systems for sustainable daffodil-derived galanthamine production in the uplands**. Disponível em:
<http://gtr.ukri.org/projects?ref=BB%2FM027120%2F1>. Acesso em: 18 abr. 2018.

GHOSAL, S. *et al.* Palmilycorine and lycorisode: acyloxy and acylglucosyloxy alkaloids from *Crinum asiaticum*. **Phytochemistry**, [s.l], v. 24, n. 11, p. 2703-2706, 1985.

GIORDANI, R. B. *et al.* Investigation of the antioxidant and anticholinesterase potential of *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Quimica Nova**, [s.l], v. 31, n. 8, p. 2042–2046, 2008.

GIORDANI, R. B. *et al.* Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, [s.l], v. 49, n. 10, p. 668–672, 2011.

GONZÁLEZ, A. GUSTAVO; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s.l], v. 26, p. 227–238, 2007.

GOTTI, R. *et al.* Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC–MS and capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l], v. 42(1), p. 17–24, 2006.

GOUDARZI, N.; FARSIMADAN, S.; CHAMJANGALI, M. A. Modified dispersive solid-liquid microextraction coupled to HPLC and application of experimental design methodology

to determine the trace amount of levothyroxine in human real samples. **Microchemical Journal**, [s.l], v. 133, p. 417–422, 2017.

GUO, B.; XU, L.; WEI, Y.; LIU, C. Research advances of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. **China Journal of Chinese Materia Medica**, [s.l], v. 34, p. 2018– 2023, 2009.

GUO, Y. Research on the Alkaloids of Amaryllidaceae Plants : *Genera Lycoris* and *Hippeastrum*. **Universitat de Barcelona**, [s.l], v. 9, n. 8, p. 1081–1086, 2015.

GUO, Y. *et al.* New Alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) v an S cheepen. **Helvetica Chimica Acta**, [s.l], v. 99, n. 2, p. 143–147, 2016.

HADIAN, J. *et al.* Phytochemical and morphological characterization of *Satureja khuzistanica* Jamzad populations from Iran. **Chemistry and Biodiversity**, [s.l], v. 8, p. 902–915, 2011.

HANKS, G. R. ***Narcissus and Daffodil: The Genus Narcissus***. 1. ed. London and New York: CRC Press, 2002. 450 p.

HARBORNE, J. *et al.* **Introduction to Ecological Biochemistry**. Texas: Academic Press, 1993. 318 p.

HARVEY, A. L.; EDRDA-EBEL, R. Q. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l], v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HOFMANN, J. R. *et al.* Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l], v. 14, n. 1, p. 7–14, 2004.

HEINRICH, M.; TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l], v. 92, n. 2-3, p. 147-162, 2004.

HUANG, L.; SU, T.; LI, X. Natural products as sources of new lead compounds for the treatment of Alzheimer’s Disease Current Topics in Medicinal Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l], v. 13, n. 15, p. 1864-1878, 2013.

HULCOVÁ, D. *et al.* Phytochemistry Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L . cv . Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer ’s disease. **Phytochemistry**, [s.l], v. 165, p. 112055, 2019.

ICH. **ICH Harmonised Tripartite Guideline Text on Validation of Analytical Procedures**. Use Baseline: Staw. Agric. L, 2015. Disponivel em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acesso em: 26 set. 2018.

JAMES MILLER, J. C. M. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Londres: Pearson Higher Education, 2018. 498 p.

JAVIER, E. O. D. **Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora Colombiana: alcaloides de *Phaedranassa Dubla* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia Madruno* (Clusiaceae).** 2008. 217 f. Tese (doutorado) – Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, 2008.

JIN, Z.; ARAI, H. et al. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, [s.l], v. 30, n. 6, p. 849, 2013.

JIN, Z.; YAO, G. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, [s.l], v. 36, n. 10, p. 1462–1488, 2019.

KATHY, J. W.; STEVE, B. State of the World's Plants 2017. **Royal Botanic Gardens, Kew**, [s.l], p. 84, 2017.

KATOCH, D. *et al.* Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l], v. 72, p. 187–192, 2012.

KATOCH, D.; SHARMA, U. Analysis Simultaneous quantification and identification of Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus tazetta* by ultra performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l], v. 175, p. 112750, 2019.

KHADIVI-KHUB, A.; AGHAEI, Y.; MIRJALILI, M. H. Phenotypic and phytochemical diversity among different populations of *Stachys lavandulifolia*. **Biochemical Systematic and Ecology**, [s.l], v. 54, p. 272–278, 2014.

KHALIL, K. A.; ABASS, K. S. The measurements of the cholinesterase activity of brain and plasma in rabbits by using modified Michel and Ellman assays. **Insights in Enzyme Research**, [s.l], v. 1, p. 2, 2017.

KHONAKDARI, M. R. *et al.* Quantification of galantamine in *Narcissus tazetta* and *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) populations growing wild in Iran. **Plant Genetic Resources**, [s.l], p. 1–5, 2017.

KILGORE, M. B. *et al.* CYP96T1 of *Narcissus sp. aff. pseudonarcissus* Catalyzes Formation of the Para-Para' C-C Phenol Couple in the Amaryllidaceae Alkaloids. **Frontiers in Plant Science**, [s.l], v. 7, p. 225, 2016.

KIM, D. K. Inhibitory effect of corynoline isolated from the aerial parts of *Corydalis incisa* on the acetylcholinesterase. **Archives of Pharmacal Research**, [s.l], v. 25, p. 817–819, 2002.

KNAPSACK. KNAPSAcK: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. [Http://Kanaya.Naist.Jp/Knapsack_jsp/Top.Html](http://Kanaya.Naist.Jp/Knapsack_jsp/Top.Html). Acesso em: 22 out. 2018.

KONRATH, E. L. *et al.* Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l], v. 65, n. 12, p. 1701-1725, 2013.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Chemistry, biology, and medicinal potential of

narciclasine and its congeners. **Chemical Reviews**, [s.l], v. 6, p. 1982–2014, 2008.

LI, A. *et al.* Discovery and characterisation of lycorine - type alkaloids in *Lycoris spp.* (Amaryllidaceae) using UHPLC - QTOS - MS. **Phytochemical Analysis**, [s.l], v. 30, n. 3, p. 268-277, 2019.

LIGIERO, C. B. P. *et al.* Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, [s.l], v. 32, p. 1338–1341, 2009.

LOPEZ, M. H. M. **Potencial de inibição de enzimas de interesse farmacêutico por espécies de amaryllidaceae**. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de ciências da saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

LÓPEZ, S. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. **Life Sciences**, [s.l], v. 71, n. 21, p. 2521-2529, 2002.

LUBBE, A. *et al.* Phytochemistry Seasonal accumulation of major alkaloids in organs of pharmaceutical crop *Narcissus Carlton*. **Phytochemistry**, [s.l], v. 88, p. 43–53, 2013.

MAELICKE, A. *et al.* Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, [s.l], v. 49(3), 279-288, 2001.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, [s.l], v. 68, p. 2015–2022, 2007.

MEEROW, A. W.; PREUSS, K. D.; TOMBOLATO, A. F. C. *Griffinia* (Amaryllidaceae), a Critically Endangered Brazilian Geophyte with Horticultural Potential. **In: VIII International Symposium on Flowerbulbs 570**, [s.l], p. 57–64, 2000.

MROCZEK, T. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry an. **Journal of Chromatography A**, [s.l], v. 1216, n. 12, p. 2519–2528, 2009.

MROCZEK, T. Qualitative and Quantitative Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography/High Performance Liquid Chromatography/Diode-Array/Electrospray-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry of Cholinesterase Inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l], v. 129, p. 155-162, 2016.

MURRAY, A. *et al.* Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. **Current Neuropharmacology**, [s.l], v. 11, n. 4, p. 388–413, 2013.

NAIR, J. J. *et al.* Alkaloids from *Crinum macowanii*. **Phytochemistry**, [s.l], v. 54, n. 8, p. 945-950, 2000.

NEHME, C. J. *et al.* Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and**

Ecology, [s.l], v. 36(8), p. 602–611, 2008.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4 ed. Campinas: Bookman Editora, 2010. 4414 p.

NIELSEN, N. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of Chromatography A**, [s.l], v. 805, p. 17–35, 1998.

NIGEL J. K. S. Introduction to solid-phase extraction. In: **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications**, [s.l], Taylor & Francis, p. 528, 2000.

ORTIZ, J. E. *et al.* Wild argentinian amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. **Molecules**, [s.l], v. 17, n. 11, p. 13473–13482, 2012.

OSORIO, E. J. *et al.* *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry Letters**, [s.l], v. 3, n. 3, p. 161–163, 2010.

ÖTLES, S.; KARTAL, C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, [s.l], v. 15, n. 1, p. 5–15, 2016.

PAGNING, A. L. N. *et al.* Antimicrobial, antioxidant and butyrylcholinesterase inhibition activities of extracts and isolated compounds from *Scadoxus pseudocaulus* and semi-synthetic farrerol derivatives. **South African Journal of Botany**, [s.l], v. 102, p. 166–174, 2016.

PAGLIOSA, L. B. *et al.* Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, [s.l], v. 17, p. 698–701, 2010.

DE ANDRADE, J. P. *et al.* The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, [s.l], v. 15, n. 1, p. 147–160, 2016.

PELLETIER, S. W. Alkaloids chemical and biological perspectives. **Wiley**, [s.l], 1988.

PEREIRA, R. DE C. A. *et al.* Efeito da Época de Colheita na Produção de Fitomassa e no Teor de Alcaloides Totais em Bulbos de Açucena (*Hippeastrum elegans* (Spreng.) H. E. Moore) no semiárido nordestino. **Embrapa**, [s.l], 2018.

PIMENTEL, M. F.; BARROS, N. B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. **Química Nova**, [s.l], v. 19, p. 305–325, 1995.

PRINCE, M. *et al.* World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. **Alzheimer's Disease International (ADI)**, [s.l], p. 1–140, 2016.

PUBCHEM, (2018). Pubchem open chemistry database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. **Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes**. In **Natural Products: Phytochemistry**,

Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Amaryllidaceae Alkaloids. Berlin: Springer, 2013. p. 479-522.

REINWALDT, C. *et al.* Quantitation of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey and Herbal Teas by UHPLC/MS/MS. Application Note, Agilent Technologies. Disponível em: www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7301EN. Acesso em: 4 fev. 2017.

ROBERTS, M. F.; WINK, M. Alkaloids – Biochemistry, Ecological Functions and Medical Applications. **Plenum Press**, [s.l], 1998.

ŠAFRATOVÁ, M. *et al.* Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. **Archives of Pharmacal Research**, [s.l], v. 41, n. 2, p. 208–218, 2018.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, [s.l], v. 6, p. 29265, 2016.

SCHILLER, F.; JENA, D.; CURRIET, L. International union of pure commission on general aspects of analytical chemistry guidelines for calibration in analytical chemistry Guideline for calibration in analytical chemistry. **Pure & Applied Chemistry**, [s.l], v. 70, n. 4, p. 993–1014, 1998.

SCHWEDERSKY, M. B. *et al.* Genetic Diversity and Chemical Profile of *Rhodophiala bifida* Populations from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l], v. 30, p. 427-431, 2020.

SEBBEN, C. **Investigação química e biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amarillydaceae)**. 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SILVA, M. DO S. S. **Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase**. 2009. 234 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 502 p.

SIMONI, E. *et al.* Combining galantamine and memantine in multitargeted, new chemical entities potentially useful in Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l], v. 55, p. 9708–9721, 2012.

SINGH, A.; DESGAGNÉ-PENIX, I. Transcriptome and metabolome profiling of *Narcissus pseudonarcissus* 'King Alfred' reveal components of Amaryllidaceae alkaloid metabolism. **Scientific Reports**, [s.l], v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

SINGH, S. Process analytical technique. **Tara Pal, World Journal of Pharmaceutical Research**, [s.l], v. 20, n. 10, p. 60, 2015.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9^a ed. Belmont: Copyright,

2014. 1072 p.

SVINYAROV, I.; KEREMEDCHIEVA, R.; BOGDANOV, M. G. Ionic liquid-supported solid-liquid extraction of bioactive alkaloids. IV. New HPLC method for quantitative determination of galantamine in *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae). **Separation Science and Technology**, [s.l], v. 51, n. 15-16, p. 2691-2699, 2016.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. Naturally Occurring Toxicants in Foods. In: **Foodborne Diseases (Third edition)**. 3. ed. Academic Press, 2017. p. 327–344,.

TAKLA, S. S. *et al.* Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. **Journal of Chromatography A**, [s.l], v. 1567, p. 99-110, 2018.

THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085–113, 2015.

TOMBOLATO, A. F. C. **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2004.

TORRAS-CLAVERIA, L. *et al.* Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Industrial Crops & Products**, [s.l], v. 43, p. 237–244, 2013.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.; BAIRREIRO, F. C. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, [s.l], v. 5, p. 915–926, 2005.

WANG, J. *et al.* Development and validation of a UPLC–MS method for the determination of galantamine in guinea pig plasma and its application to a pre-clinical bioavailability study of novel galantamine formulations. **Biomedical Chromatography**, [s.l], v. 32, n. 9, p. 4275, 2018.

WINK, M. Allelochemical properties and the raison d'être of alkaloids. In Cordell G. (ed.): **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Academic Press, [s.l], v. 43, p. 1–118, 1993.

WINK, M. **The Alkaloids**. Academic Press, [s.l], p. 129, 2000.

WONG, C. W.; **Pharmacotherapy for Dementia: A Practical Approach to the Use of Cholinesterase Inhibitors and Memantine**. **Drugs Aging**, [s.l], p. 451, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, [s.l], v. 23, n. 18, p. 2903-2916, 2009.

ZHANG, Y.; CHEN, Z. Nonaqueous CE ESI-IT-MS analysis of Amaryllidaceae alkaloids. **Journal of Separation Science**, [s.l], v. 36, n. 6, p. 1078–1084, 2013.

**APÊNDICE A – DADOS DE ANOVA PARA SELEÇÃO DO
MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

A – TABELA COM DADOS DE ANOVA*

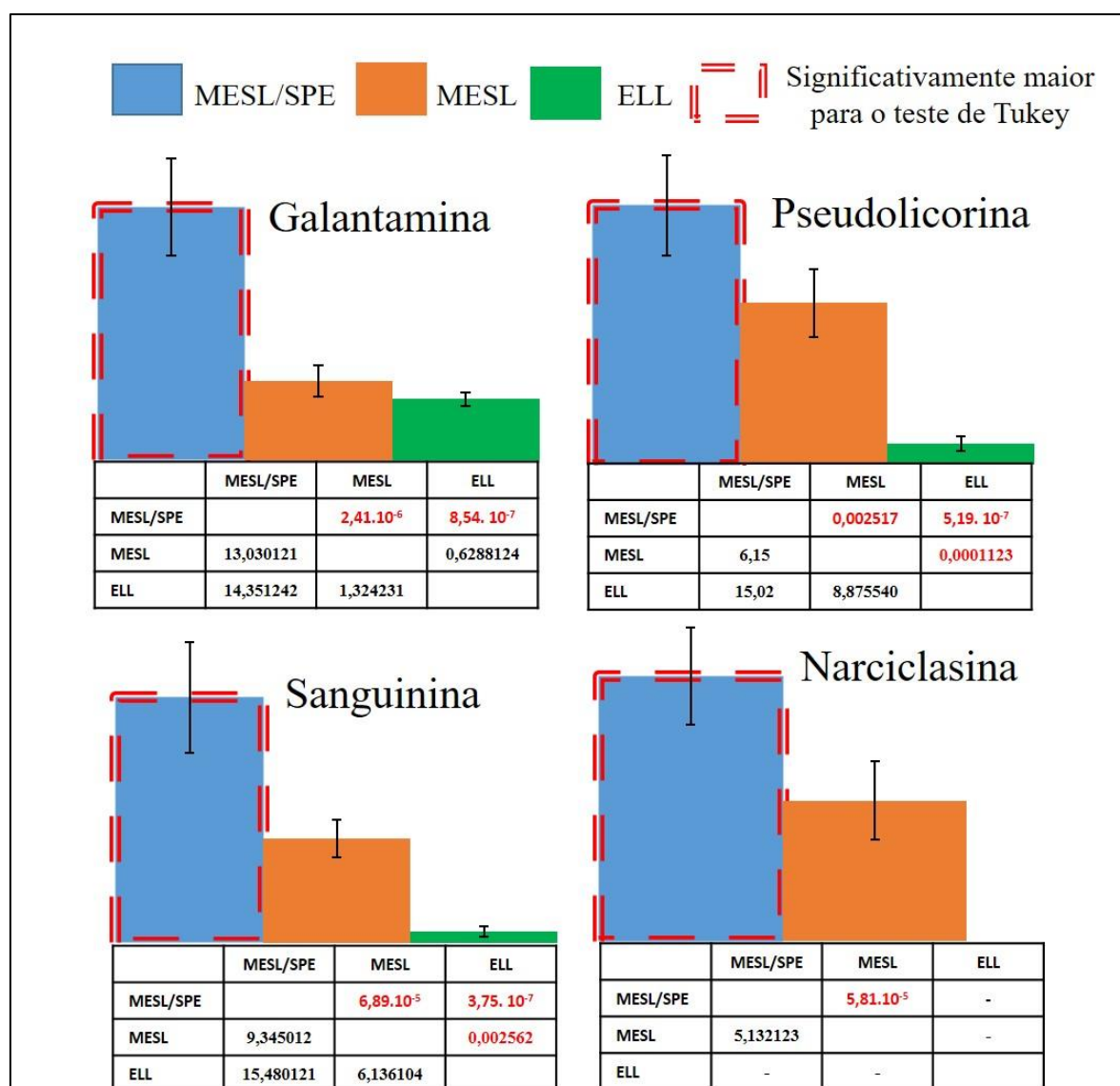
Composto	F_{cal}' (F_{crit}' = 2,8)	valor-P	Método
Galantamina	62,90	$4,36 \cdot 10^{-7}$	MESL ELL MESL/SPE
Pseudolicorina	57,05	$7,42 \cdot 10^{-7}$	MESL ELL MESL/SPE
Sanguinina	60,7753	$5,26 \cdot 10^{-7}$	MESL ELL MESL/SPE
Narciclasina	58,43	$6,34 \cdot 10^{-7}$	MESL - MESL/SPE

*Grau de $n - 1 = 14$ graus de liberdade para 5% de significância em comparação aos métodos de extração, microextração sólido-líquido (MESL), extração por partição líquido-líquido (ELL) e microextração seguido de extração em fase sólida (MESL/SPE).

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

**APÊNDICE B – DIAGRAMAS E TABELAS DOS TESTES DE TUKEY’S
PARA SELEÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

B – GRÁFICO DE BARRAS E TABELAS DOS TESTES DE TUKEY’S PARA OS MÉTODOS DE MICROEXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (MESL), MICROEXTRAÇÃO SEGUIDO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MESL/SPE) E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL) PARA OS ALCALOIDES GALANTAMINA, SANGUININA, PSEUDOLICORINA E NARCICLASINA. OS VALORES EM VERMELHO NAS TABELAS REPRESENTAM AS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS EM UMA MESMA LINHA



APÊNDICE C – DADOS DE ANOVA DAS CURVAS DOS ALCALOIDES

C – TABELA COM ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS ALCALOIDES GALANTAMINA, PSEUDOLICORINA, SANGUININA E NARCICLASINA NOS SEIS PERÍODOS DE COLETA EM UM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%

Composto	Fonte da variação	SQ*	gl*	MQ*	$F_{(calculado)}$	Valor-p	$F_{(crítico)}$
Galantamina	Entre grupos	5,24.10 ⁹	5	1,05.10 ⁹	6,927237	0,000394	2,620654
	Dentro dos grupos	3,63.10 ⁹	24	1,51.10 ⁸			
	Total	8,87.10 ⁹	29				
Pseudolicorina	Entre grupos	2,22.10 ¹⁰	5	4,43.10 ⁹	2,671073	0,046784	2,620654
	Dentro dos grupos	3,98.10 ¹⁰	24	1,66.10 ⁹			
	Total	6,2.10 ¹⁰	29				
Sanguinina	Entre grupos	4,92.10 ⁸	5	98456596	1,342561	0,280563	2,620654
	Dentro dos grupos	1,76.10 ⁹	24	73334891			
	Total	2,25.10 ⁹	29				
Narciclasina	Entre grupos	36610628	5	7322126	3,683818	0,012919	2,620654
	Dentro dos grupos	47703502	24	1987646			
	Total	84314131	29				

SQ: soma dos quadrados; MQ: quadrado médio; gl: graus de liberdade.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDICE D – DADOS DE ANOVADOS TESTES ANTI-
ACETILCOLINESTERASE *IN VITRO***

**D – TABELA COM DADOS DE ANOVA PARA IC₅₀ DOS TESTES ANTI-
ACETILCOLINESTERASE *IN VITRO* DOS TRATAMENTOS DE T1 A T6 PARA 5%
DE SIGNIFICÂNCIA**

Dados IC₅₀						
Amostra	Contagem	Soma	Média	Desvio padrão	R²	Variância
Fisostigmina	3	3,45	1,15	0,05	0,996	0,0021
Galantamina	3	18,12	1,07	0,29	0,992	0,0143
T1	3	101,31	33,77	0,94	0,978	0,8836
T2	3	100,41	33,47	0,93	0,959	0,8649
T3	3	100,74	33,58	0,59	0,962	0,3481
T4	3	100,83	33,61	0,25	0,979	0,0625
T5	3	101,13	33,71	0,92	0,980	0,8464
T6	3	73,17	24,39	0,13	0,984	0,0169

ANOVA						
Fonte da variação	SQ*	gl*	MQ*	F_(calculado)	Valor-P	F_(crítico)
Entre grupos	213,51	5	42,70	84,77	6,16.10 ⁻⁹	3,11
Dentro dos grupos	6,04	12	0,50			
Total	219,56	17				

* SQ: soma dos quadrados; MQ: quadrado médio; gl: graus de liberdade.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDICE E – DADOS DE ANOVA DOS ENSAIOS *EX VIVO* DE
AMARYLLIDACEAE**

**E – TABELA COM DADOS DE ANOVA PARA AVERIGUAR SE HÁ DISTINÇÃO
DAS CONCENTRAÇÕES (2,0; 1,0; 0,5. 0,25; 0,12; 0,061 E 0,031 MG.ML-1) NOS
ENSAIOS *EX VIVO* DOS ESTRATOS DE AMARYLLIDACEAE**

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F_{calculado}</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,177975	6	0,029663	9,173861	1,39E-08	2,157914
Dentro dos grupos	0,49794	154	0,003233	-	-	-
Total	0,675916	160	-	-	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: quadrado médio; gl: graus de liberdade.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDICE F – TESTE DE TUKEY’S PARA SELEÇÃO DA CONCENTRÇÃO
DAS ANALISES ANTI-ACETILCOLINESTERASE**

**F – TABELA DE TESTE DE TUKEY’S DAS 7 CONCENTRAÇÕES COM N = 24 DA
UNIÃO DE TODOS OS PERÍODOS**

Concentrações (mg.ml⁻¹)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,061	0,031
2		0,9628	0,9943	0,3178	0,3367	0,001348	1,64E-07
1	1,349		0,9999	0,887	0,8998	0,03323	1,58E-05
0,5	0,9387	0,4107		0,7406	0,7605	0,0137	4,14E-06
0,25	3,069	1,72	2,131		1	0,4728	0,002334
0,125	3,022	1,672	2,083	0,04767		0,4509	0,002062
0,061	5,779	4,43	4,84	2,71	2,758		0,4048
0,031	8,639	7,29	7,701	5,57	5,618	2,86	

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDICE G – DADOS DE ANOVA DOS TESTES ANTI-
ACETILCOLINESTERASE *EX VIVO* DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* EM
DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA**

**G – TABELA COM DADOS DE ANOVA (0,05 DE SIGNIFICÂNCIA) PARA OS
TESTES ANTI-ACETILCOLINESTERASE *EX VIVO* DOS EXTRATOS DE *H.*
ELEGANS COLHIDOS EM SEIS ÉPOCAS**

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F calculado</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.006352	5	0.001270	2.8057	0.03922	2.6206
Dentro dos grupos	0.010866	24	0.000453	-	-	-
Total	0.017218	29	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDIC H – PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PLS
DOS DADOS DE UPLC-ESI-QTOF-MS**

**H – TABELA COM OS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PLS
OBTIDOS PARA A CORRELAÇÃO DOS DADOS DE UPLC-ESI-QTOF-MS E OS
RESULTADOS ENCONTRADOS NOS ENSAIOS ACHE *IN VITRO***

<i>Modelo</i>	3 LV (%) ^a	r ² cal ^b	RMSEC ^c	r ² val ^d	RMSECV ^e
<i>in vitro</i>	97,18	0,972	0,586	0,934	0,897
<i>ex vivo</i>	56,59	0,566	5,256	0,178	7,863

^aA porcentagem total de variância capturada na matriz X refere-se a 3 LV; ^b Coeficiente de correlação entre as atividades anticolinesterásicas reais e previstas durante a calibração; ^c Erro quadrático médio de calibração da raiz; ^d Coeficiente de correlação entre a citotoxicidade real e prevista durante a validação; ^e Erro médio quadrático raiz da validação cruzada.

**APÊNDIC I – PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PLS
DOS DADOS DE RMN**

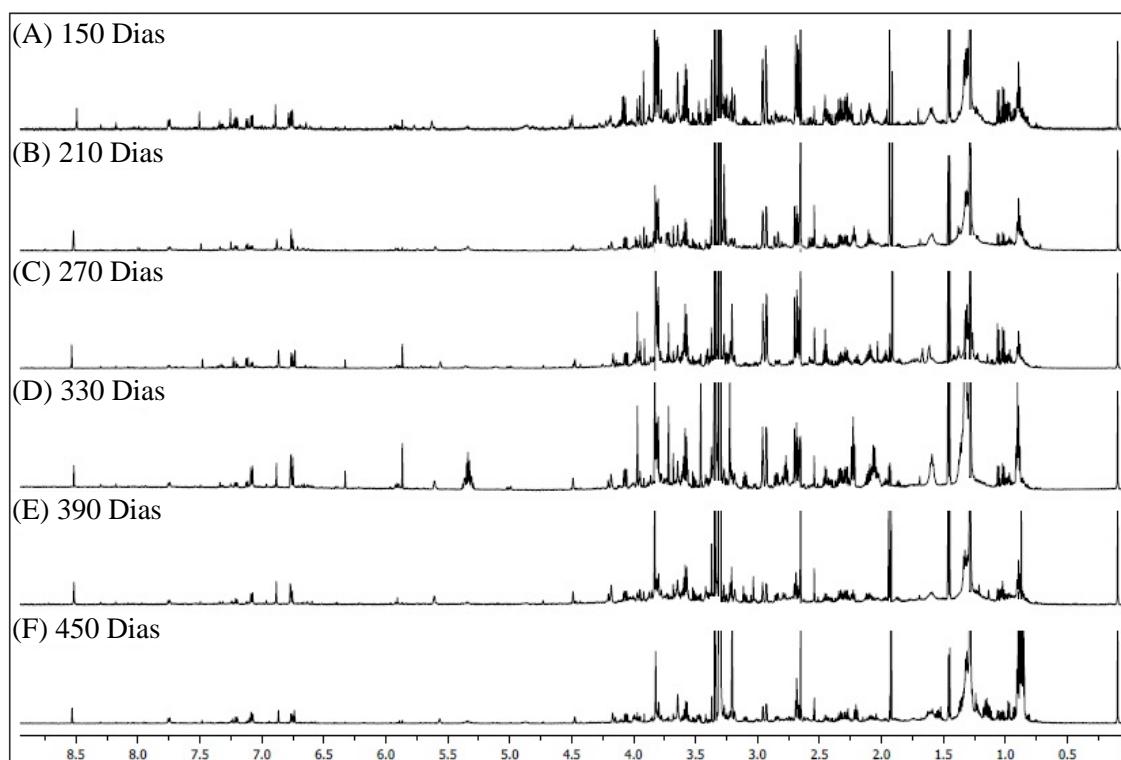
**I - TABELA COM OS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PLS
OBTIDOS PARA A CORRELAÇÃO DOS DADOS DE RMN E OS RESULTADOS
ENCONTRADOS NOS ENSAIOS ACHE *IN VITRO***

<i>Modelo</i>	8 LV (%) ^a	r ² cal ^b	RMSEC ^c	r ² val ^d	RMSECV ^e
<i>in vitro</i>	92,99	0,999	0,076	0,87	1,26
<i>ex vivo</i>	93,00	0,993	0,642	0,43	6,24

^aporcentagem total de variação capturada na matriz X refere-se a 8 LV; ^b Coeficiente de correlação entre as atividades anticolinesterásicas reais e previstas durante a calibração; ^c Erro quadrático médio de calibração da raiz; ^d Coeficiente de correlação entre a citotoxicidade real e prevista durante a validação; ^e Erro médio quadrático da raiz de validação cruzada.

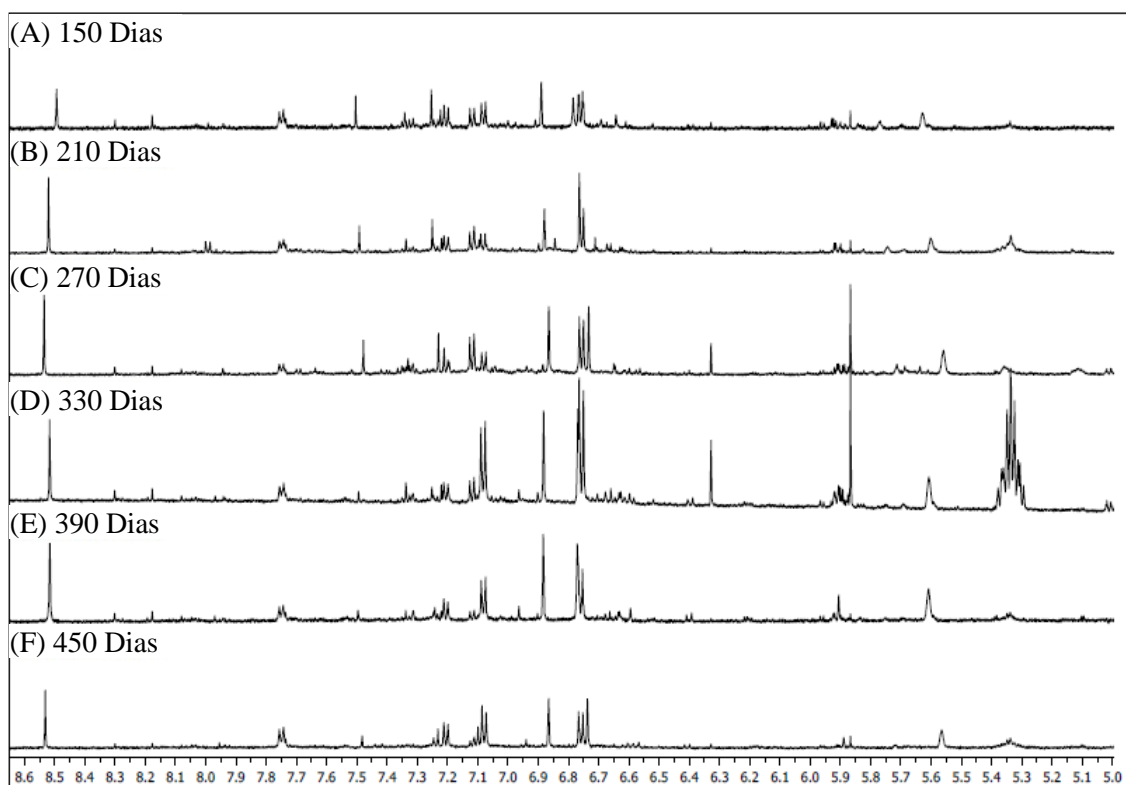
APÊNDICE J – DADOS DE RMN DE ^1H DOS EXTRATOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* EM DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA

J – ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHZ EM MEOD) DOS EXTRATOS EM BULBOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* (A-F) 150 A 450 DIAS



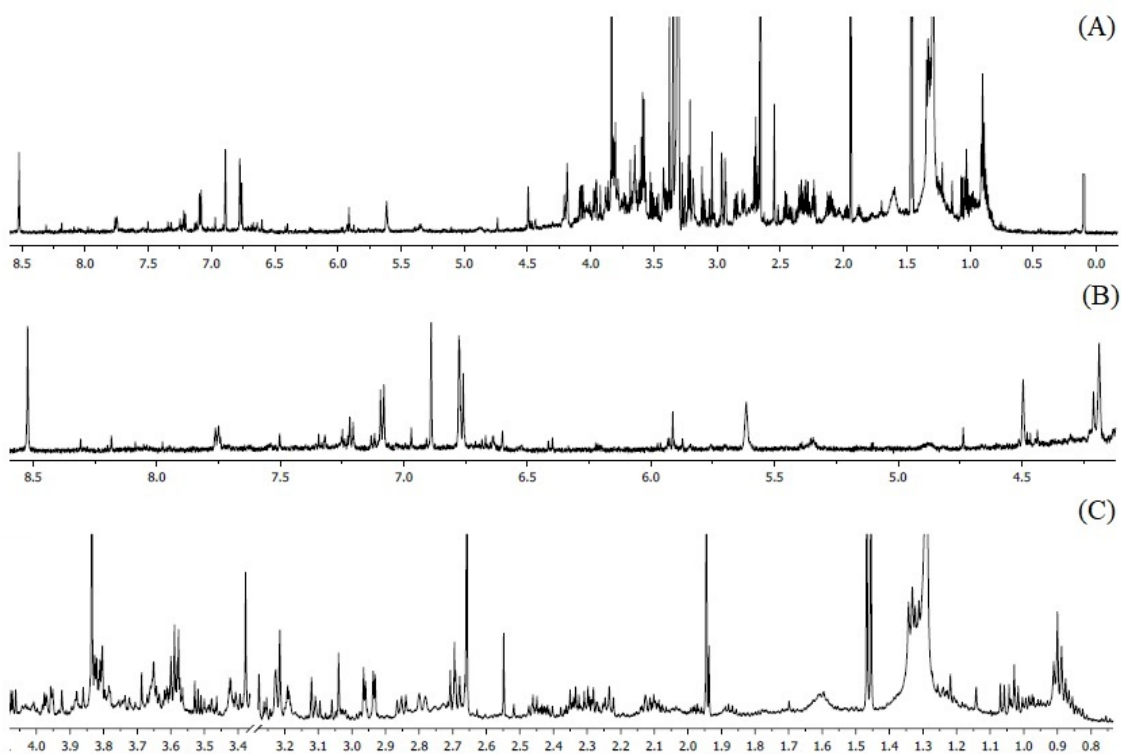
APÊNDICE L – DADOS DE RMN DE ^1H DOS EXTRATOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* EM DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA

L – ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHZ EM MEOD) DOS EXTRATOS EM BULBOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* (A-F) 150 A 450 DIAS, EXPANSÃO 8,6 - 5,0 PPM



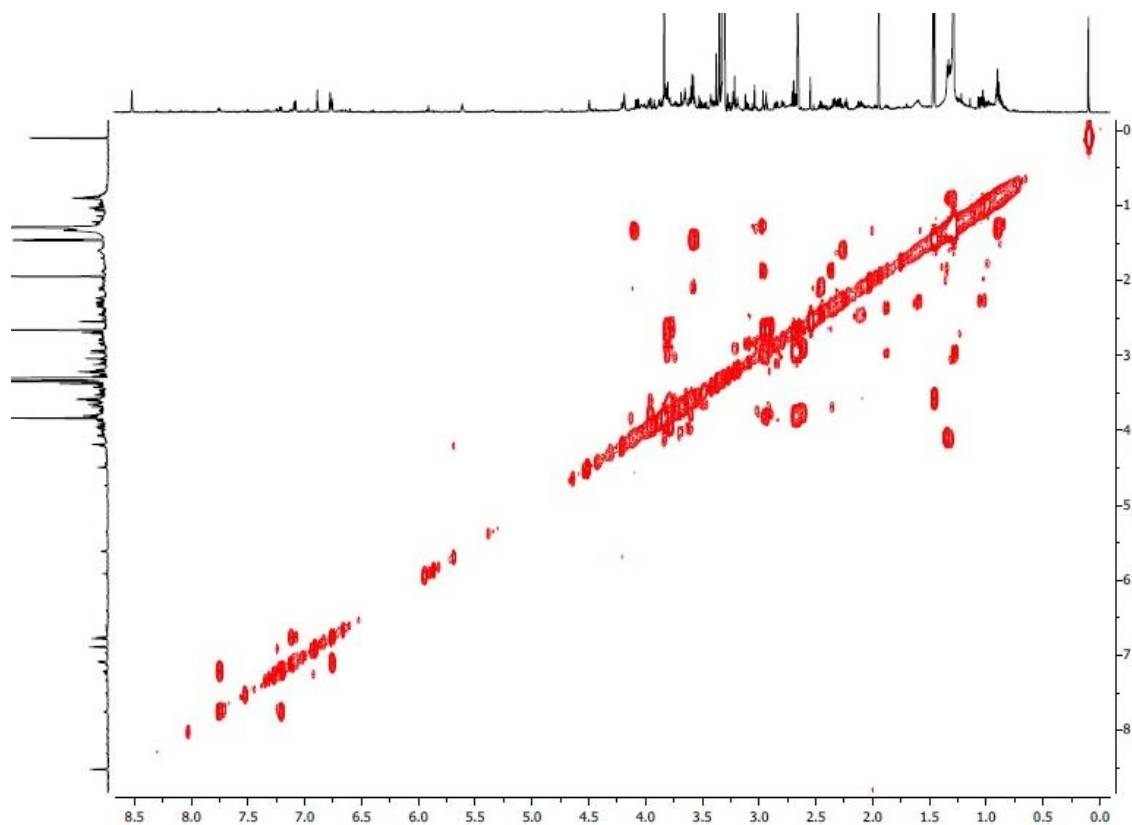
**APÊNDICE M – DADOS DE RMN DE ^1H DOS EXTRATOS DE
HIPPEASTRUM ELEGANS EM DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA**

**M – ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHZ EM MEOD) DOS EXTRATOS EM
BULBOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* (A) 450 DIAS, (B) EXPANSÃO 8,6 - 4,3 PPM
E (C) EXPANSÃO 4,5 - 0,8 PPM**



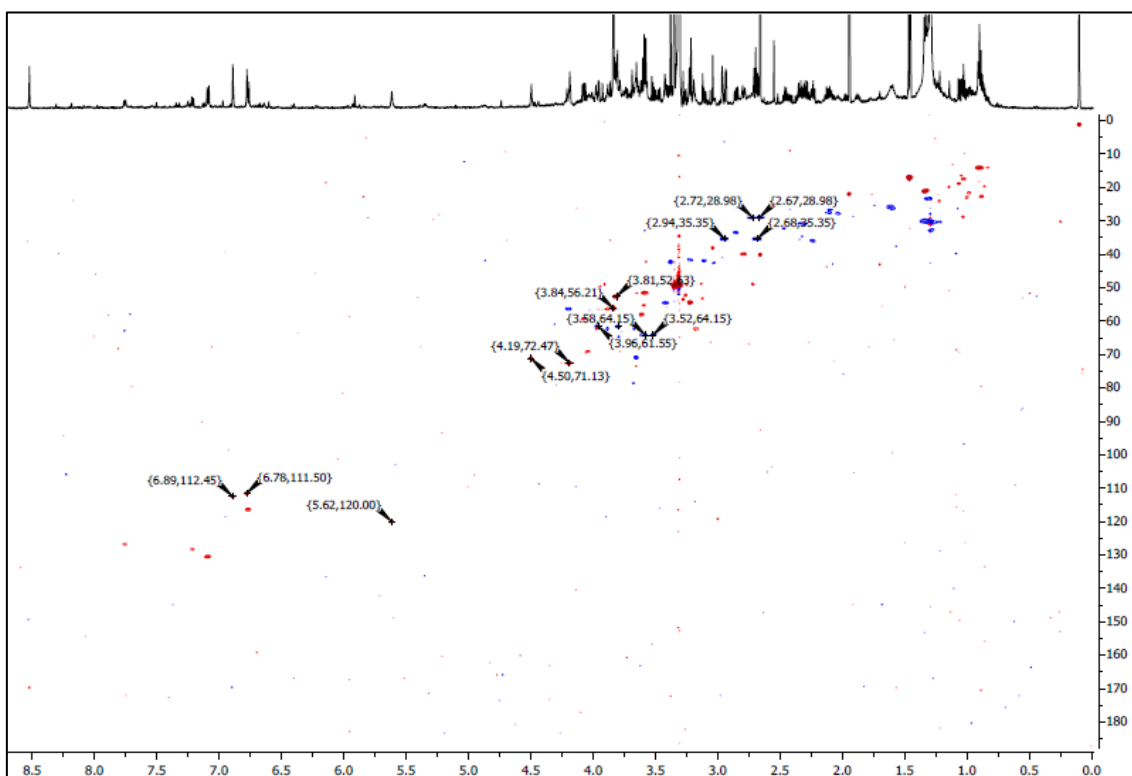
APÊNDICE N – DADOS DE RMN *g*-COSY DOS EXTRATOS DE
HIPPEASTRUM ELEGANS

N – ESPECTRO DE RMN *G*-COSY (600 X 600 MHZ EM MEOD) DO EXTRATO DE
450 DIAS DOS BULBOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS*



APÊNDICE O – DADOS DE RMN *g*-HSQC DOS EXTRATOS DE
HIPPEASTRUM ELEGANS

O – ESPECTRO DE RMN *G*-HSQC (600 X 150 MHZ EM MEOD) DO EXTRATO DE
450 DIAS DOS BULBOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS*



APÊNDICE P – DADOS DE RMN *g*-HMBC DOS EXTRATOS DE
HIPPEASTRUM ELEGANS

P – ESPECTRO DE RMN *G*-HMBC (600 X 150 MHZ EM MEOD) DO EXTRATO DE
450 DIAS DOS BULBOS DE *HIPPEASTRUM ELEGANS*.

