

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação Química e Biológica em
Hippeastrum breviflorum Herb.
(Amaryllidaceae)

CAMILA SEBEN

Porto Alegre, agosto de 2005.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação Química e Biológica em
Hippeastrum breviflorum Herb.
(Amaryllidaceae)

Dissertação apresentada por **Camila
Sebben** para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre, agosto de 2005.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.08.2005, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNESP

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S443i

Sebben, Camila

Investigação química e biológica em *Hippeastrum breviflorum*.

Herb (Amaryllidaceae) / Camila Sebben – Porto Alegre: UFRGS,
2005. – xxii, 193p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

.....

1. *Hippeastrum breviflorum*. 2. Amaryllidaceae. 3. Alcalóides. 4. Fitoquímica. I. Zuanazzi, José Angelo Silveira. II. Título.

CDU:547.9:582.572.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira-CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Professor Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi no laboratório de Fitoquímica (504) e na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os ensaios da atividade antiviral foram realizados com a colaboração do professor Dr. Jarbas Alves Montanha no laboratório de Virologia (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecemos a PROPESQ, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro e pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho uma ponte,
da procura, um encontro.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo carinho, companheirismo, conselhos e principalmente por serem meu amparo em todos momentos difíceis.

Aos meus preciosos irmãos, Marissol e Giovani, por terem compreendido minha ausência e sempre terem me recebido com alegria e amor inigualáveis.

Ao Alex, que apesar da distância sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos vividos, por todo amor, carinho e companheirismo dedicados.

As minhas grandes amigas, Paulinha, Aninha e Lisi, pelas risadas e, principalmente, pela disposição de ouvir e aconselhar.

A todos meus amigos: Ana Aboy, Ana Flávia, Ana Lúcia, Arno, Carla, Cláudia, Eduardo, Fabi, Jean, Lilo, Maria, Marina, Melissa, Miriam, Paulinho, Rafaela, Raquel, Roger, Vinícius e demais bolsistas pelo apoio, colaboração e incentivo.

À Carolina pelo auxílio, disposição e responsabilidade na realização de vários experimentos.

Aos colegas Alexandre, Ana Cristina, Carolina e Daniela Albring pelas inúmeras cuias de chimarrão, cafezinhos e momentos de descontração.

Aos botânicos Marcos Sobral e Dra. Julie Dutilh pela indispensável contribuição na identificação da espécie trabalhada.

Aos professores Dr. Ademir Morel da UFSM e Dr. Jaume Bastida pela obtenção e auxílio nos espectros de RMN.

Ao professor Dr. Jarbas Alves Montanha e suas bolsistas Gabriela, Caroline e Camila pela realização dos experimentos, atenção e ensinamentos nesta área antes desconhecida da virologia.

À professora Dr. Amélia Henriques pela colaboração.

Ao professor Dr. José Ângelo Zuanazzi pela oportunidade de realizar esta dissertação e pela confiança nestes cinco anos de pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN:	Acetonitrila
CC:	Cromatografia em coluna
CC ₅₀ :	Concentração que provoca alteração morfológica em 50% das células
CCD:	Cromatografia em camada delgada
CLAE:	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV:	Cromatografia líquida a vácuo
CMNT:	Concentração máxima não-tóxica
COSY:	Espectroscopia de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H
Cq:	Carbono quaternário
<i>d</i> :	Dubleto
<i>dd</i> :	Duplodubleto
DEPT:	Realce não distorcido por transferência de polarização
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilidrazila
<i>dt</i> :	Duplotripleto
ECP:	Efeito citopático
EtOH:	Etanol
GC/MS:	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
HMBC:	Correlação heteronuclear a longa distância ¹ H- ¹³ C
HMQC:	Correlação heteronuclear ¹ H- ¹³ C
HSV-1:	Herpes vírus tipo I
<i>J</i> :	Constante de acoplamento
<i>m</i> :	Multiplete
MEM:	Meio de cultura mínimo essencial de Eagle
MeOH:	Metanol
NOESY:	Espectroscopia de overhauser e troca nuclear
PBS:	Tampão fosfato
REA:	Relação estrutura-atividade
<i>R_f</i> :	Fator de retenção em cromatografia (Rate of flow)
RMN- ¹³ C:	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- ¹ H:	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i> :	Singleto
<i>t</i> :	Tripleto
TFA:	Ácido trifluoroacético
TMS:	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
Introdução Geral	1
Objetivos	7
Capítulo I - <i>Hippeastrum breviflorum</i> Herb.:	
Isolamento e elucidação estrutural	11
I.1 ASPECTOS BOTÂNICOS	13
I.1.1 A família Amaryllidaceae	13
I.1.2 Classificações infrafamília em Amaryllidaceae	14
I.1.3 O gênero <i>Hippeastrum</i>	15
I.1.4 A espécie <i>Hippeastrum breviflorum</i> Herb.	16
I.2 ESTUDOS QUÍMICOS EM AMARYLLIDACEAE	17
I.2.1 Alcalóides de Amaryllidaceae	17
I.2.1.1 Classificação	18
I.2.1.2 Localização no vegetal	18
I.2.1.3 Origem biossintética	19
I.2.1.4 Alcalóides em espécies de <i>Hippeastrum</i>	20
I.2.2 Flavonóides	26
I.2.3 Outros metabólitos	28
I.3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
I.3.1 Metodologia geral	29
I.3.2 Reagentes específicos	29
I.3.3 Equipamentos	29
I.3.3.1 Faixa de fusão	29
I.3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	30
I.3.3.3 Cromatografia circular centrífuga	30
I.3.3.4 Balança de infravermelho	30
I.3.3.5 Espectroscopia na região do ultravioleta	31
I.3.3.6 Cromatografia gasosa aplicada a espectrometria de massas	31
I.3.3.7 Espectrometria de massas	31
I.3.3.8 Ressonância magnética nuclear	31
I.3.4 Coleta do material vegetal	32
I.3.5 Preparação dos extratos e fracionamento	32
I.3.6 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE	33
I.3.7 Isolamento	35
I.3.7.1 Isolamento dos compostos HB1, HB2, HB3, HB4, HB5 a partir dos bulbos	35
I.3.7.2 Isolamento dos compostos HB6, HB7 e HB8 a partir das folhas	36
I.3.7.3 Isolamento dos compostos HB9 e HB10 a partir dos frutos	38
I.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
I.4.1 Massa e teor de umidade do material vegetal	40

I.4.2	Rendimento dos extratos.....	40
I.4.3	Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE.....	42
I.4.4	Identificação dos produtos isolados.....	47
I.4.4.1	Composto HB1	47
I.4.4.2	Composto HB2	52
I.4.4.3	Composto HB3	52
I.4.4.4	Composto HB4	54
I.4.4.5	Composto HB5	55
I.4.4.6	Composto HB6	58
I.4.4.7	Composto HB7	59
I.4.4.8	Composto HB8	60
I.4.4.9	Compostos HB9 e HB10.....	63
Capítulo II – Avaliações biológicas.....		65
II.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	67
II.1.1	Usos populares de espécies de Amaryllidaceae	67
II.1.2	Atividades biológicas relacionadas	68
II.1.2.1	Atividade antiviral.....	69
II.1.2.2	Atividades citotóxica e antitumoral	70
II.1.2.3	Atividade antimalárica.....	72
II.1.2.4	Atividade anticolinesterásica	73
II.1.2.5	Outras atividades.....	75
II.1.2.6	Toxicidade	76
II.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
II.2.1	Determinação da atividade anticolinesterásica.....	78
II.2.2	Determinação da atividade antioxidante.....	79
II.2.3	Avaliação da atividade antiviral	80
II.2.3.1	Preparo das soluções em teste	80
II.2.3.2	Cultura celular	80
II.2.3.3	Preparação das placas de microtitulação	81
II.2.3.4	Vírus	81
II.2.3.5	Determinação do título infeccioso viral	81
II.2.3.6	Avaliação da citotoxicidade das substâncias em teste	82
II.2.3.7	Determinação do efeito citopático viral	82
II.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
II.3.1	Atividade anticolinesterásica	84
II.3.2	Atividade antioxidante.....	85
II.3.3	Atividade antiviral	86
Discussão geral		91
Conclusões		99
Referências		103

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 Classificação do gênero <i>Hippeastrum</i> de acordo com diferentes autores.....	15
Figura I.2 Alcalóides representativos dos 10 núcleos de Amaryllidaceae	19
Figura I.3 Formação do precursor O-metilnorbeladina na biossíntese dos alcalóides de Amaryllidaceae	21
Figura I.4 Estrutura dos alcalóides isolados de espécies de <i>Hippeastrum</i>	23
Figura I.5 Flavanos identificados em espécies da família Amaryllidaceae	27
Figura I.6 Estrutura da pelargonidina e dos flavonóis canferol e quercetina	27
Figura I.7 Esquema da obtenção dos extratos de <i>Hippeastrum breviflorum</i>	34
Figura I.8 Isolamento dos compostos HB1, HB2, HB3, HB4 e HB5 a partir do extrato CH ₂ Cl ₂ -B de bulbos de <i>H. breviflorum</i>	37
Figura I.9 Isolamento dos compostos HB6, HB7 e HB8 a partir do extrato CH ₂ Cl ₂ -A de folhas de <i>H. breviflorum</i>	38
Figura I.10 Isolamento dos compostos HB9 e HB10 a partir dos frutos de <i>H. breviflorum</i>	39
Figura I.11 Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH ₂ Cl ₂ -A de [A] raízes e [B] bulbos.....	43
Figura I.12 Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH ₂ Cl ₂ -A de [A] flores, [B] frutos e [C] folhas	44
Figura I.13 Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH ₂ Cl ₂ -B de [A] raízes, [B] bulbos e [C] frutos	45
Figura I.14 Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH ₂ Cl ₂ -B de [A] flores e [B] folhas.....	46
Figura I.15 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB1	48
Figura I.16 Estrutura proposta para o composto HB1	50
Figura I.17 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB2	52
Figura I.18 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB3	53
Figura I.19 Estrutura proposta para o composto HB3	54
Figura I.20 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB4	54
Figura I.21 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB5	55
Figura I.22 Estrutura proposta para o composto HB5	58
Figura I.23 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB6	58
Figura I.24 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB7	59
Figura I.25 Estrutura proposta para o composto HB7	60
Figura I.26 Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB8	61
Figura I.27 Estrutura proposta para o composto HB8	62
Figura I.28 Espectro na região do ultravioleta obtido para os compostos HB9 e HB10	63
Figura I.29 Estrutura proposta para os compostos HB9 e HB10	64
Figura II.1 Estrutura dos alcalóides narciclasina e pancratistatina	71
Figura II.2 Estrutura dos alcalóides galantamina e sanguinina.....	74
Figura II.3 Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação da coloração púrpura na CCD	78
Figura II.4 Esquema da disposição da placa de microtitulação utilizada para o ensaio de determinação do efeito citopático viral	83
Figura II.5 Microfracionamento do extrato CH ₂ Cl ₂ -B de bulbos em CLAE.....	84
Figura II.6 Gráfico demonstrativo da redução do título infeccioso viral exibida pelos extratos e produtos isolados contra HSV-1 cepa ATCC-VR733.....	88

Figura II.7 Gráfico demonstrativo da redução do título infeccioso viral exibida pelos extratos e produtos isolados contra HSV-1 cepa KOS	88
Figura II.8 Estrutura dos ácidos caféico, ferúlico e clorogênico	89

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 Gradiente empregado em CLAE para análise dos extratos CH ₂ Cl ₂ -B.....	34
Tabela I.2 Massa fresca de cada parte do vegetal de <i>H. breviflorum</i>	40
Tabela I.3 Rendimento em porcentagem (%) dos extratos obtidos para o grupo de vegetais com flores vermelhas (VERMELHO).....	41
Tabela I.4 Rendimento em porcentagem (%) dos extratos obtidos para o grupo de vegetais com flores brancas (BRANCO)	41
Tabela I.5 Massa dos compostos isolados obtidos de cada parte do vegetal <i>H. breviflorum</i>	47
Tabela I.6 RMN 1D e 2D para o composto HB1 comparados com a literatura.....	51
Tabela I.7 RMN 1D e 2D para o composto HB5.....	57
Tabela II.1 Frações ativas de <i>H. breviflorum</i> quanto a atividade anticolinesterásica	85
Tabela II.2 Valores de CC50 e CMNT para os extratos e produtos isolados testados de <i>Hippeastrum breviflorum</i>	87
Tabela II.3 Determinação do efeito citopático viral dos extratos de folhas e produtos isolados da fração CH ₂ Cl ₂ -A.....	87

RESUMO

Plantas da família Amaryllidaceae são amplamente utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças. Estudos têm mostrado que a atividade biológica destes vegetais está relacionada à presença de alcalóides tetraisoquinolínicos, embora outros compostos não alcaloídicos também tenham sido encontrados. O gênero *Hippeastrum* encontra-se distribuído predominantemente na América do Sul sendo que no Estado do Rio Grande do Sul foram relatadas seis espécies nativas: *H. glaucescens*, *H. striatum*, *H. papilium*, *H. reginae* e *H. breviflorum*. A espécie estudada neste trabalho, *H. breviflorum*, foi coletada na região de Aparados da Serra (RS) e separada em dois grupos de acordo com a coloração das flores (vermelhas ou brancas). O material vegetal de ambos os grupos foi separado em bulbos, folhas, raízes, frutos e flores e submetido ao método clássico para extração de alcalóides. Empregando-se cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos obtidos verificou-se que os dois grupos vegetais são idênticos qualitativamente para um mesmo extrato testado. Foram isolados dez produtos de *H. breviflorum* sendo que sete compostos tiveram suas estruturas determinadas através do uso de técnicas de ressonância magnética nuclear, de espectrometria de massas e de cromatografia. As outras três substâncias apresentaram-se em quantidade insuficiente para análise. A partir das folhas de *H. breviflorum* foram isolados dois compostos identificados como etilcafeato e *p*-hidroxibenzaldeído, nos frutos foram encontrados os flavonóides rutina e quercetina e nos bulbos foram isolados os alcalóides licorina, HB1 e HB5, estes dois últimos inéditos denominados de breviflorina A e breviflorina B. Os extratos e produtos isolados foram avaliados quanto às atividades anticolinesterásica, antioxidante e antiviral. Apenas o extrato de bulbos apresentou atividade anticolinesterásica, sendo esta atividade também detectada para os compostos breviflorina A e breviflorina B. Dentre os compostos e extratos testados quanto à atividade antioxidante frente a DPPH, etilcafeato, quercetina e rutina foram os produtos mais ativos. O composto etilcafeato apresentou inibição do vírus da Herpes equivalente ao controle positivo aciclovir.

Palavras chave: *Hippeastrum breviflorum*, Amaryllidaceae, alcalóides, fitoquímica.

ABSTRACT

Plants belonging to the Amaryllidaceae family are widely used in folk medicine for treating many diseases. Many studies have demonstrated that biological activities can be attributed to the presence of tetraisoquinolinic alkaloids, although other non-nitrogenous constituents have also been found. The *Hippeastrum* genera is predominantly spread in South America. Six species were related in Rio Grande do Sul State: *H. glaucescens*, *H. striatum*, *H. papilium*, *H. reginae* e *H. breviflorum*. The studied specimen of this work, *H. breviflorum*, was harvested in Aparados da Serra (RS) and separated in two groups according to the flower's color (red or white). Both groups were separated in bulbs, leaves, roots, fruits and flowers and submitted to a classic alkaloid's extraction method. Both groups of extracts, when analyzed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were found to be qualitatively identical for the same tested extract. Ten compounds were isolated from *H. breviflorum* and seven had their chemical structures determined by use of nuclear magnetic resonance, mass spectrometry and chromatography. The other three substances had insufficient quantity for analysis. From the plant's leaves two compounds were identified as ethylcaffeate and *p*-hydroxybenzaldehyde, from fruits were found the flavonoids quercetin and rutin and from bulbs were isolated lycorine, HB1 and HB5. These last ones were identified and denominated as breviflorina A and breviflorina B. The extracts and isolated products were valued by acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and antiviral activities. Only the bulb's extract presented acetylcholinesterase inhibitory activity, this activity was also detected for the compounds breviflorina A e breviflorina B. Among the tested compounds and extracts tested to DPPH antioxidant activity ethylcaffeate, quercetin and rutin were the most actives. Ethylcaffeate showed Herpes virus inhibition similar to the acyclovir positive control.

Key words: *Hippeastrum breviflorum*, Amaryllidaceae, alkaloids, phytochemistry.

A humanidade, ao longo dos anos selecionou apenas cerca de 300 vegetais para sua alimentação e, a partir de um pouco mais de 100, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças (PINTO *et al.*, 2002). Estes números são bem modestos quando se está diante de uma diversidade de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores sendo que destas estima-se que entre 35.000 e 70.000 são utilizadas na medicina popular (PHILLIPSON, 1999).

As plantas – como parte da alimentação ou em preparações medicinais – têm sido usadas para curar ou prevenir doenças ao longo da história. Fósseis indicam que há 60.000 anos atrás os vegetais já eram utilizados pelo homem para fins medicinais. Atualmente, as plantas constituem uma parte integrante da terapêutica de quase 65% da população mundial. Na África do Sul, mais de 60% da população consulta um dos 200.000 curandeiros tradicionais em preferência ou em adição aos médicos ocidentais principalmente nas áreas rurais (ELGORASHI *et al.*, 2003). No Brasil, muitas pessoas preferem usar as plantas medicinais aos medicamentos devido ao seu menor custo e por acreditarem serem estas mais eficazes e com menor incidência de efeitos colaterais (VANDEBROEK *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a importância dos produtos naturais no âmbito farmacêutico. Estima-se que no período de 1981 a 2002 aproximadamente 50% dos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) norte-americano são de origem vegetal ou derivados destes através de síntese ou semi-síntese. Dentre os fármacos aprovados, verificou-se que 79% dos agentes antibacterianos, 71% dos antivirais e 51% dos agentes antineoplásicos são produtos de origem natural ou seus derivados (NEWMAN *et al.*, 2003).

Desta forma, as plantas podem ser consideradas como uma importante fonte de fármacos com diversas atividades farmacológicas ou de protótipos para o desenvolvimento destes (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; OKETCH-RABAH *et al.*, 1999; PHILLIPSON, 2003).

Datam do início do século XIX, os primeiros trabalhos envolvendo o isolamento de alcalóides realizados por Derosne e Serturmer (HENRIQUES *et al.*,

2003). Em 1838, a pereirina obtida das cascas do pau-pereira, talvez tenha sido o primeiro alcalóide a ser isolado no Brasil (PINTO *et al.*, 2002).

Desde então, um grande número de plantas tem sido investigado quanto ao seu conteúdo alcaloídico conduzindo a um maior número de estruturas conhecidas e a uma maior compreensão das rotas de biossíntese e distribuição destes compostos nos vegetais (BRUNETON, 1991; CORDELL *et al.*, 2001).

Os alcalóides têm demonstrado diversas atividades biológicas, apresentando com isso, um grande potencial no descobrimento de novos fármacos e no seu posterior desenvolvimento (BRUNETON, 2001; CORDELL *et al.*, 2001). No final do século 20, estimou-se que dos 119 compostos derivados de vegetais empregados isoladamente na terapia, 54 eram alcalóides (FARNSWORTH *et al.*, 1985).

Em revisão descrita por CORDELL e colaboradores (2001) foi relatado o isolamento de 448 alcalóides a partir de 192 espécies pertencentes a 34 gêneros de Amaryllidaceae. Apenas no ano de 2001, 14 novos alcalóides foram isolados de espécies desta família (JIN *et al.*, 2002).

A família Amaryllidaceae pertence a um grupo pequeno e uniforme de Monocotiledôneas (ELGORASHI *et al.*, 2003) as quais são, na sua maioria, empregadas em ornamentação (HEYWOOD, 1993; NAIR *et al.*, 2005). Existem também relatos de emprego popular de diversas espécies desta família no tratamento de tumores e algumas doenças cardíacas e pulmonares (DÖPKE *et al.*, 1995; LOUW *et al.*, 2002).

Dados da literatura demonstram que a atividade biológica e os efeitos tóxicos de plantas da família Amaryllidaceae são devidos à presença de alcalóides (IEVEN *et al.*, 1982; BRUNETON, 2001). Estes compostos isolados de espécies de Amaryllidaceae têm demonstrado um grande potencial farmacológico e diversos são os estudos que reportam o interesse dessa classe de substâncias na terapia contra o câncer, como antivirais, antimaláricos e analgésicos (MARTIN, 1987; LEWIS, 1990; GABRIELSEN *et al.*, 1992; LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; CAMPBELL *et al.*, 1998).

Homero, em seu poema épico "A Odisséia", descreve o uso de uma planta denominada "moly" como antídoto contra uma poção utilizada pela feiticeira Circe. Há evidências de que esta poção seria um extrato de *Datura stramonium* e o antídoto *Galanthus nivalis*, um vegetal da família Amaryllidaceae que contém galantamina (¹PLAITAKIS & DUVOISIN *apud* HEINRICH & TEOH, 2004). Este alcalóide, inicialmente obtido do vegetal *Galanthus woronowii*, é um potente inibidor seletivo da acetilcolinesterase sendo utilizado no tratamento da doença de Alzheimer e atualmente comercializado com o nome de Razadyne (HARVEY, 1995; MORAES-CERDEIRA *et al.*, 1997; HOWES *et al.*, 2003).

No Rio Grande do sul, foram encontrados até o momento 6 gêneros pertencentes a esta família: *Crinum* (1 espécie), *Alstroemeria* (1 espécie), *Habranthus* (5 a 6 espécies), *Zephyranthes* (3 a 4 espécies), *Rodophiala* (1 espécie) e *Hippeastrum* (6 espécies).

As espécies do gênero *Hippeastrum* são conhecidas popularmente como lírios, açucenas (SCHULTZ, 1990; JOLY, 2002), tulipas (LORENZI & MATOS, 2002), cebola-do-mato, cebola-berrante (HEGNAUER, 1963) e entre os floricultores pelo nome de "amaryllis" (DAHLGREN *et al.*, 1985). Diversas espécies do gênero são cultivadas como ornamentais como *H. adventum*, *H. bifidum*, *H. elegans*, *H. puniceum*, *H. reginae* e *H. striatum* (DAHLGREN *et al.*, 1985).

Apesar dos numerosos estudos sobre esta família, trabalhos envolvendo a caracterização química das espécies de Amaryllidaceae nativas do Estado do Rio Grande do Sul são raros. Assim, é possível que muitas espécies ainda estejam por serem estudadas e testadas na busca de novos compostos com importantes atividades farmacológicas.

¹ PLAITAKIS, A.; DUVOISIN, R. C. Homer's moly identified as *Galanthus nivalis* L.: physiologic antidote to *stramonium* poisoning. **Clinical Neuropharmacology**, v. 6, p. 1-5, 1983 *apud* 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**, v. 92, p. 147-162, 2004.

Até o momento, estudos envolvendo o vegetal *Hippeastrum breviflorum* Herb. não foram encontrados na literatura.

OBJETIVOS

Considerando-se que vários alcalóides com importantes atividades biológicas têm sido isolados de espécies da família Amaryllidaceae e que, no Rio Grande do Sul, foram encontradas 6 espécies do gênero *Hippeastrum* e apenas *H. glaucescens* foi recentemente pesquisada (HOFMANN JÚNIOR, 2002; HOFMANN JÚNIOR *et al.*, 2003), torna-se relevante conhecer a composição química de outras espécies - neste estudo *Hippeastrum breviflorum* Herb. - as quais podem representar uma potencial fonte de novas moléculas bioativas.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi o de isolar e identificar compostos presentes em bulbos, folhas, raízes, frutos e flores de *Hippeastrum breviflorum* Herb. uma das espécies da família Amaryllidaceae nativas do Estado do Rio Grande do Sul.

Os objetivos específicos incluem:

- Coleta do material vegetal e sua correta identificação;
- Obtenção dos extratos vegetais e frações enriquecidas e determinação do seu rendimento;
- Isolamento dos constituintes de interesse;
- Caracterização e identificação dos produtos isolados, através da realização de testes específicos e aplicação de técnicas de espectroscopia;
- Determinação de um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise destes compostos;
- Verificação da variação da composição química e comparação do perfil cromatográfico da espécie em função da coloração das flores observada;
- Realização de ensaios *in vitro* para a avaliação das atividades anticolinesterásica, antioxidante e antiviral dos extratos vegetais e dos produtos isolados promissores.

CAPÍTULO I

Hippeastrum breviflorum Herb.- Isolamento e Elucidação Estrutural

As publicações utilizadas no embasamento desta revisão bibliográfica foram localizadas através das seguintes bases de dados: SCIENCE DIRECT (1950/2005), SCIRUS FOR SCIENTIFIC INFORMATION, THIEME-CONNECT (1999/2005), WEB OF SCIENCE/CAPES (1945/2005). Nestas bases não foram encontradas referências de estudos químicos em *Hippeastrum breviflorum*.

I.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

I.1.1 A família Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae compreende 51 gêneros (MEEROW *et al.*, 2000), 14 tribos (MEEROW *et al.*, 2000) e aproximadamente 870 espécies (JUDD *et al.*, 1999).

As plantas pertencentes a esta família são herbáceas perenes, possuem ovário ínfero, com bulbos ou são raramente dotadas de rizoma como nos gêneros *Scadoxus*, *Cryptostephanus* e *Clivia* (DAHLGREN *et al.*, 1985; MEEROW & SNIJMAN, 1998).

A família Amaryllidaceae ocorre principalmente na África do Sul e em alguns países da América do Sul, regiões que são consideradas centros de diversificação primária e secundária desta família, respectivamente (MEEROW & SNIJMAN, 1998; ITO *et al.*, 1999). Alguns gêneros da família podem ser encontrados na Austrália, Malásia, Mediterrâneo e Ásia (ITO *et al.*, 1999). Atualmente, suas espécies encontram-se na América do Sul (28 gêneros), África (19 gêneros) e, menos freqüentemente, na região do Mediterrâneo (8 gêneros) (DAHLGREEN *et al.*, 1985; MEEROW & SNIJMAN, 1998). Em certos locais, os vegetais estão sendo ameaçados de extinção principalmente pela coleta indiscriminada e destruição do seu habitat natural, sendo que na França algumas espécies são protegidas por legislação específica (EVANS, 2002; FENNEL *et al.*, 2003; ZAHREDDINE *et al.*, 2004).

A família está pouco representada no Brasil. Somente os gêneros *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Alstroemeria*, *Clivia*, *Zephyranthes*, *Haemanthus*, *Eucharis*, *Habranthus*, *Worsleya*, *Griffinia* (MEEROW *et al.*, 1999; JOLY, 2002) e *Rodophiala*

(CASTILHOS, 2004) foram relatados, sendo encontrados preferencialmente em campos e alguns em caatingas (SCHULTZ, 1990).

I.1.2 Classificações infrafamília em Amaryllidaceae

Existe grande discordância na inclusão de certos gêneros na família Amaryllidaceae. Sendo assim, classificações infrafamília foram elaboradas por diversos autores (Figura I.1).

Em 1963, TRAUB (²*apud* MEEROW *et al.*, 2000) incluiu Alliaceae, Hemerocallidaceae e Ixioliriaceae, as quais possuem ovário súpero, como subfamílias. Na subfamília Amarylloideae foram inseridas duas infrafamílias Amarylloidinae e Pancratioidinae totalizando 12 e 4 tribos, respectivamente.

DAHLGREN e colaboradores, em 1985, através da integração de características morfológicas, químicas e citológicas, seguiram parte da classificação proposta por TRAUB. Consideraram como pertencentes à família apenas os gêneros da subfamília Amarylloideae e eliminaram qualquer classificação acima do nível de tribo, reconhecendo somente 9 tribos.

MEEROW em 1995 (³*apud* MEEROW *et al.*, 2000), sugeriu que três novas tribos fossem incluídas: Eustephieae, Calostemmatae e Hymenocallideae.

Em 1996, MÜLLER-DOBLIES & MÜLLER-DOBLIES (⁴*apud* MEEROW *et al.*, 2000), reconheceram 10 tribos (entre elas Calostemmatae) e 19 subtribos.

²TRAUB, H. P. **Genera of the Amaryllidaceae**. American Plant Life Society, La Jolla, CA *apud* MEEROW, A. W.; GUY, C. L.; LI, Q.; YANG, S. Phylogeny of the american Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, v. 25, p. 708-726, 2000.

³MEEROW, A. W. Towards a phylogeny of the Amaryllidaceae. In: RUDALL, P. J.; CRIBB, P. J.; CUTLER, D. F.; HUMPHRIES, C. J. **Monocotyledons: systematics and evolution**. Royal Botanical Garden, Kew. 1995 *apud* MEEROW, A. W.; GUY, C. L.; LI, Q.; YANG, S. Phylogeny of the american Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, v. 25, p. 708-726, 2000.

⁴MÜLLER-DOBLIES, D.; MÜLLER-DOBLIES, U. Tribes and subtribes and some species combinations in Amaryllidaceae J. St.-Hil. Emend Dahlgren and al. **Feddes Repertorium**, v. 107, p. 1-9, 1996 *apud* MEEROW, A. W.; GUY, C. L.; LI, Q.; YANG, S. Phylogeny of the american Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, v. 25, p. 708-726, 2000.

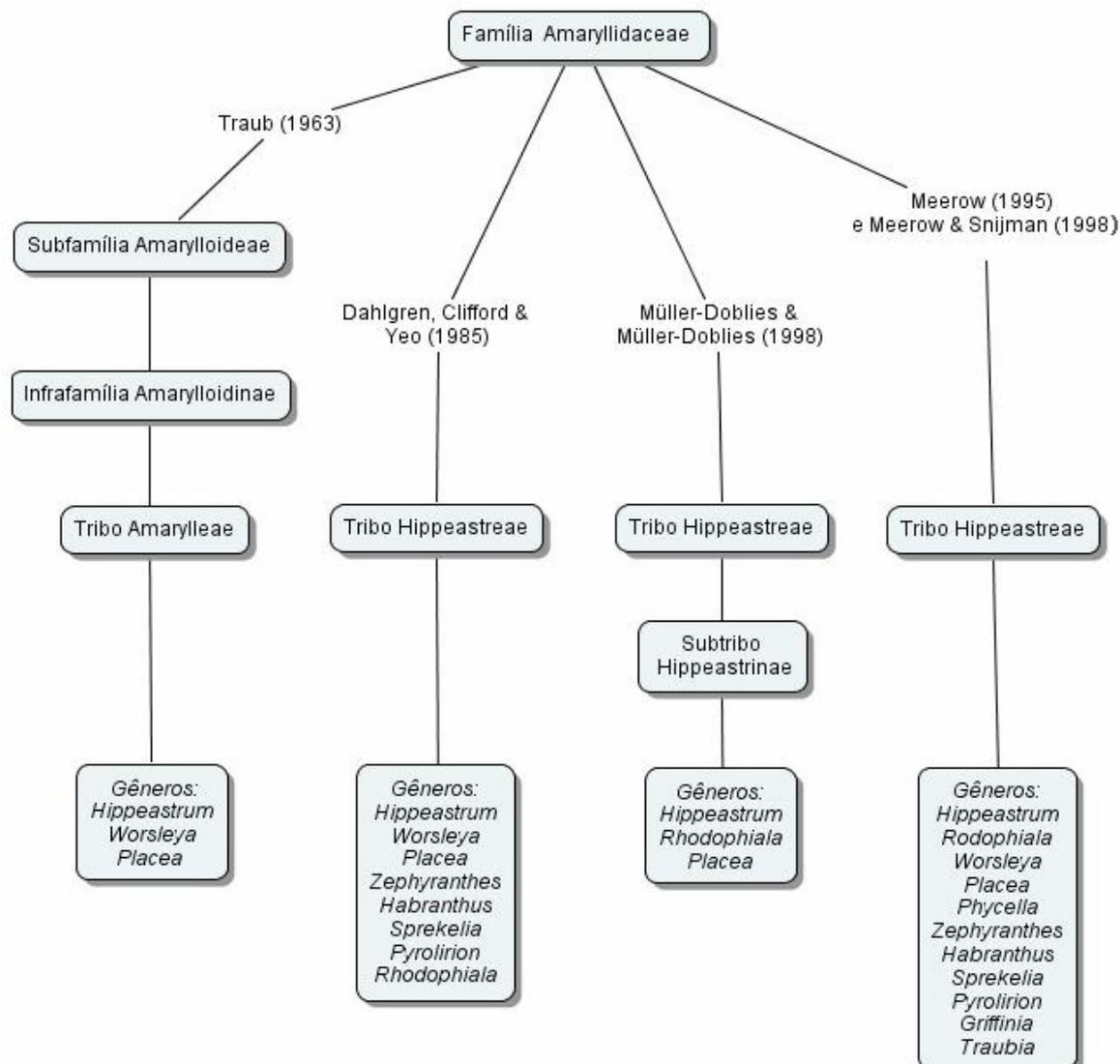


Figura I.1: Classificação do gênero *Hippeastrum* de acordo com diferentes autores.

Mais recentemente, MERROW & SNIJMAN (1998) reconheceram 14 tribos, com 2 subtribos apenas na tribo Amaryllideae.

Devido às divergências taxonômicas existentes na família, têm-se utilizado técnicas de análise filogenética como uma nova ferramenta para esclarecer e definir a posição dos gêneros na família Amaryllidaceae (MERROW *et al.*, 1999).

I.1.3 O gênero *Hippeastrum*

O gênero *Hippeastrum* é quase que exclusivamente Sul-americano (FABRIS, 1968) com distribuição desde o México e as Antilhas até a Argentina (DAHLGREN *et*

al., 1985) possuindo aproximadamente 70 espécies (JUDD *et al.*, 1999). No Brasil, encontra-se principalmente na parte leste do país e na região dos Andes em países como Bolívia e Peru (MEEROW & SNIJMAN, 1998).

No Estado do Rio Grande do Sul, foram encontradas 6 espécies nativas *Hippeastrum glaucescens*, *H. striatum*, *H. vittatum*, *H. papilium*, *H. reginae* e *H. breviflorum*.

Diversas classificações subgenéricas ou seccionais têm sido propostas para o gênero *Hippeastrum*, porém estas são ainda pouco consistentes (MEEROW & SNIJMAN, 1998).

I.1.4 A espécie *Hippeastrum breviflorum* Herb.

O vegetal *H. breviflorum* é uma espécie nativa da região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, sendo freqüentemente encontrada em lugares alagados (INSTITUTO PLANTARUM, 2005).

O vegetal apresenta folhas linear-lanceoladas, ápice atenuado, base canaliculado-côncava. Escapo multifloro, cerca de 1 m de altura, cilíndrico, glaucescente. Pedicelos do comprimento da espata ou maiores, eretos, subtetrágonos. Flores em número de seis, inodoras; perigônio campanulado, com até 5 cm; tubo breve, com estrias avermelhadas externamente, a face interna com cílios esverdeados evidentes; tépalas internas obovadas, acuminadas, de borda ondulada, brancas, com uma estria central amarelo-esverdeada e estrias purpúreas que se diluem em direção ao ápice, este agudo e sem a estria central evidente; estames avermelhados; anteras oblongas, amareladas; estilete da cor dos filamentos do estame e um pouco mais longo que estes (SEUBERT, 1855).

I.2 ESTUDOS QUÍMICOS EM AMARYLLIDACEAE

I.2.1 Alcalóides de Amaryllidaceae

Alcalóides são mais comuns em Dicotiledôneas quando comparados a Monocotiledôneas. Alcalóides de diferentes tipos podem ser encontrados em Monocotiledôneas, entretanto os mais importantes são os presentes em plantas das famílias Amaryllidaceae e Colchicaceae, sendo que os pertencentes a primeira apresentam grande interesse taxonômico (DAHLGREEN *et al.*, 1985).

Os alcalóides de Amaryllidaceae provavelmente possuem função de proteção no vegetal uma vez que, em outras famílias da ordem Liliiflorae, verifica-se a ocorrência de saponinas esteroidais enquanto que nas espécies desta família, estas estão ausentes (DAHLGREN *et al.*, 1985).

Os estudos envolvendo alcalóides de Amaryllidaceae tiveram início no século XIX com o isolamento da licorina de *Narcissus pseudonarcissus*. Porém, apenas em 1950, estes foram retomados com maior intensidade (COOK & LOUDON, 1952; HENDRICKSON, 1965; GHOSAL *et al.*, 1988) principalmente devido às potenciais atividades antiviral e antitumoral deste grupo de compostos (EVIDENTE *et al.*, 2004). Desde então, diversas espécies da família foram analisadas quanto ao seu conteúdo alcaloídico (CORDELL *et al.*, 2001).

Recentemente, verificou-se que os alcalóides de Amaryllidaceae não são exclusivos dos membros desta família. Como exemplos podemos citar os alcalóides mesembrol, egonina e amisina, os quais foram isolados de plantas desta família e também são encontrados em espécies de Aizoaceae (GHOSAL *et al.*, 1985; PHAM *et al.*, 1999) e crinamina isolada de *Dioscorea dregeana* (Dioscoriaceae) (MULHOLAND *et al.*, 2002). Capnoidina também foi encontrada em espécies da família Fumariaceae e bulbocapnina em espécies de Papaveraceae, Fumariaceae e Laureaceae. Estes dois alcalóides isoquinolínicos além de não serem exclusivos de Amaryllidaceae possuem núcleo fundamental diferente das observadas até o momento (KAYA *et al.*, 2004).

I.2.1.1 Classificação

Os alcalóides de Amaryllidaceae são derivados da fenilalanina e da tirosina e possuem como estrutura básica o núcleo tetraidroisoquinolínico (BRUNETON, 2001). Em 1998, HOSHINO classificou estes compostos de acordo com 7 núcleos principais, para os quais os alcalóides representativos são: licorina [1], crinina [2], narciclasina [3], galantamina [4], tazetina [5], licorenina [6] e montanina [7]. Recentemente, alguns autores introduziram outros três esqueletos baseados na estrutura dos alcalóides gracilina [8], galantindol [9] e plicamina [10], totalizando 10 núcleos fundamentais (Figura I.2) (NOYAN *et al.*, 1998; ÜNVER *et al.*, 1999; ÜNVER *et al.*, 2003).

I.2.1.2 Localização no vegetal

Estes compostos estão presentes em todo o vegetal, porém ocorrem predominantemente nos bulbos (BRUNETON, 2001). Ocorre uma variação importante no teor de alcalóides conforme o estágio de desenvolvimento da planta e parte relacionada (GHOSAL *et al.*, 1984; ELGORASHI *et al.*, 2002; ELGORASHI *et al.*, 2003). As diferenças no conteúdo e teor de alcalóides também podem ser grandes quando comparadas diferentes espécies pertencentes a um mesmo gênero (ELGORASHI *et al.*, 2003).

Para a espécie *Narcissus confusus* observou-se que embora os alcalóides estejam mais concentrados nos bulbos, as partes aéreas contêm a maior quantidade destes compostos quando comparadas às partes subterrâneas. Neste estudo, sugere-se que os alcalóides são acumulados preferencialmente nos bulbos durante o período vegetativo e são progressivamente transportados para as partes aéreas até o final do período ontogênico correspondente a senescência floral (LÓPEZ *et al.*, 2003).

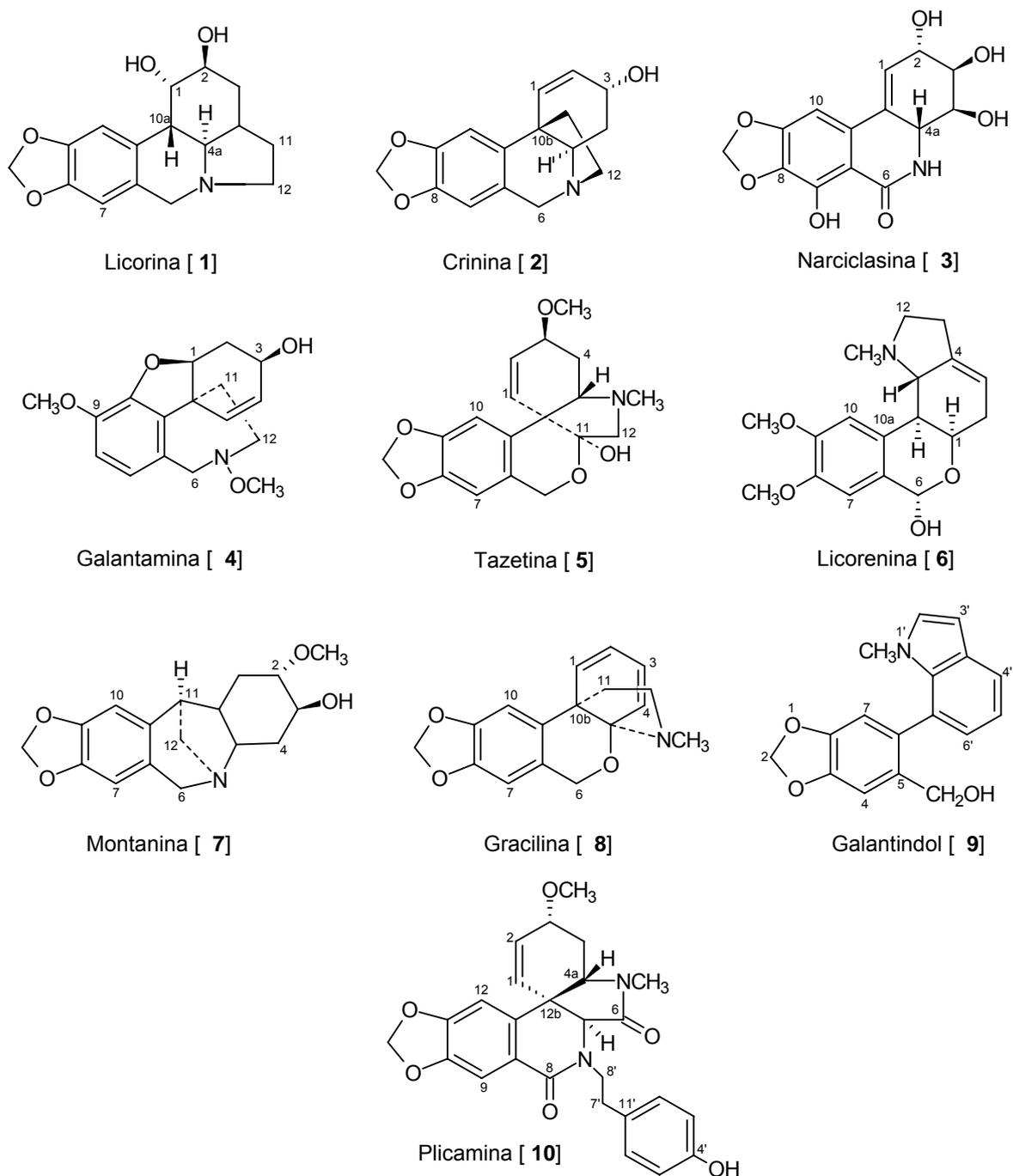


Figura I.2: Alcalóides representativos dos 10 núcleos fundamentais de Amaryllidaceae.

I.2.1.3 Origem biossintética

Os alcalóides de Amaryllidaceae constituem um subgrupo característico de alcalóides derivados da tirosina e da fenilalanina os quais se originaram de um mesmo precursor biossintético denominado norbeladina.

A biossíntese destes alcalóides deriva de um acoplamento oxidativo intramolecular que envolve o alcalóide norbeladina, um precursor do tipo C₆C₂-N-C₁C₆. A unidade C₆C₂ é originária da molécula de tirosina e a C₆C₁ é proveniente de uma molécula de fenilalanina.

A fenilalanina é primeiramente convertida a ácido cinâmico e, em seguida, hidroxilada a ácido caféico. Ocorre então, a perda de dois carbonos formando o 3,4-diidroxibenzaldeído que, por condensação com a molécula de tiramina proveniente da descarboxilação da tirosina, conduz à formação de norbeladina, e, posteriormente, a 4-O-metilnorbeladina (Figura 1.3) (BRUNETON, 2001). Esta molécula é considerada o precursor universal desta classe de alcalóides (EICHHORN *et al.*, 1998).

A partir de 4-O-metilnorbeladina podem ocorrer diferentes acoplamentos: *para-orto*, *orto-para* ou *para-para* e, dependendo destas formas de ligação podem existir diferentes grupos de estruturas conhecidas: galantamina, (*p-o*), licorina (*o-p*), crinina (*p-p*). Verificam-se também rearranjos secundários como ocorre na tazetina (BRUNETON, 2001; HOFMANN JÚNIOR, 2002).

1.2.1.4 Alcalóides em espécies de *Hippeastrum*

Mais de 50 alcalóides diferentes já foram isolados de espécies pertencentes ao gênero *Hippeastrum*. Dentre as espécies nativas do Estado do Rio Grande do Sul, apenas *Hippeastrum vittatum* e *Hippeastrum glaucescens* já foram quimicamente investigadas. Dentre as espécies estudadas quanto ao seu conteúdo alcaloídico podemos relatar as seguintes:

Hippeastrum añãñuca Phil.: licorina [1], homolicorina [11], maritidina [12], hipeastidina [13], epi-homolicorina [14] (PACHECO *et al.*, 1978), haemantamina [15], 11-hidroxi-1,2-diidromaritidina [16] (MARTIN, 1987).

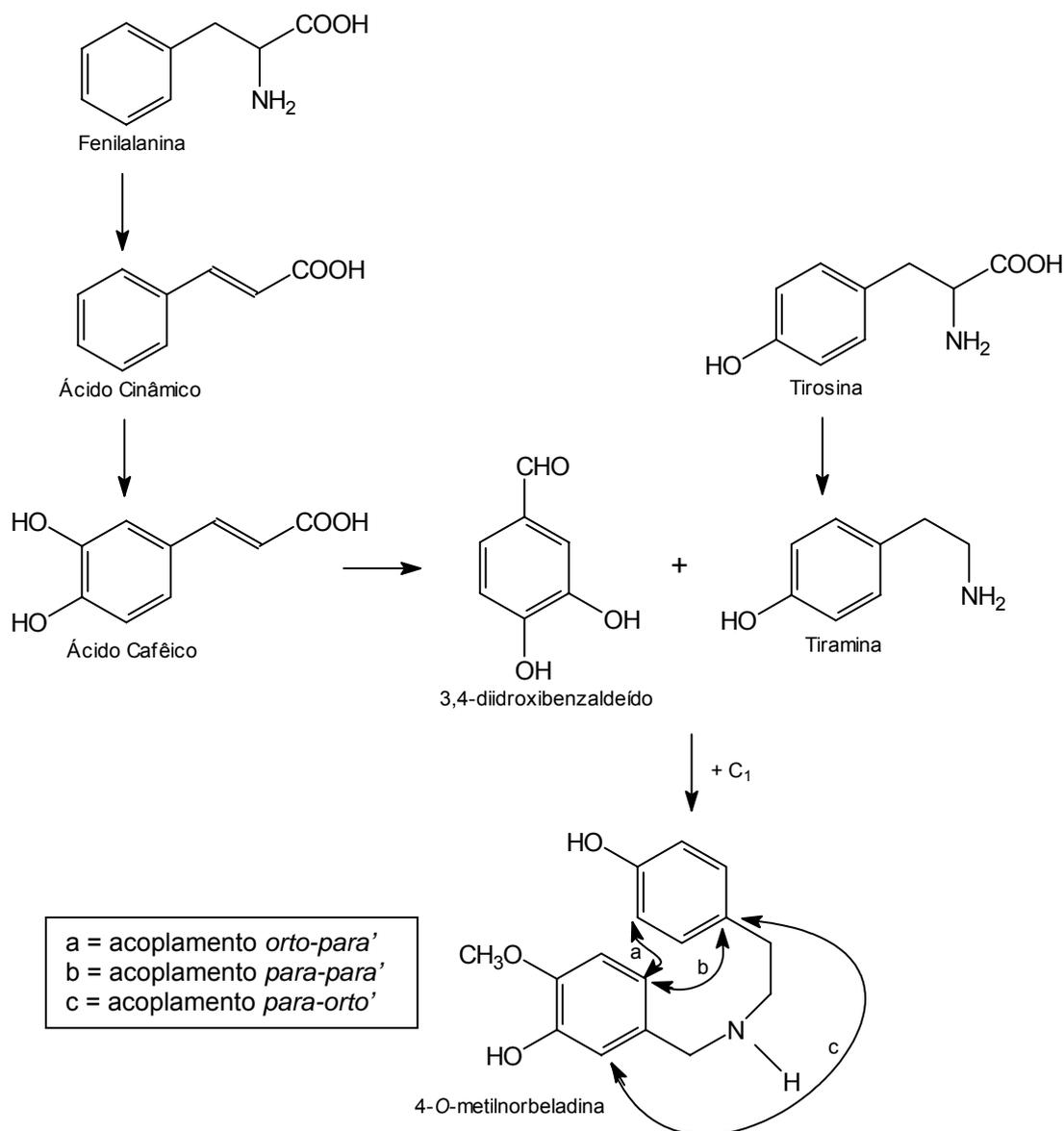


Figura I.3: Formação do precursor O-metilnorbeladina na biossíntese dos alcalóides de Amaryllidaceae.

Hippeastrum aulicum Herb. var. *robustum*: licorina [1], montanina [7], 2-O-acetillicorina [17], ambelina [18], clidantina [19], galantina [20], narcissidina [21], neruscina (desoxicorenina) [22], norpluvina [23], pseudolicorina [24] (WILDMAN, 1968).

Hippeastrum auriculatum: pseudolicorina [24] (KRISHNA RAO *et al.*, 1972).

Hippeastrum bicolor: licorina [1], haemantamina [25] (MARTIN, 1987).

Hippeastrum bifidum Herb.: licorina [1] (WILDMAN, 1960).

Hippeastrum brachyandrum Baker: licorina [1], licorenina [6], ambelina [18], crinamidina [26], narcissidina [21], undulatina [27] (WILDMAN, 1968).

Hippeastrum candidum Herb.: licorina [1], candimina [28] (WILDMAN, 1968).

Hippeastrum equestre Herb.: licorina [1] (MARTIN, 1987; DÖPKE *et al.*, 1995), tazetina [5] (KRISHNA RAO *et al.*, 1972; DÖPKE *et al.*, 1995; PHAM *et al.*, 1999), galantamina [4], galantina [20], haemantamina [25] (MARTIN, 1987), hipeastrina [29], famina [30] (DÖPKE *et al.*, 1995), ismina [31], 11-hidroxitatina [32], 9-O-desmetilomolicorina [33], pretazetina [34], 3-epimacronina [35] (PHAM *et al.*, 1997), 3-O-desmetiltazetina [36], egonina [37], tazetadiol [38] (PHAM *et al.*, 1999), pseudolicorina [24] (KRISHNA RAO *et al.*, 1972), N-metilcrinasiadina [39], 8,9-metilenodioxifenantridina [40] (LEWIS, 1997).

Hippeastrum glaucescens (Mart.) Herbert: licorina [1], tazetina [5], pretazetina [34] (HOFMANN JÚNIOR *et al.*, 2003).

Hippeastrum johnsonii: licorina [1], tazetina [5], pseudolicorina [24] (FUGANTI, 1975).

Hippeastrum puniceum Lam.: cavinine [41] (MARTIN, 1987), 11-hidroxitatina [32], 3-O-acetilnarcissidina [42], vitatina [43] (QUIRION & HUSSON, 1991).

Hippeastrum rutilum Herb.: licorina [1], galantamina [4], homolicorina [11], haemantamina [25], hipeastrina [29] (WILDMAN, 1960).

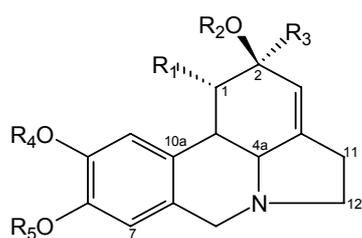
Hippeastrum solandriflorum Herb.: licorina [1], ismina [31], vitatina [43], hamaina [44], ungeremina [45] (BASTIDA *et al.*, 1996).

Hippeastrum vittatum L. Herb.: licorina [1], tazetina [5], hipeastrina [29], vitatina [43] (BOIT, 1956), homolicorina [11], haemantamina [25] (BOIT, 1956; WILDMAN, 1960), pratorina (hipadina) [46] (EL MOHGAZI *et al.*, 1975; ALI *et al.*, 1981), pancracina

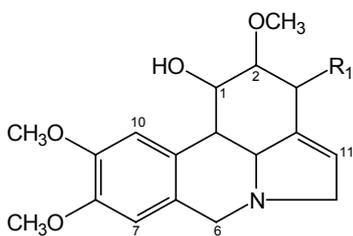
(hipagina) [47] (EL MOHGAZI *et al.*, 1975; ALI *et al.*, 1984), hipacina, rilistina [48] (EL MOHGAZI *et al.*, 1975), hipafina (GRUNDON, 1987), ismina [31], vitacarbolina [49], O-metilismina [50] (YOUSSEF, 2001).

Alguns alcalóides foram isolados de espécies híbridas de *Hippeastrum* como: licorina [1], tazetina [5], haemantamina [25], hipeastrina [29] (WILDMAN, 1968; HOSHINO, 1998), montanina [7], 11-hidroxitatina [32], vitatina [43], pancracina [47] (HOSHINO, 1998), crinina [2], galantamina [4], ambelina [18], galantina [20], narcissidina [21], crinamidina [26], povelina [51], hipamina [52], pluvina [53], anapovina, hipavina (WILDMAN 1968).

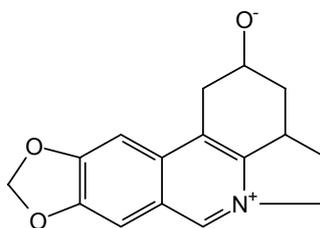
Na Figura I.4 estão apresentadas as estruturas dos alcalóides isolados de espécies pertencentes ao gênero *Hippeastrum*.



- Licorina [1] $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4+R_5=CH_2$
 2-O-acetillicorina [17] $R_1=OH$, $R_2=CH_2CH_3$, $R_3=H$, $R_4+R_5=CH_2$
 Galantina [20] $R_1=OH$, $R_2=R_4=R_5=CH_3$, $R_3=H$
 Norpluvina [23] $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=CH_3$, $R_5=H$
 Pseudolicorina [24] $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_3$
 Pratorina [46] $R_1=R_2=R_3=H$, $R_4+R_5=CH_2$
 Hipamina [52] $R_1=OH$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$, $R_4+R_5=CH_2$
 Pluvina [53] $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=R_5=CH_3$

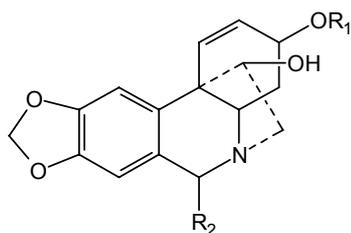


- Narcissidina [21] $R_1=OH$
 3-O-acetilnarcissidina [42] $R_1=OCH_2CH_3$



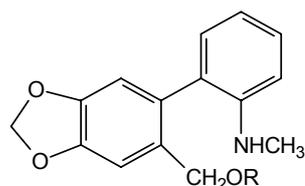
- Ungeremina [45]

Figura I.4: Estrutura dos alcalóides isolados de espécies do gênero *Hippeastrum*.



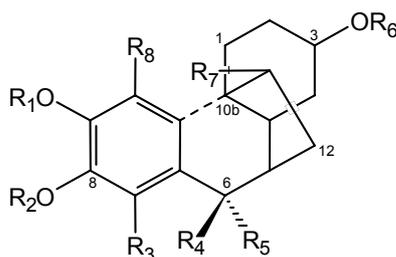
Haemantamina [25] $R_1 = \beta\text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$

Hamaína [44] $R_1 = \alpha\text{OH}$, $R_2 = \text{H}$



Ismina [31] $R = \text{H}$

O-metilismina [50] $R = \text{CH}_3$



Crinina [2] $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = \text{H}$ $\Delta^{1,2}$

Maritidina [12] $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \beta\text{OH}$, $R_7 = R_8 = \text{H}$ $\Delta^{1,2}$

Ambelina [18] $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{CH}_3$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$ $\Delta^{1,2}$

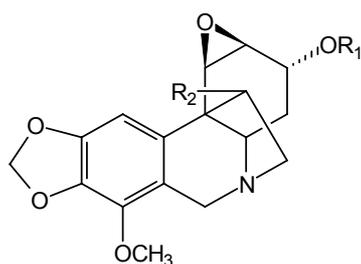
Hipeastidina [13] $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \alpha\text{OCH}_3$, $R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{OH}$ $\Delta^{1,2}$

11-hidroxi-1,2-diidromaritidina [16] $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \beta\text{OH}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$

11-hidroxivitatina [32] $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \beta\text{OH}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$ $\Delta^{1,2}$

Vitatina [43] $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \beta\text{OH}$, $R_7 = R_8 = \text{H}$ $\Delta^{1,2}$

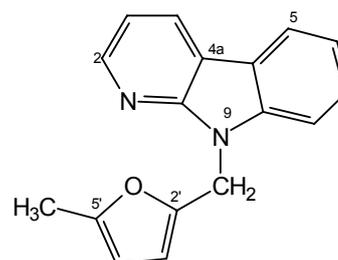
Povelina [51] $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = \text{H}$ $\Delta^{1,2}$



Crinamidina [26] $R_1 = R_2 = \text{H}$

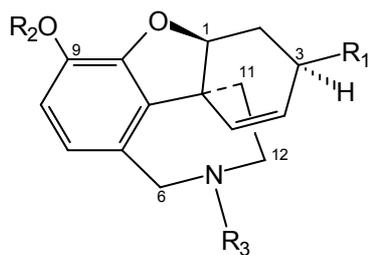
Undulatina [27] $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$

Cavinina [41] $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OH}$

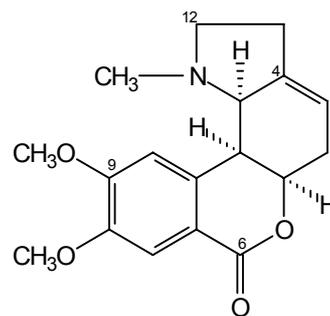


Vitacarbolina [49]

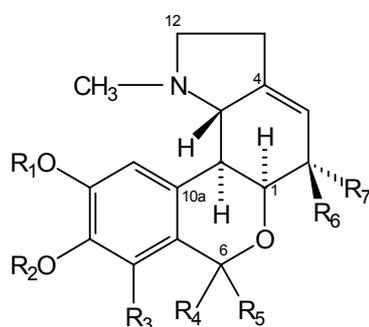
Figura I.4 continuação: Estrutura dos alcalóides isolados de espécies do gênero *Hippeastrum*.



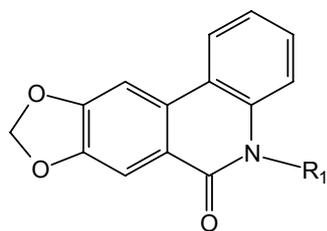
Galantamina [4] $R_1=\beta\text{OH}, R_2=R_3=\text{CH}_3$
 Clidantina [19] $R_1=\beta\text{OCH}_3, R_2=\text{H}, R_3=\text{CH}_3$

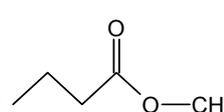


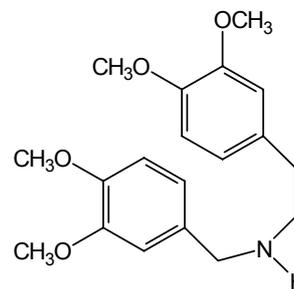
Epi-homolicorina [14]



Licorena [6] $R_1=R_2=\text{CH}_3, R_3=\text{H}, R_4=\text{OH}, R_5=R_6=R_7=\text{H}$
 Homolicorina [11] $R_1=R_2=\text{CH}_3, R_3=\text{H}, R_4+R_5=\text{O}, R_6=\text{H}, R_7=\text{H}$
 Neruscina [22] $R_1=R_2=\text{CH}_3, R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=\text{H}$
 Candimina [28] $R_1+R_2=\text{CH}_2, R_3=\text{OCH}_3, R_4+R_5=\text{O}, R_6=\text{OH}, R_7=\text{H}$
 Hipeastrina [29] $R_1+R_2=\text{CH}_2, R_3=\text{H}, R_4+R_5=\text{O}, R_6=\text{H}, R_7=\text{OH}$
 9-O-desmetilomolicorina [33] $R_1=\text{H}, R_2=\text{CH}_3, R_3=\text{H}, R_4+R_5=\text{O}, R_6=\text{H}, R_7=\text{H}$

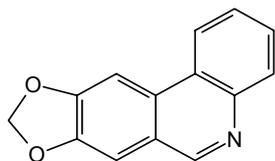


Famina [30] $R_1=$ 
 N-metilcrinasiadina [39] $R_1=\text{CH}_3$

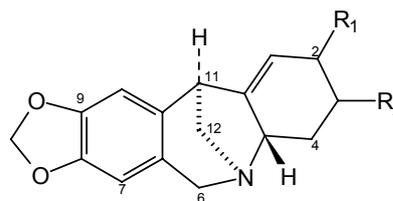


Rilistina [48]

Figura I.4 continuação: Estrutura dos alcalóides isolados de espécies do gênero *Hippeastrum*.

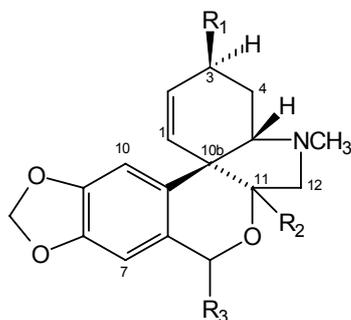


8,9-metilenodioxifenantridina [40]



Montanina [7] $R_1=\beta\text{OCH}_3$, $R_2=\alpha\text{OH}$

Pancracina [47] $R_1=\alpha\text{OH}$, $R_2=\beta\text{OH}$



Tazetina [5] $R_1=\beta\text{OCH}_3$, $R_2=\alpha\text{OH}$, $R_3=\text{H}$

Pretazetina [34] $R_1=\beta\text{OCH}_3$, $R_2=\beta\text{H}$, $R_3=\beta\text{OH}$

3-epimacronina [35] $R_1=\beta\text{OCH}_3$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{H}$

3-O-desmetiltazetina [36] $R_1=\beta\text{OH}$, $R_2=\alpha\text{OH}$, $R_3=\text{H}$

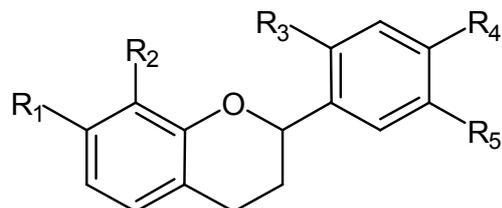
Figura I.4 continuação: Estrutura dos alcalóides isolados de espécies do gênero *Hippeastrum*.

I.2.2 Flavonóides

Embora os alcalóides sejam os compostos com maior importância do ponto de vista químico nesta família, alguns trabalhos relatam o isolamento de flavonóides. As flavanas 7-hidroxi-3',4'-metilenodioxiflavana [54], 7-glicosiloxi-3',4'-metilenodioxiflavana [55], 7,4'-diidroxi-3'-metoxiflavana [56] e 7-metoxi-2'-hidroxi-4',5'-metilenodioxiflavana [57] foram isoladas a partir dos bulbos de *Zephyranthes flava* (GHOSAL *et al.*, 1985) e 7,4'-diidroxi-8-metilflavana [58] a partir de *Pancreatium littorale* (Figura I.5) (IOSET *et al.*, 2001). Outros compostos fenólicos como flavanonas e chalconas também foram isolados de *Crinum bulbispernum* e *Pancreatium maritimum* (YOUSSEF *et al.*, 1998; RAMADAN *et al.*, 2000; TRAM *et al.*, 2002).

O teor de flavonóides totais para a espécie *Crinum bulbispernum* foi determinado em 0,13%, sendo 0,07% de canferol-3-O-xilosídeo. Outra flavana, 4'-hidroxi-7-metoxiflavana, com anel pirano não substituído foi encontrada nos bulbos de *C. americanum* e em traços nos bulbos de *C. moorei* e *C. augustum*. Este

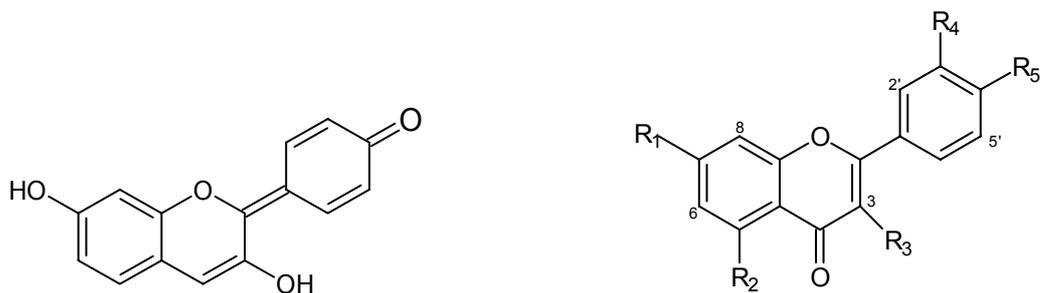
composto é raramente encontrado na natureza e pode ser utilizado como marcador para estas espécies (TRAM *et al.*, 2002).



Nº	Flavana	Posição				
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
[54]	7-hidroxi-3',4'-metilendioxiflavana	OH	H	H	OCH ₂ O	
[55]	7-glicosiloxi-3',4'-metilendioxiflavana	OGli	H	H	OCH ₂ O	
[56]	7,4'-diidroxi-3'-metoxiflavana	OH	H	OH	OCH ₃	H
[57]	7-metoxi-2'-hidroxi-4',5'-etilenodioxiflavana	OCH ₃	H	OH	OCH ₂ O	
[58]	7,4'-diidroxi-8-metilflavana	OH	CH ₃	H	OH	H

Figura I.5: Flavanas identificadas em espécies da família Amaryllidaceae.
Gli= glicose

Nas pétalas de algumas espécies de *Hippeastrum*, pelargonidina [59], uma antocianidina, foi encontrada como sendo o flavonóide majoritário. Traços dos flavonóis canferol [60] e quercetina [61] também foram isolados desta parte do vegetal (Figura I.6) (HRAZDINA, 1988).



Pelargonidina [59]

Canferol [60] R₁=R₂=R₃=R₄=OH, R₅=H

Quercetina [61] R₁=R₂=R₃=R₄=R₅=OH

Figura I.6: Estrutura da pelargonidina e dos flavonóis canferol e quercetina.

I.2.3 Outros metabólitos

Três cromonas, eugenina, 5,7-diidroxi-2,8-dimetilcromona e noreugenina foram obtidas dos bulbos de *Crinum moorei* (TRAM *et al.*, 2002).

Triterpenos foram encontrados em *Ammocharis coranica* e em espécies do gênero *Crinum* (KOORBANALY *et al.*, 2000).

Há relatos do isolamento de outros compostos não alcaloídicos, pertencentes ao metabolismo primário dos vegetais como álcoois, alcanos, hidroxicetonas, ácidos graxos e seus ésteres, carboidratos, ácidos, ésteres (FENNEL *et al.*, 2001; TRAM *et al.*, 2002) e lectinas (FENNEL *et al.*, 2001; VERMANI & GARG, 2002).

I.3 MATERIAIS E MÉTODOS

I.3.1 Metodologia geral

Os solventes e reagentes empregados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau p.a. e procedência Merck, Nuclear, Vetec, Quimex e Synth.

Para as cromatografias em coluna e líquida a vácuo, utilizou-se gel de sílica 60 de procedência Merck, com tamanhos de partículas 63-200 μm .

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck e em placas de vidro com medidas 10 x 20 cm e 20 X 20 cm, preparadas manualmente com auxílio de conjunto Desaga, tendo como adsorvente gel de sílica GF₂₅₄ Merck, em espessura de 0,25 mm e 0,5 mm para placas analíticas e preparativas, respectivamente.

Os cromatogramas foram observados sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e após nebulização com reagente de Dragendorff ou cloreto de alumínio.

I.3.2 Reagentes específicos

Os reativos específicos empregados para alcalóides foram Mayer (tetraiodomercurato de potássio), Bertrand (ácido sílico-túngstico) e Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio).

I.3.3 Equipamentos

Os equipamentos empregados foram Liofilizador Savant MicroModulyo Boc Edwards e Speed-vac com temperatura média (43°C) Boc Edwards.

I.3.3.1 Faixa de fusão

Foi utilizado aparelho de ponto de fusão manual Wagner & Murs-8 München 2. Este equipamento é composto por um microscópio para o acompanhamento da

fusão da amostra, através do bloco metálico aquecido, sobre o qual é colocada a amostra entre lâmina e lamínula.

1.3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas foram obtidos a partir de equipamento Alliance 2695 (Waters) gerenciado por software Empower (Waters) e detector de UV - diódos em série (Waters 996), com acumulação entre 200 e 400 nm, cada 4,8 nm e 1 espectro/segundo.

Foi empregada coluna cromatográfica Symmetry (Waters) contendo fase reversa C₁₈ (3,5 µm) com dimensões 4,6 x 75 mm protegida por pré-coluna Lichrospher (10 x 4 mm d.i.) empacotada com fase reversa C₁₈ Bondapak (Waters) (10 µm). O volume de injeção empregado foi de 10 µl.

As amostras foram filtradas previamente em membrana filtrante hidrofílica (HV-Durapore, Millipore; 0,45 µm; 13 mm).

1.3.3.3 Cromatografia circular centrífuga

Empregou-se equipamento Chromatotron modelo 7924-T Harrison Research sob fluxo de nitrogênio com operação e manutenção da alimentação do sistema de solvente de forma manual, com placa cromatográfica circular de 11,5 cm de raio e espessura de gel de sílica de 3 mm. Utilizaram-se 45g de gel de sílica GF₂₅₄ Merck para cada placa circular.

1.3.3.4 Balança de infravermelho

A balança de infravermelho utilizada foi da marca Bel Mark Top Ray Page, com temperatura programada para 105°C, variação de 0,20 e tempo de 10 segundos. Empregaram-se as diferentes partes do vegetal grosseiramente trituradas, sendo cada análise realizada em triplicata.

1.3.3.5 Espectroscopia na região do ultravioleta

Utilizou-se aparelho espectrofotômetro Hewlett Packard UV-VIS modelo HP 8452-A com varredura de diodos em série entre 200 e 400 nm com amostra dissolvida em metanol em cubetas de 1 cm.

1.3.3.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas GC/MS - QP5000 (Shimadzu), utilizando-se como gás de arraste hélio com fluxo de 1,0 ml/min, coluna capilar Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), temperatura do injetor a 280°C e detector a 280°C. Empregou-se programa de temperatura com início em 80°C e acréscimo de 10°C/min até 280°C, sendo mantida a 280°C durante os 10 minutos finais. A energia de ionização empregada foi de 70 eV. Este método foi adaptado a partir de BERKOV e colaboradores (2004).

1.3.3.7 Espectrometria de massas

Utilizou-se espectrômetro de massas MICROMASS Quattro LC, energia de ionização de 15 eV e inserção direta da amostra. Empregou-se fluxo de gás de 44 L/h e temperatura da fonte de 150°C.

1.3.3.8 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono para as substâncias HB7 e HB8 foram realizados em temperatura ambiente dissolvidas em DMSO, empregando tetrametilsilano (TMS) como referência. Empregou-se aparelho Bruker em campo de 400 MHz (RMN de ^1H) e 100 MHz (RMN de ^{13}C). Para a amostra HB7 também foi obtido o espectro DEPT-135 nas mesmas condições anteriores.

Os espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e correlações realizados para os produtos HB1 e HB5 foram conduzidos em espectrômetro Varian Inova 500 MHz

(RMN de ^1H) e 125 MHz (RMN de ^{13}C), dissolvido em CD_3OD , com deslocamentos químicos relativos ao tetrametilsilano.

I.3.4 Coleta do material vegetal

Durante os meses de abril a outubro, os vegetais da família Amaryllidaceae permanecem no período vegetativo, em que não são visíveis na superfície do solo devido à perda de suas partes aéreas. Por este motivo, as coletas são realizadas na época de floração e pós-floração do vegetal o que facilita a visualização e identificação botânica do mesmo.

A coleta do vegetal *Hippeastrum breviflorum* foi realizada na região de Aparados da Serra (Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul) no mês de dezembro de 2001. No local da coleta, verificou-se a presença de exemplares com flores brancas (chamado BRANCO) e com flores vermelhas (chamado VERMELHO), os dois grupos foram identificados como sendo a mesma espécie pelos botânicos Marcos E. G. Sobral (UFMG) e Dra. Julie Dutilh (UNICAMP). Porém como a classificação taxonômica das espécies de Amaryllidaceae é complexa, resolveu-se analisar separadamente os dois grupos.

Em novembro de 2002, foram coletados exemplares para determinação do teor de umidade. Neste momento, coletaram-se apenas indivíduos com folhas, raízes e bulbos, pois os vegetais não apresentavam flores e frutos o que impossibilitou a classificação destes em um dos dois grupos (BRANCO ou VERMELHO).

I.3.5 Preparação dos extratos e fracionamento

O material vegetal de ambos os grupos (BRANCO e VERMELHO) foi inicialmente separado em bulbos, raízes, flores, frutos e folhas. Estas frações ainda frescas foram trituradas, sendo cada parte da planta separadamente submetida à maceração com etanol 96% a temperatura ambiente, durante 7 dias. Após esse período, seguiram-se os processos de filtração à vácuo e eliminação do solvente em evaporador rotatório de pressão reduzida a temperatura de 40°C , sendo o solvente

restante (água) proveniente do vegetal fresco eliminado por liofilização. O remanescente de cada filtração foi colocado novamente em maceração com etanol pelo mesmo intervalo de tempo. Esse processo foi repetido até reação negativa frente aos reagentes de identificação de alcalóides (Mayer, Bertrand e Dragendorff).

Para a obtenção das frações enriquecidas em alcalóides foi empregado método de extração ácido-base que consiste na ressuspensão do extrato mole obtido com ácido clorídrico 10%, lavagem com éter de petróleo (para remoção de substâncias lipofílicas) seguido de extração com diclorometano (CH_2Cl_2) até reação negativa frente aos reagentes de identificação para alcalóides, fornecendo a fração denominada CH_2Cl_2 -A. A fase aquosa acidificada restante foi alcalinizada com hidróxido de amônio 25% (até pH 9) e extraída com diclorometano até reação negativa frente aos reagentes de identificação para alcalóides, originando a fração denominada CH_2Cl_2 -B. A fração CH_2Cl_2 -B foi filtrada sob sulfato de sódio anidro para eliminação de água. A soma dos extratos CH_2Cl_2 -A e CH_2Cl_2 -B resultou na fração alcalóides totais (Figura I.7). As frações obtidas éter de petróleo, CH_2Cl_2 -A e CH_2Cl_2 -B foram concentradas ao máximo, sendo que algumas apresentaram no final do processo um aspecto caramelizado.

I.3.6 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE

Os extratos éter, CH_2Cl_2 -A, CH_2Cl_2 -B obtidos de cada parte do vegetal foram analisados por cromatografia em camada delgada utilizando-se o sistema eluente CH_2Cl_2 :MeOH em diferentes proporções, observados sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e nebulizados com reagente de Dragendorff. Os cromatogramas de um mesmo extrato foram avaliados mediante comparação entre os grupos BRANCO e VERMELHO.

Os extratos CH_2Cl_2 -A obtidos de cada parte do vegetal na concentração de 1,4 mg/ml foram analisados por CLAE. O sistema eluente empregado para análise foi um gradiente linear, com fluxo de 0,6 ml/min, partindo de MeOH:H₂O:TFA (14:86:0,01; v/v/v) até MeOH:TFA (100:0,01; v/v), em 20 minutos.

Os extratos CH₂Cl₂-B obtidos de cada parte do vegetal na concentração de 7,0 mg/ml foram analisados por CLAE utilizando como eluente (A) ACN:H₂O:TFA (5:95:0,1; v/v/v) e eluente (B) ACN:TFA (100:0,1; v/v), com fluxo de 0,7 ml/min. O sistema gradiente empregado está indicado na Tabela I.1.

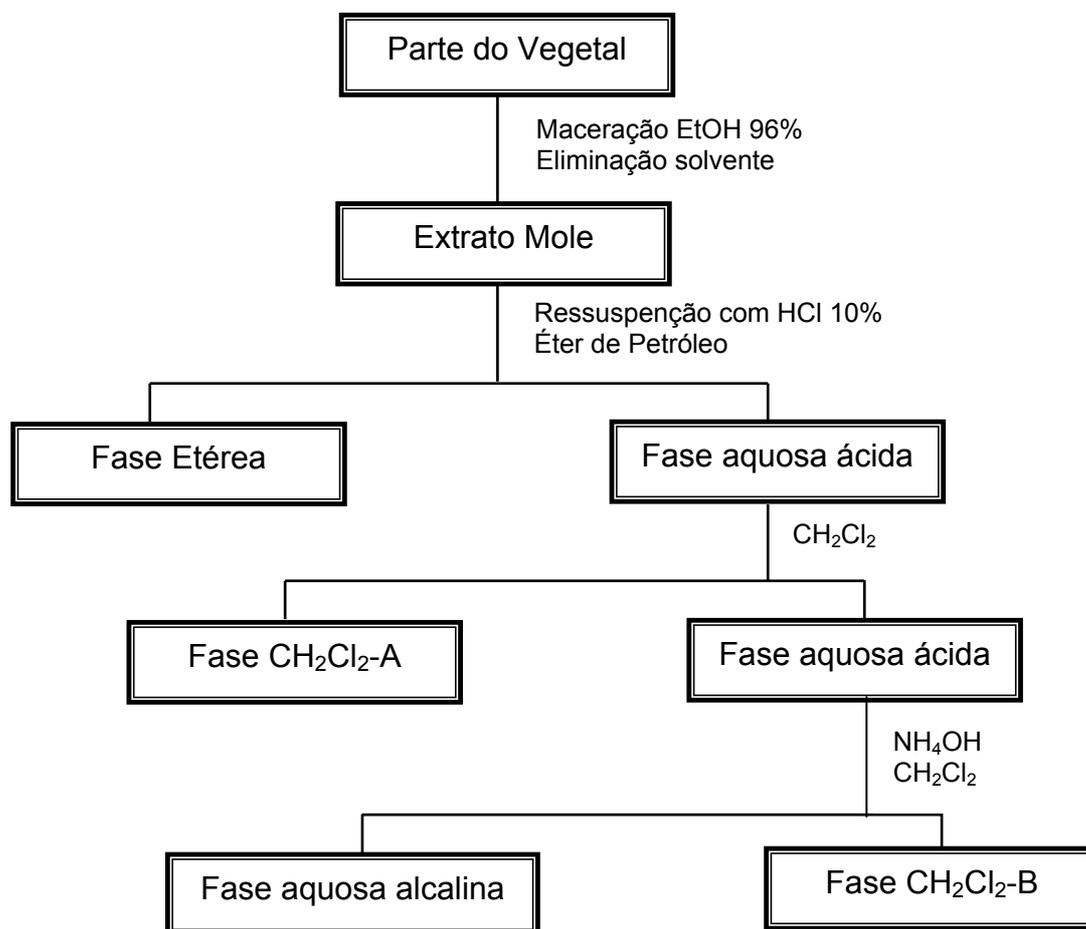


Figura I.7: Esquema da obtenção dos extratos de *Hippeastrum breviflorum*.

Tabela I.1: Gradiente empregado em CLAE para análise dos extratos CH₂Cl₂-B de *Hippeastrum breviflorum*.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	100	0
30	70	30
33	50	50
35	0	100

Os cromatogramas de um mesmo extrato foram avaliados mediante comparação entre os grupos BRANCO e VERMELHO.

I.3.7 Isolamento

Os compostos foram isolados a partir da fração CH₂Cl₂-B dos bulbos de *Hippeastrum breviflorum*, da fração CH₂Cl₂-A de folhas e também durante o processo de extração dos frutos do vegetal. Todos os compostos foram isolados a partir dos vegetais do grupo de flores vermelhas (VERMELHO).

I.3.7.1 Isolamento dos compostos HB1, HB2, HB3, HB4 e HB5 a partir dos bulbos

Os compostos foram isolados a partir de 2,15 g da fração CH₂Cl₂-B dos bulbos de *Hippeastrum breviflorum* (VERMELHO). Esta fração foi submetida a cromatografia líquida à vácuo (CLV) empregando-se gel de sílica como fase estacionária e sistema eluente gradiente de CH₂Cl₂/MeOH nas proporções 100/0, 90/10, 80/20 e 0/100 originando 4 frações. O volume utilizado de cada eluente foi de aproximadamente 200 ml. As frações foram analisadas por CCD analítica utilizando CH₂Cl₂/MeOH (90/10). Em seguida, a fração 80/20 (CH₂Cl₂/MeOH) da CLV foi submetida à cromatografia circular centrífuga empregando-se sistema eluente CH₂Cl₂/MeOH em ordem crescente de polaridade 100/0, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 50/50, 30/70, 20/80 e 0/100. As 26 frações obtidas foram secas e analisadas por CCD analítica utilizando-se como eluente CH₂Cl₂/MeOH em diferentes proporções. As frações 1 a 4, quando analisadas por CCD analítica em sistema eluente CH₂Cl₂/MeOH (93/7) apresentaram apenas duas manchas (R_f 0,62 e 0,53), sendo uma majoritária (R_f 0,53) e positiva para o reagente de Dragendorff. Estas frações foram unidas, ressuspendidas em metanol e submetidas à CCD preparativa usando o mesmo sistema eluente empregado para a CCD analítica. As manchas com R_f 0,53 e 0,62 foram isoladas e denominadas **HB1** (47,1 mg) e **HB2** (7,4 mg), respectivamente.

As frações 18 a 26 resultantes da cromatografia circular centrífuga foram reunidas por apresentarem perfil cromatográfico semelhante. Esta fração foi

submetida à cromatografia em coluna (CC) com eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade. Para este procedimento foram gastos 20,5 g de gel de sílica em uma coluna com dimensões 1,5 x 35,5 cm. Foram obtidas 63 frações, sendo que nas frações 29 a 36 observou-se a formação de um precipitado. Este precipitado quando analisado por CCD analítica utilizando-se como sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10) apresentou apenas uma mancha, sendo denominado **HB3** (3,5 mg).

A fração 100% MeOH obtida através da CLV foi submetida à CC empregando gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade. Foram utilizados 36 g de gel de sílica e uma coluna com 41 x 2 cm de dimensões. Foram coletadas 100 frações. Após análise de todas as frações obtidas por CCD analítica, as frações 29 a 39 por apresentarem perfil cromatográfico semelhante foram reunidas. A análise por CCD analítica destas frações em sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5) revelou a presença de três manchas (R_f 0,76; 0,47; 0,20), sendo duas majoritárias (R_f 0,76 e 0,47). As três manchas quando nebulizadas com o reagente de Dragendorff apresentaram coloração característica de alcalóide (vermelho tijolo). Uma das manchas majoritárias (R_f 0,47) quando analisada por CCD mostrou ser a mesma substância previamente isolada e denominada HB1. As frações 29 a 39 foram reunidas e submetidas a CCD preparativa usando como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5). Os produtos obtidos foram denominados **HB4** (R_f 0,20; 2,0 mg) e **HB5** (R_f 0,76; 16,2 mg).

A Figura I.8 apresenta o processo de obtenção dos compostos HB1, HB2, HB3, HB4 e HB5 isolados a partir do extrato CH_2Cl_2 -B de bulbos (VERMELHO).

1.3.7.2 Isolamento dos compostos HB6, HB7 e HB8 a partir das folhas

Após a realização de CCD analítica com o extrato CH_2Cl_2 -A de folhas (VERMELHO) empregando como sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10), observou-se a presença de três manchas (R_f 0,19; 0,56 e 0,61) sendo as duas últimas majoritárias. Porém, apenas a de menor R_f forneceu resultado positivo para alcalóides após revelação com o reagente de Dragendorff. Os compostos HB6 (R_f 0,19), HB7 (R_f 0,56) e HB8 (R_f 0,61) foram obtidos a partir de 350 mg do extrato

CH₂Cl₂-A de folhas (VERMELHO) empregando-se CCD preparativa no sistema em que foram previamente analisados. Após análise por CCD analítica e CLAE, verificou-se a presença de impurezas no alcalóide HB6. Este produto foi submetido à CCD preparativa usando como sistema eluente CH₂Cl₂/MeOH (90/10) em cuba cromatográfica saturada com hidróxido de amônio. O rendimento obtido para os compostos **HB6**, **HB7** e **HB8** foi de 6,7 mg, 63,9 mg e 125,7 mg, respectivamente (Figura I.9).

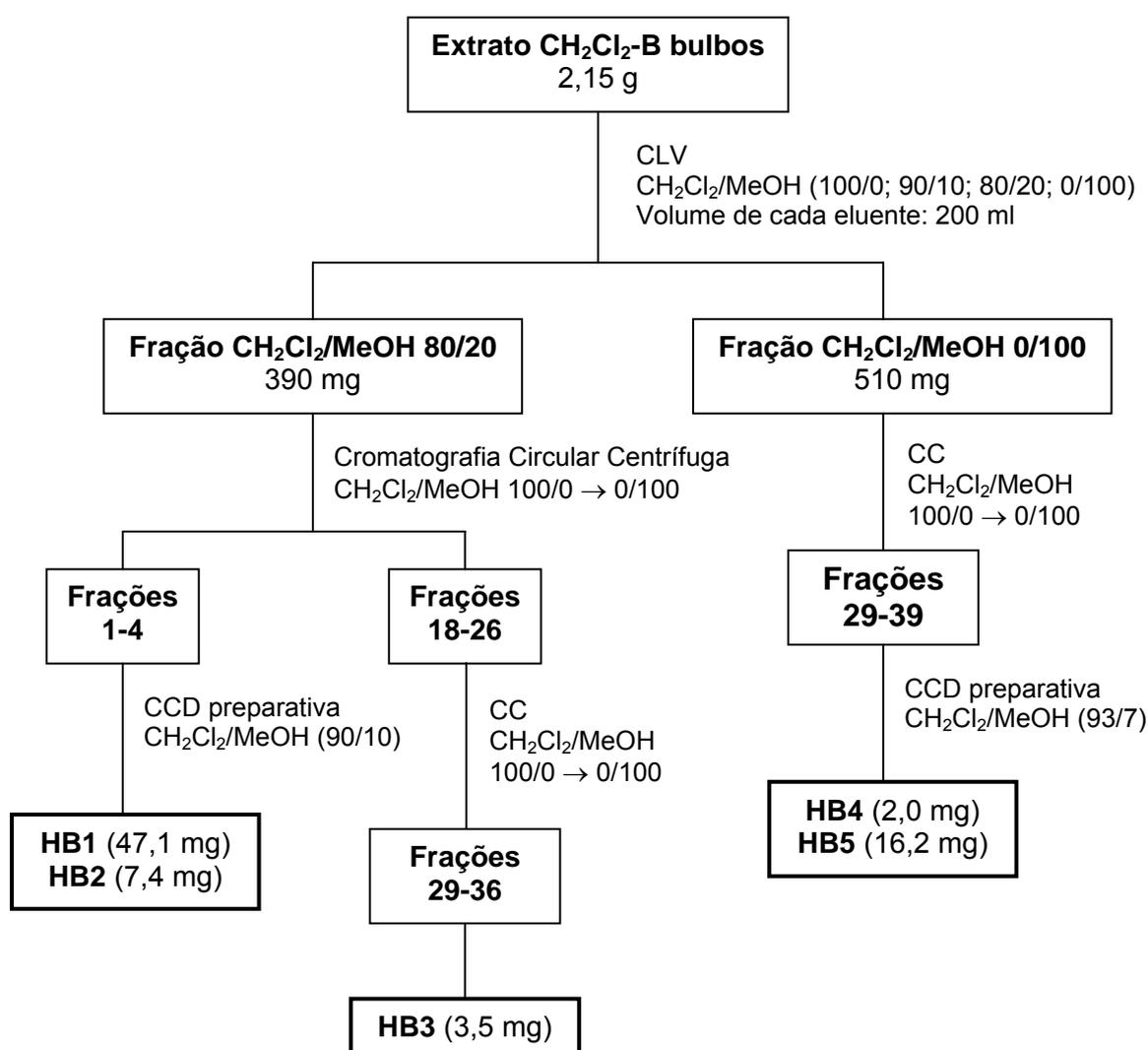


Figura I.8: Isolamento dos compostos HB1, HB2, HB3, HB4 e HB5 a partir da fração CH₂Cl₂-B de bulbos de *H. breviflorum*.

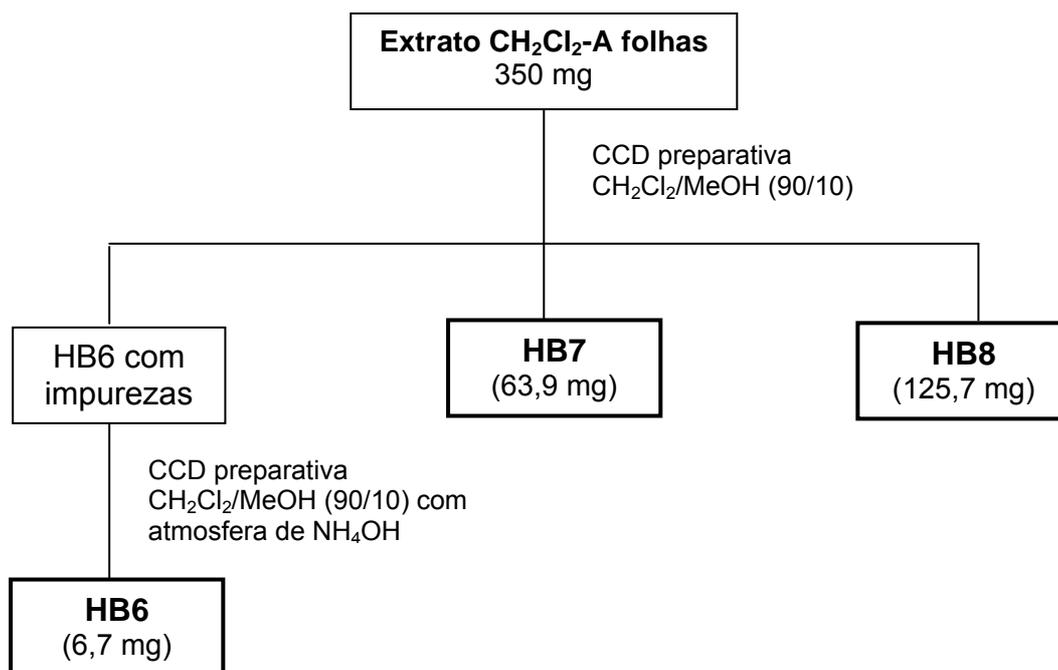


Figura I.9: Isolamento dos compostos HB6, HB7 e HB8 a partir do extrato CH₂Cl₂-A de folhas de *H. breviflorum*.

1.3.7.3 Isolamento dos compostos HB9 e HB10 a partir dos frutos

No processo de extração ácido-base do extrato mole de frutos, durante a etapa de lavagem com éter de petróleo, observou-se a formação de um precipitado na fase aquosa ácida. Este precipitado foi separado através de centrifugação e testado com reagentes de precipitação de alcalóides e cloreto férrico. Ao analisar o precipitado levemente amarelado por CCD empregando o sistema acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água (120/11/11/27) e CLAE, verificou-se a presença de duas manchas (*R_f* 0,39 e 0,98), sendo a de menor *R_f* majoritária. O precipitado obtido foi submetido à CCD preparativa no sistema eluente anteriormente citado. Os produtos isolados foram denominados **HB9** (*R_f* 0,98) e **HB10** (*R_f* 0,39) e apresentaram uma massa de 11,8 mg e 36,0 mg, respectivamente (Figura I.10).

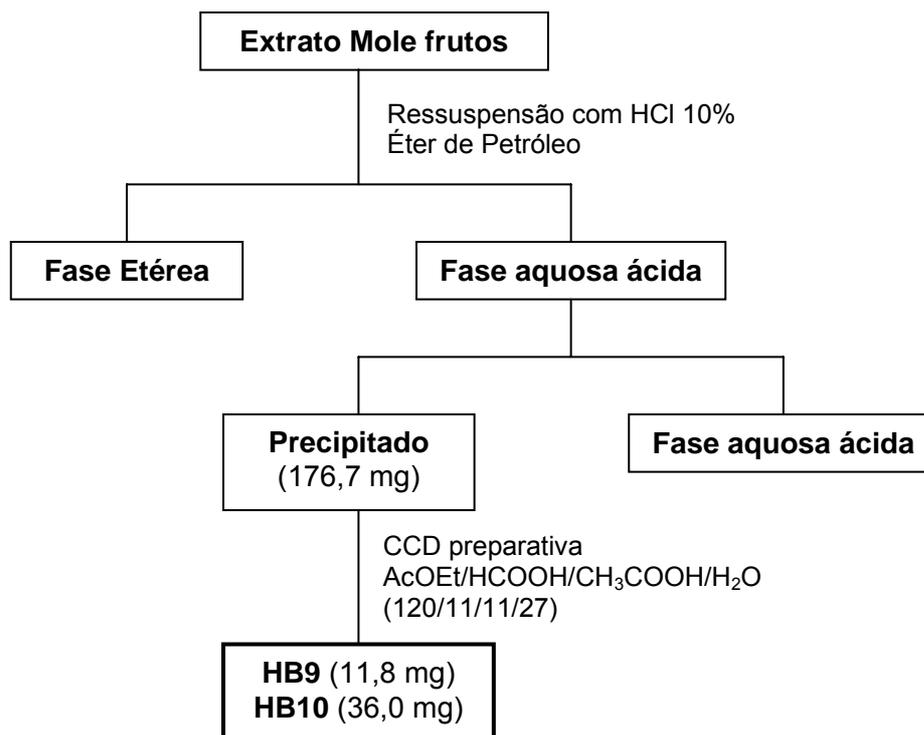


Figura I.10: Isolamento dos compostos HB9 e HB10 a partir dos frutos de *H. breviflorum*.

I.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.4.1 Massa e teor de umidade do material vegetal

A massa da planta fresca relativa a cada parte do vegetal de ambos os grupos de flores vermelhas e brancas está relacionado na Tabela I.2.

Tabela I.2: Massa fresca de cada parte do vegetal de *H. breviflorum*.

Parte utilizada	Massa vegetal fresca (g)	
	VERMELHO	BRANCO
Bulbos	3810	2260
Raízes	2280	1100
Folhas	3460	1300
Frutos	78	4
Flores	36	12

O teor de umidade médio encontrado para os bulbos de *H. breviflorum* foi de 88,9%, nas raízes 84,0% e nas folhas 89,6%. Estes valores foram considerados para ambos os grupos de vegetais com flores vermelhas e brancas.

I.4.2 Rendimento dos extratos

Para os cálculos de rendimento dos extratos empregaram-se os valores de massa vegetal fresco e seco, ou seja, descontado do teor de umidade previamente determinado para cada parte do vegetal. O rendimento em alcalóides totais foi calculado a partir da soma das massas das frações que continham alcalóides, ou seja, as frações denominadas CH₂Cl₂-A e CH₂Cl₂-B. Estes valores estão representados nas Tabelas I.3 e I.4.

Tabela I.3: Rendimento em porcentagem (%) dos extratos obtidos para o grupo de vegetais da espécie *H. breviflorum* com flores vermelhas (VERMELHO).

Parte do Vegetal	Éter		CH ₂ Cl ₂ -A		CH ₂ Cl ₂ -B		Total A+B	
	Peso fresco	Peso seco*	Peso fresco	Peso seco*	Peso fresco	Peso seco*	Peso fresco	Peso seco*
Bulbos	0,0994	0,8955	0,0487	0,4403	0,0564	0,5098	0,1051	0,9501
Raízes	0,1057	1,0163	0,0292	0,1826	0,0456	0,2849	0,0748	0,4675
Folhas	0,0605	0,3781	0,0384	0,3689	0,012	0,1166	0,0504	0,4855
Frutos	0,2265 (fresco)		0,1843 (fresco)		0,1095 (fresco)		0,2938 (fresco)	
Flores	0,4014 (fresco)		0,1286 (fresco)		0,0459 (fresco)		0,1745 (fresco)	

* Rendimento calculado em relação ao peso seco do vegetal, ou seja, descontado o teor de umidade.

Tabela I.4: Rendimento em porcentagem (%) dos extratos obtidos para o grupo de vegetais da espécie *H. breviflorum* com flores brancas (BRANCO).

Parte do Vegetal	Éter		CH ₂ Cl ₂ -A		CH ₂ Cl ₂ -B		Total A+B	
	Peso fresco	Peso seco*	Peso fresco	Peso seco*	Peso fresco	Peso seco*	Peso fresco	Peso seco*
Bulbos	0,1037	0,9342	0,1210	1,0943	0,0679	0,6138	0,1889	1,7081
Raízes	0,1168	1,1231	0,2413	1,5081	0,0769	0,4811	0,3182	1,9892
Folhas	0,0526	0,3288	0,0454	0,4365	0,0173	0,1668	0,0627	0,6033
Frutos	0,4208 (fresco)		0,1285 (fresco)		0,1568 (fresco)		0,2853 (fresco)	
Flores	0,3183 (fresco)		0,1087 (fresco)		0,0652 (fresco)		0,1739 (fresco)	

* Rendimento calculado em relação ao peso seco do vegetal, ou seja, descontado o teor de umidade.

Através da comparação entre os dados apresentados nas Tabelas I.3 e I.4 observou-se que devido ao grande teor de umidade encontrado em todas as partes do vegetal houve grande diferença entre os rendimentos calculados a partir do peso fresco e os obtidos com o peso seco do vegetal.

Entre os grupos BRANCO e VERMELHO houve diferença quanto ao rendimento dos extratos éter, CH₂Cl₂-A e CH₂Cl₂-B para cada uma das partes da

planta. Esta diferença também se torna evidente quando são comparados os rendimentos em alcalóides totais ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A} + \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$) para cada parte do vegetal.

I.4.3 Análise cromatográfica das frações por CCD e CLAE

Através da análise por CCD dos extratos dos grupos de flores vermelhas e brancas verificou-se que estes são idênticos qualitativamente para uma mesma parte do vegetal.

Comparando-se o perfil cromatográfico (CCD) de bulbos e raízes observou-se que estes também são iguais para um mesmo tipo de extrato seja este éter de petróleo, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A}$ ou $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$, mesmo em diferentes sistemas cromatográficos.

Quanto aos extratos éter de petróleo, apenas bulbos e raízes apresentaram bandas cromatográficas que foram reveladas pelo reagente de Dragendorff. Para os extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A}$ e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$, todas as partes do vegetal mostraram manchas reativas quando nebulizadas com este reagente.

O extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$ de todas as partes vegetais apresentou um maior número de manchas quando comparado às outras frações éter e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A}$. Assim como um maior número de bandas que foram reveladas pelo reagente de Dragendorff, indicando um maior número de compostos alcaloídicos.

Os extratos éter, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A}$ e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$ de frutos e flores mostraram perfil semelhante tanto para alcalóides, quando revelados com reagente de Dragendorff, quanto para outros compostos. O extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$ de flores e frutos apresentou um número maior de substâncias não alcaloídicas comparado aos extratos das demais partes do vegetal.

As frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A}$ das diferentes partes do vegetal apresentaram alcalóides com características mais polares e um maior número de compostos não alcaloídicos quando comparados às frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$.

As análises realizadas por CLAE confirmaram a semelhança do perfil cromatográfico entre os extratos dos grupos VERMELHO e BRANCO para uma mesma parte do vegetal, exceto para os extratos CH₂Cl₂-A de bulbos e raízes (Figuras: I.11, I.12, I.13 e I.14). Também pode ser evidenciada a semelhança entre o extrato CH₂Cl₂-B de raízes e bulbos e a semelhança entre os extratos CH₂Cl₂-B de flores e frutos.

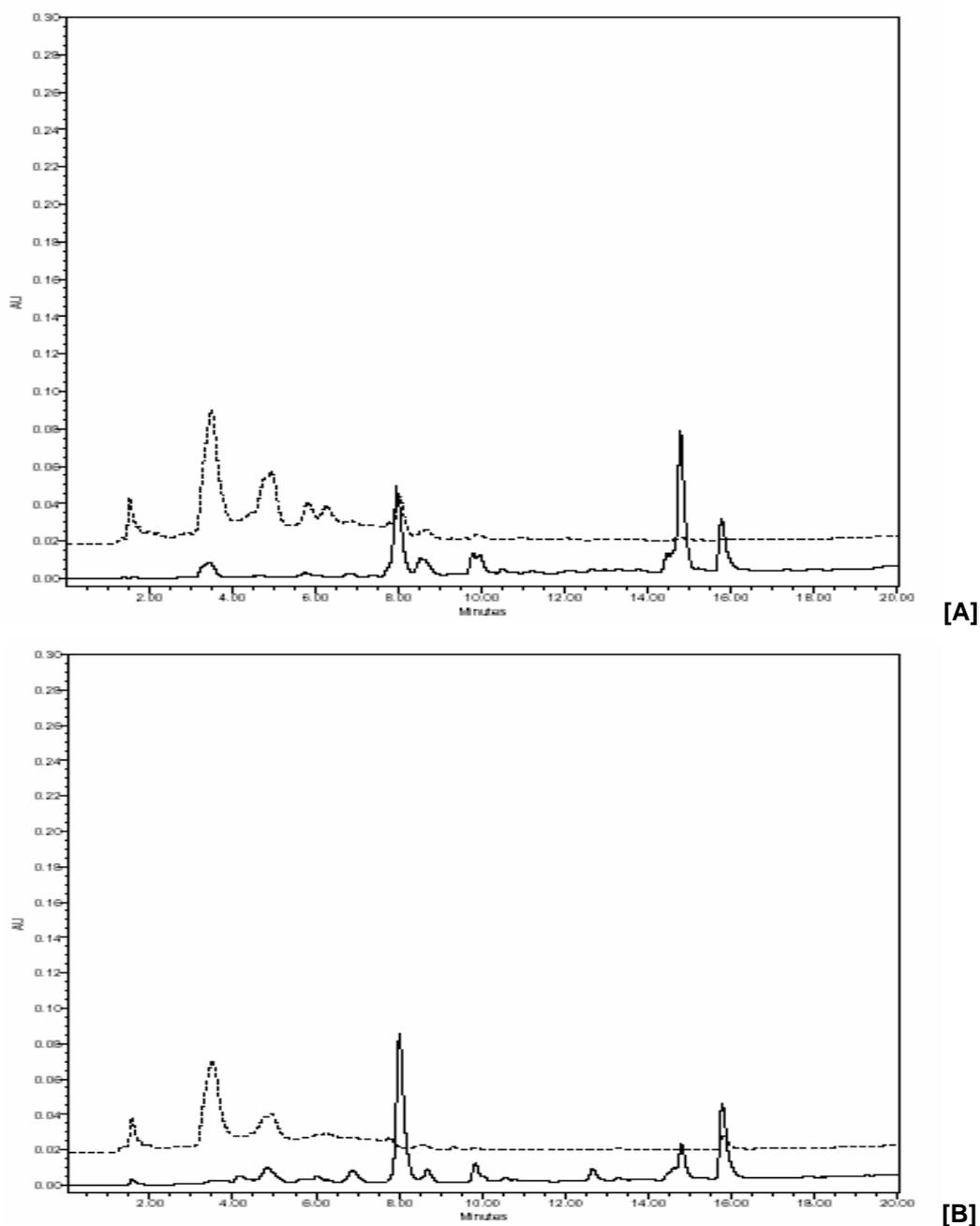
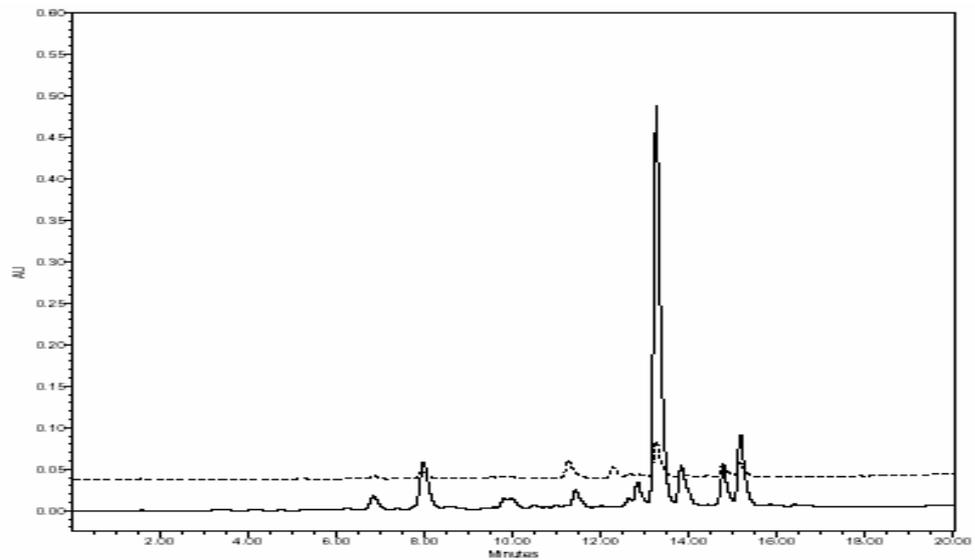
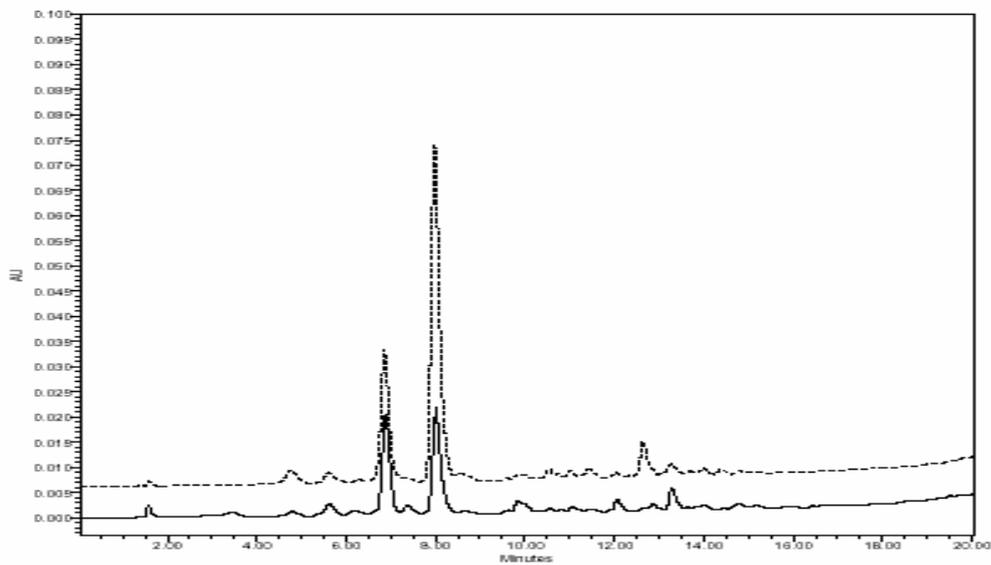


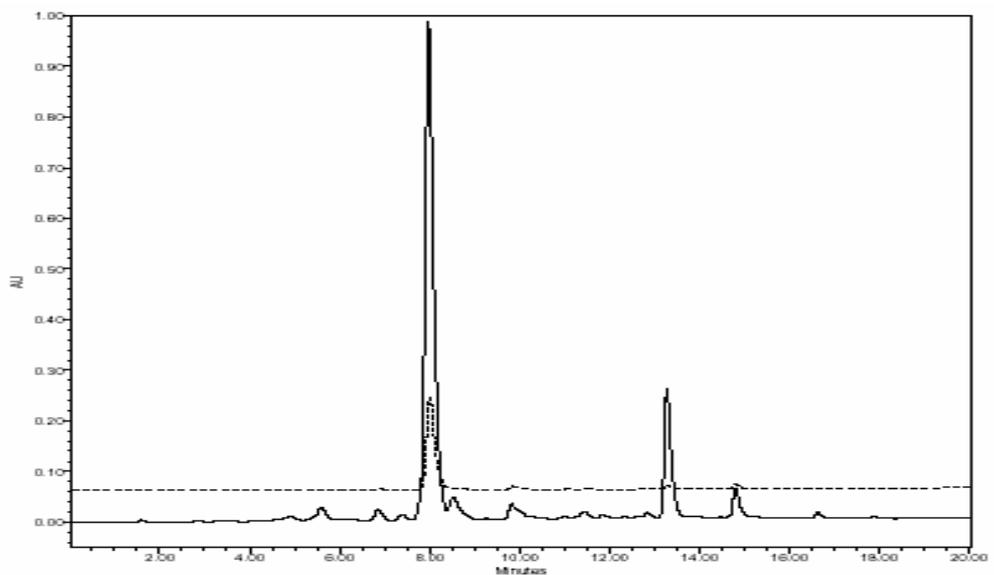
Figura I.11: Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH₂Cl₂-A de [A] raízes e [B] bulbos (----- extrato do grupo BRANCO e — extrato do grupo VERMELHO).



[A]

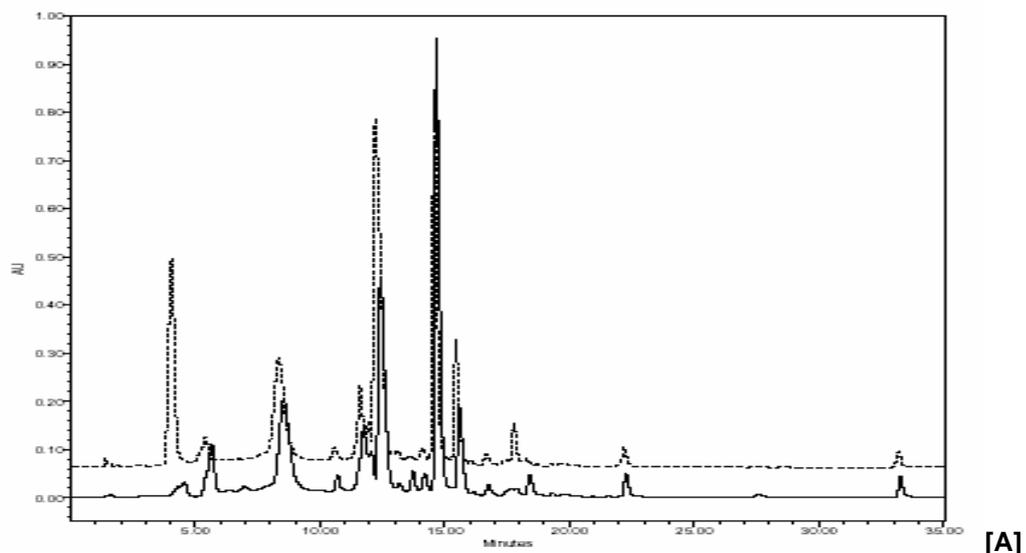


[B]

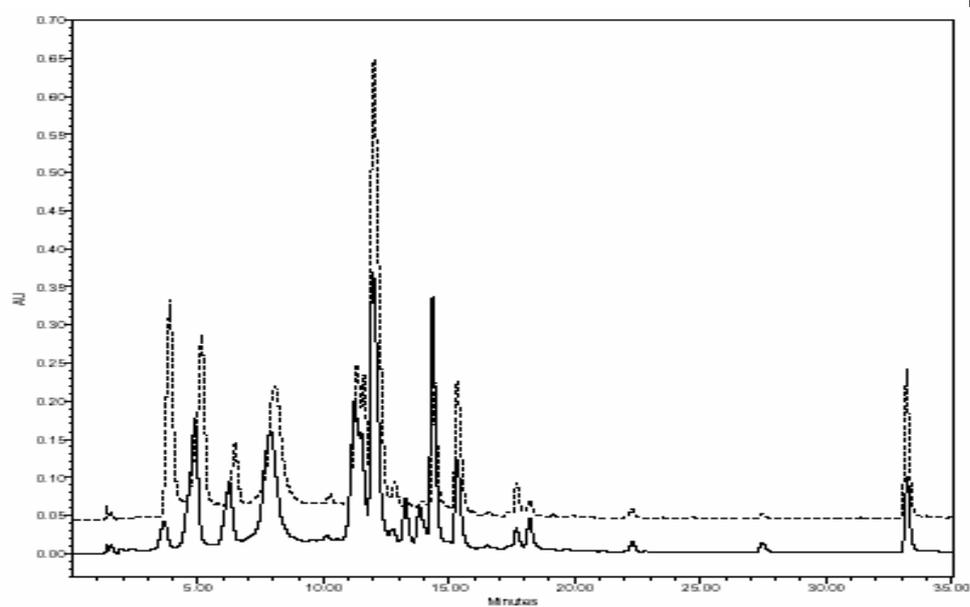


[C]

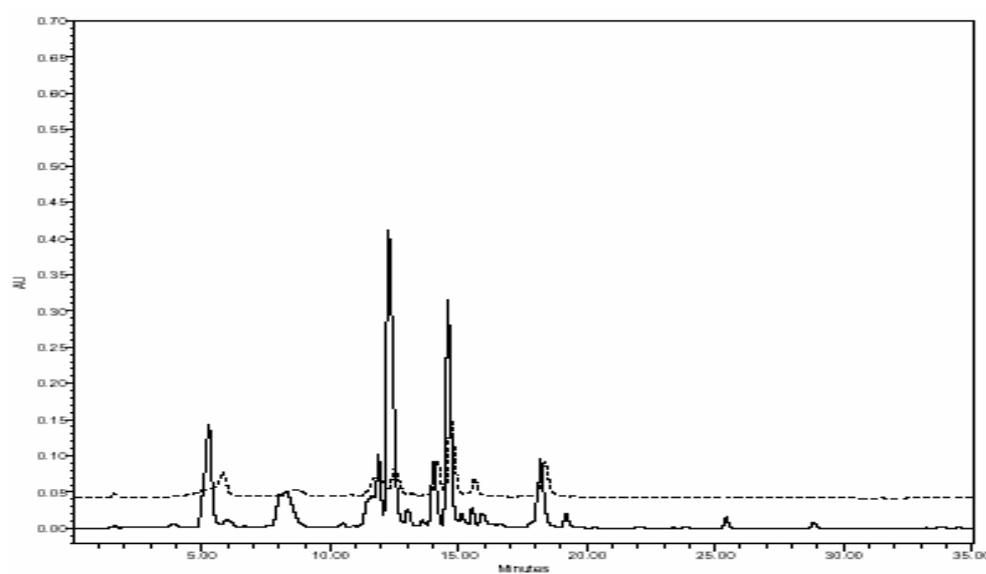
Figura I.12: Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH_2Cl_2 -A de [A] flores, [B] frutos e [C] folhas (----- extrato do grupo BRANCO e — extrato do grupo VERMELHO).



[A]



[B]



[C]

Figura I.13: Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos CH_2Cl_2 -B de [A] raízes, [B] bulbos e [C] frutos (----- extrato do grupo BRANCO e — extrato do grupo VERMELHO).

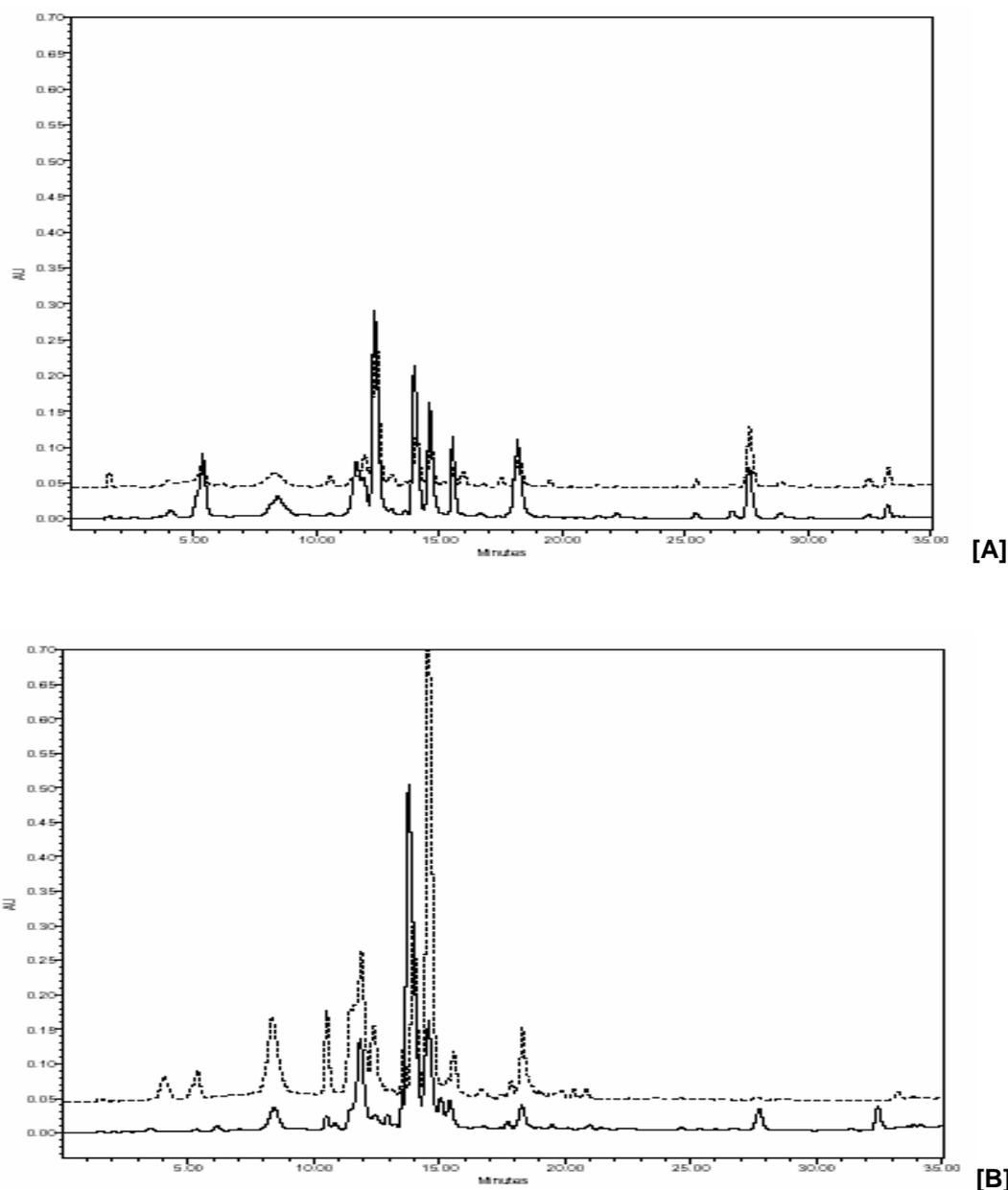


Figura I.14: Análise comparativa realizada em CLAE dos extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$ de **[A]** flores e **[B]** folhas (----- extrato do grupo BRANCO e — extrato do grupo VERMELHO).

Os extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$ de cada parte do vegetal, quando analisados por CLAE, mostraram ser bem mais complexos que os extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-A}$ provenientes da mesma parte da planta. Os extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$ exibiram a presença de diversos compostos sem, no entanto, apresentarem um produto majoritário fato que pode ter dificultado o processo de isolamento, pois os compostos foram encontrados em pequenas concentrações em uma mesma fração.

I.4.4 Identificação dos produtos isolados

A massa em miligramas dos compostos isolados e sua relação com a parte do vegetal do qual foi obtido estão relacionados na Tabela I.5.

Tabela I.5: Massa dos compostos isolados obtidos de cada parte do vegetal *H. breviflorum*.

Composto	Parte do Vegetal	Massa (mg)
HB1	Bulbos	47,1
HB2	Bulbos	7,4
HB3	Bulbos	3,5
HB4	Bulbos	2,0
HB5	Bulbos	16,2
HB6	Folhas	6,7
HB7	Folhas	63,9
HB8	Folhas	125,7
HB9	Frutos	11,8
HB10	Frutos	36,0

I.4.4.1 Composto HB1

Este composto foi isolado na forma de um sólido amarelo amorfo solúvel em metanol. HB1 apresentou reação positiva para os reagentes de precipitação de alcalóides. A faixa de fusão encontrada foi de 138-140°C.

Os espectros referentes ao composto HB1 encontram-se no Anexo 2.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

O espectro realizado em metanol demonstrou a existência de bandas em 243 e 295 nm (Figura I.15).

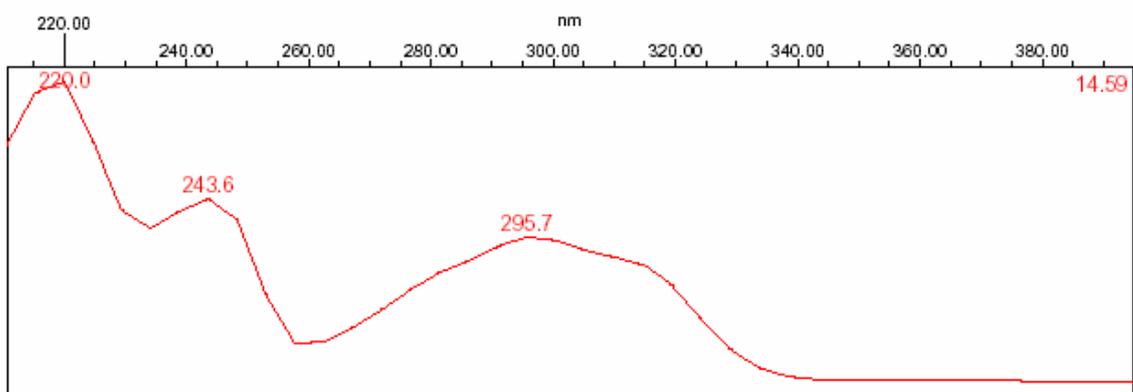


Figura I.15: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB1 em metanol.

Espectrometria de massas

Verificou-se o pico do íon molecular o qual também é o pico base em m/z 283 [M^+]. Outros sinais importantes foram m/z (%) 267 (13), 255 (65), 254 (54), 240 (45), 222 (33) e 194 (22). Observa-se a perda de 29 u.m.a (254 m/z) relacionada ao grupamento aldeído existente na molécula.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN 1H)

O espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) para o isolado HB1 apresentou 10 sinais os quais após integração indicaram a presença de 16 hidrogênios. Os sinais observados no espectro são os seguintes (em ppm): 9,45 (1H; s; CHO), 7,43 (1H; s; H-7), 7,10 (1H; *dd*; $J = 1,0; 7,0$ Hz, H-3), 6,85 (1H; *dt*; $J = 0,5; 1,5; 7,5$ Hz; H-1), 6,74 (1H; s; H-10), 6,73 (1H; *m*; H-2), 3,92 (3H; s; OCH_3), 3,32 (1H; *dd*; $J = 9,0; 3,0$ Hz; H-12 α), 3,15 (1H; *dd*; $J = 17,7; 9,0$ Hz; 12 β), 2,95 (2H; *m*; H-11), 2,24 (3H; s; NCH_3).

A análise do espectro de 1H mostrou a ausência de sinal correspondente ao grupamento metilenodioxí frequentemente encontrado na região de 5,90-6,10 ppm e comum a vários alcalóides isolados de espécies de *Amaryllidaceae*. A presença de um grupo metoxila e de um grupo NCH_3 pode ser verificada através dos sinais em 3,92 ppm e 2,24 ppm, respectivamente. O sinal em campo baixo (9,45 ppm) caracterizou a presença de um aldeído na molécula.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono (RMN ¹³C)

Através da análise do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) deste composto pode-se verificar a presença de 17 carbonos cujos deslocamentos são os seguintes (em ppm): 190,9 (Cq; CHO), 155,1 (Cq; C-9); 151,1 (Cq; C-4a), 148,5 (Cq, C-8), 141,1 (Cq, C-10a), 131,7 (Cq; C-10b), 130,3 (CH; C-1), 125,6 (Cq; C-6a), 124,0 (CH; C-3), 120,2 (Cq; C-4), 118,7 (CH; C-2), 117,8 (CH; C-10), 107,9 (CH; C-7); 56,9 (CH₂; C-12), 55,1 (CH₃; OCH₃), 38,5 (CH₃; NCH₃), 28,3 (CH₂;C-11).

A presença de um grupo aldeído na molécula foi confirmada pela existência de um sinal em 190,9 ppm cujo deslocamento indica ser uma carbonila característica de aldeído (faixa de 190 – 205 ppm) (PAVIA *et al.*, 1996; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

A partir da análise do espectro de RMN ¹³C e do espectro DEPT 135° verificou-se a presença de oito carbonos quaternários com deslocamentos acima de 100 ppm, sendo sete destes aromáticos. Os sinais em 55,1 e 38,3 ppm confirmaram a presença dos grupamentos metoxila e NCH₃, respectivamente.

Considerando as informações encontradas, buscaram-se na literatura os dados espectroscópicos dos núcleos tazetina [5], licorenina [6], galantindol [9] e plicamina [10] os quais apresentam um nitrogênio ligado a uma metila. Dentre estes compostos, verificou-se que a molécula apresentou sinais correspondentes aos carbonos 11 e 12 do núcleo indólico da licorenina, porém não foram encontrados os sinais relativos aos carbonos 10b (CH) e 4a (CH) existentes neste tipo de alcalóide (BASTIDA *et al.*, 1990; ALMANZA *et al.*, 1996). Desta forma, sugeriu-se a presença de um segundo anel aromático semelhante ao encontrado no composto galantindol (ÜNVER *et al.*, 2003).

Apenas um sinal de carbono ligado a hidrogênio (CH) foi observado no espectro de RMN ¹³C na região de 100-115 ppm correspondente a somente um dos carbonos do anel aromático (C-7 ou C-10). Portanto, como não foi verificada a existência de grupamento metilenodioxi na molécula, os substituintes dos carbonos C-9 e C-8 podem ser distintos. Através dos dados obtidos do espectro de massas

(283 u.m.a) e dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (16 hidrogênios, 17 carbonos, OCH_3 , NCH_3 , CHO) verificou-se a diferença de 17 u.m.a que pode ser atribuída à presença de um grupamento hidroxila na molécula. De acordo com dados da literatura, este grupamento hidroxila encontra-se ligado ao C-9 do anel aromático (BASTIDA *et al.*, 1990).

Espectroscopia de Ressonância Magnética Homonuclear ^1H - ^1H (NOESY) e Heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC)

Os dados obtidos através dos espectros de correlação (Tabela I.6) comprovaram a presença do esqueleto indólico e possibilitaram a correta atribuição dos sinais relacionados com suas vizinhanças. Comparando os dados obtidos da literatura podemos inferir que a substância HB1 é um alcalóide inédito denominado breviflorina-A (Figura I.16).

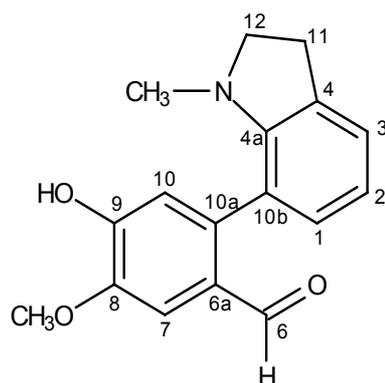


Figura I.16: Estrutura proposta para o composto HB1 (breviflorina-A).

Tabela I.6: RMN 1D e 2D (CD₃OD) para o composto HB1 comparados com a literatura:

H	RMN ¹ H (δ)	HMQC (δ)	HMBC	NOESY	Galantindol [8] ^a RMN ¹ H (HMQC)	Hipeastrina [29] ^b RMN ¹ H (HMQC)
1	6,85	130,3	C-3, C-4a, C-10a	CHO, H-3, H-10	6,93 (123,8)	4,58 (82,2)
2	6,73	118,7	C-1, C-3, C-4, C-4a, C-10b	H-1, H-3	7,09 (119,1)	4,38 (66,2)
3	7,10	124,0	C-1, C-4a, C-11	H-1, H-10, H-11	7,62 (120,6)	5,63 (119,4)
7	7,43	107,9	CHO, C-2, C-6a, C-8, C-9, C-10a	CHO, OCH ₃	7,04 (107,9)	7,45 (109,8)
10	6,74	117,8	CHO, C-6a, C-8, C-9, C-10b	H-1, OCH ₃ , NCH ₃	6,82 (110,9)	6,92 (108,5)
11	2,95	28,3	C-3, C-4a, C-10b, C-12	H-12 α , H-12 β , NCH ₃	6,52 (101,1)	2,48 (27,3)
12 α	3,32	56,9	C-4 ^a , C-10b, C-11	H-11, H-12 β , NCH ₃	6,95 (130,9)	3,13 (55,9)
12 β	3,15	56,9	C-4 ^a , C-10b, C-11	H-11, H-12 α , NCH ₃	-	2,23 (55,9)
OCH ₃	3,92	55,1	C-8, C-9	H-7, H-10, NCH ₃	-	-
NCH ₃	2,24	38,5	C-4a, C-11, C-12	H-10, H-11, H-12 α , H-12 β	3,29 (35,8)	2,03 (42,9)
CHO	9,45	190,9	C-6a, C-7, C-8	H-1, H-7, NCH ₃	-	-

^a em CDCl₃, 600 MHz (UNVER *et al.*, 2003).

^b em CDCl₃, 500 MHz (ALMANZA *et al.*, 1996).

I.4.4.2 Composto HB2

O composto HB2 apresentou-se como um semi-sólido amarelo solúvel em metanol. Não apresentou reação positiva para os reagentes de precipitação de alcalóides.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

O espectro realizado em metanol demonstrou a existência de bandas em 272 e 318 nm (Figura I.17). Devido à pequena quantidade de material, o composto HB2 não pôde ter sua estrutura elucidada.

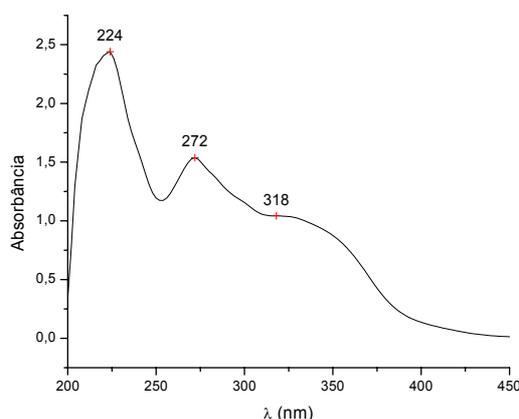


Figura I.17: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB2 em metanol.

I.4.4.3 Composto HB3

Este composto foi isolado na forma de um sólido cristalino branco insolúvel em clorofórmio e água e parcialmente solúvel em metanol. HB3 forneceu reação positiva para os reagentes de precipitação de alcalóides. A faixa de fusão encontrada foi de 254-256°C.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

O espectro realizado em metanol demonstrou a existência de bandas em 236 e 292 nm (Figura I.18). Estas bandas indicam a existência do grupamento

metilenodioxí associado a um anel aromático e de uma possível insaturação não conjugada a este sistema (GHOSAL *et al.*, 1985).

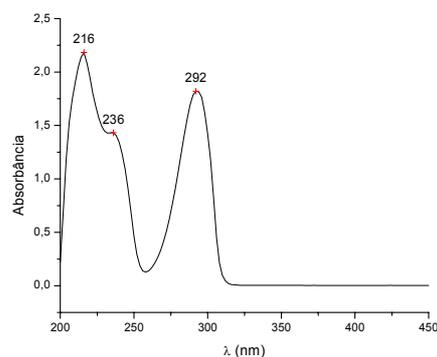


Figura I.18: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB3 em metanol.

Análise por CCD e CLAE

A substância HB3 quando analisada por CCD empregando sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10) com amostra do alcalóide licorina previamente isolada e identificada por HOFMANN JÚNIOR (2002) apresentou fator de retenção (R_f 0,41) idêntico ao deste composto e ao encontrado na literatura para o alcalóide licorina.

Realizou-se também co-injeção em CLAE de HB3 com a amostra do alcalóide em sistema eluente descrito no item I.3.7.3 para os extratos $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-B}$. Esta análise resultou em um único pico com tempo de retenção de 5,172 minutos.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O cromatograma apresentou algumas impurezas voláteis e uma substância majoritária. Verificou-se o pico do íon molecular em m/z 287 [M^+] (36%) e o pico do íon base à m/z 226. Outros sinais importantes foram m/z (%) 286 (21), 268 (26), 250 (51), 227 (73), 211 (11) (Anexo 3).

A partir da análise dos dados apresentados e comparação com dados da literatura (GHOSAL *et al.*, 1983; PHAM *et al.*, 1998; HOFMANN JÚNIOR, 2002) propôs-se para o produto HB3 a estrutura da licorina (Figura I.19).

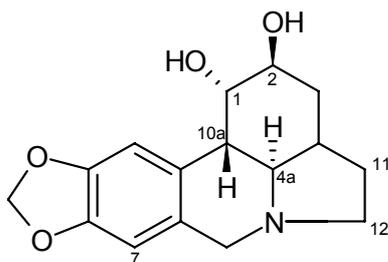


Figura I.19: Estrutura proposta para a substância HB3 (licorina).

I.4.4.4 Composto HB4

Esta substância apresentou-se como um sólido amorfo, de coloração amarelada e solúvel em metanol. Quando analisado frente aos reagentes de precipitação para alcalóides Mayer, Bertrand e Dragendorff observou-se a ocorrência de reação positiva.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

No espectro realizado em metanol podem-se observar máximos de absorção em 272 e 305 nm (Figura I.20).

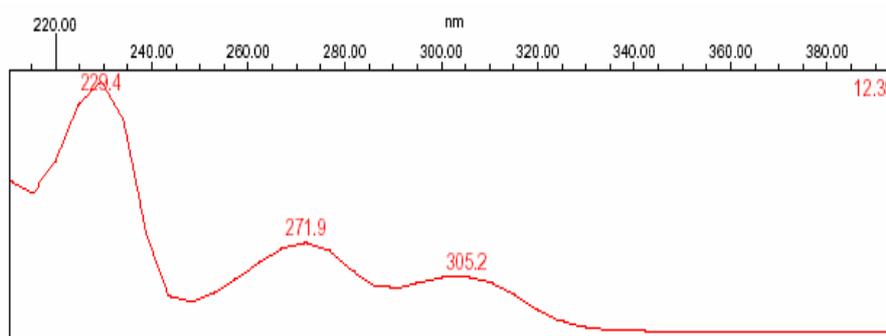


Figura I.20: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB4 em metanol.

Devido à pequena quantidade de material, o composto HB4 não pode ter sua estrutura elucidada.

I.4.4.5 Composto HB5

O composto HB5 apresentou-se como um semi-sólido amarelo, sendo totalmente solúvel em metanol. HB5 apresentou reação positiva frente aos reagentes de precipitação de alcalóides.

Os espectros referentes ao composto HB5 encontram-se no Anexo 4.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

No espectro realizado em metanol podem-se observar máximos de absorção em 240 nm e 280 nm (Figura I.21).

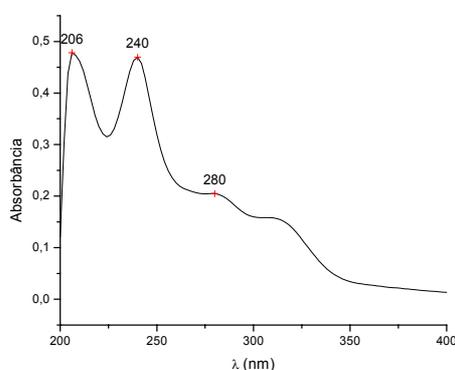


Figura I.21: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB5 em metanol.

Espectrometria de massas

Verificou-se o pico do íon molecular o qual também é o pico base em m/z 297 $[M^+]$. Outros sinais importantes foram m/z (%) 269 (79), 254 (42), 237 (22), 222 (22), 194 (18) e 69 (31). Observa-se a perda de 28 u.m.a (269 m/z) que pode ser devido à perda de um grupamento metoxila ou do grupamento aldeído existente na molécula.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN 1H)

O espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) para o composto HB5 apresentou-se muito similar ao espectro obtido para HB1. Pode-se observar 12 sinais que ao

serem integrados mostraram a presença de 19 hidrogênios. Os sinais observados no espectro são os seguintes (em ppm): 9,60 (1H; s; CHO), 7,45 (1H; s; H-7), 7,13 (1H; *dd*; $J = 1,0; 7,5$ Hz, H-3), 6,93 (1H; *d*; H-10), 6,89 (1H; *m*; H-1), 6,77 (1H; *m*; H-2), 3,91 (3H; s; OCH₃), 3,90 (3H; s; OCH₃), 3,30 (1H; *m*; H-12 α), 3,20 (1H; *m*; 12 β), 2,98 (2H; *m*; H-11), 2,22 (3H; s; NCH₃).

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono (RMN ¹³C)

Pode-se verificar a presença de 18 carbonos no espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) cujos deslocamentos são os seguintes (em ppm): 191,4 (Cq; CHO), 154,3 (Cq; C-9); 151,3 (Cq; C-4a), 149,2 (Cq, C-8), 140,3 (Cq, C-10a), 131,9 (Cq; C-10b), 130,5 (CH; C-1), 127,5 (Cq; C-6a), 124,3 (CH; C-3), 119,8 (Cq; C-4), 118,9 (CH; C-2), 113,4 (CH; C-10), 107,9 (CH; C-7); 56,9 (CH₂; C-12), 55,5 (CH₃; OCH₃), 55,3 (CH₃; OCH₃), 38,6 (CH₃; NCH₃), 28,3 (CH₂;C-11).

O sinal em 191,4 ppm mostrou a presença de um grupo aldeído na molécula assim como foi observado para o composto HB1.

Quando comparados os dados de RMN de ¹³C do produto HB5 aos obtidos para o composto HB1 estes revelaram ser semelhantes diferindo apenas na presença de um carbono na região de 55 ppm sendo este relacionado à presença de um grupamento metoxila adicional (55,5 e 55,3 ppm).

Foram observados dois sinais de carbono ligado a hidrogênio (CH) em 107,9 e 113,4 ppm correspondentes aos carbonos do anel aromático (C-7 ou C-10). Sendo assim, pode-se inferir que os substituintes ligados a estes carbonos são iguais, pois os deslocamentos apresentados foram semelhantes. Desta forma, como não se observaram os sinais relativos ao grupamento metilenodioxí, freqüentemente encontrado em alcalóides isolados de Amaryllidaceae, sugeriu-se que os substituintes dos carbonos C-9 e C-8 fossem duas metoxilas. As informações obtidas do espectro de massas (297 u.m.a) juntamente com os dados espectrais confirmam a presença de dois grupamentos metoxila na molécula.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Homonuclear ^1H - ^1H (COSY, NOESY) e Heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC)

Os dados obtidos através dos espectros de correlação (Tabela I.7) possibilitaram a correta atribuição dos sinais e a comprovação da estrutura proposta. Para os grupos metoxila não foi possível distinguir o perfil de correlações isoladamente devido à proximidade dos sinais nos espectros de RMN de ^1H (3,90 e 3,91 ppm) e RMN de ^{13}C (55,3 e 55,5 ppm).

Considerando-se os dados da literatura, a análise do perfil de fragmentação e os dados espectrais obtidos para HB5, propõe-se a estrutura apresentada na Figura I.22, sendo chamado de breviflorina-B.

Tabela I.7: RMN 1D e 2D (CD_3OD) para o composto HB5.

H	RMN ^1H (δ)	HMQC (δ)	^1H - ^1H COSY	HMBC	NOESY
1	6,89	130,5	H-3	C-3, C-4, C-4a, C-10a, C-10b	H-2, OCH_3 , NCH_3
2	6,77	118,9	H-1, H-3	C-1, C-3, C-4, C-10b	H-1, H-3
3	7,13	124,3	H-1, H-2	C-1, C-4a, C-10	H-2, H-11
7	7,45	107,9	OCH_3	CHO, C-6a, C-8, C-9, C-10a	CHO, OCH_3
10	6,93	113,4	OCH_3	CHO, C-2, C-6a, C-8, C-9, C-10a	OCH_3
11	2,98	28,3	H-12 α , H-12 β	C-4a, C-10b, C-12	H-12 α , H-12 β , NCH_3
12 α	3,30	56,9	H-11, H-12 β	C-4a, C-10b	H-11, H-12 β , NCH_3
12 β	3,20	56,9	H-11, H-12 α	C-4a, C-10b, NCH_3	H-11, H-12 α , NCH_3
OCH_3	3,91	55,5	H-7, H-10, NCH_3	C-8, C-9	H-7, H-10
OCH_3	3,90	55,3			
NCH_3	2,22	38,6	H-12 α , H-12 β	C-4a, C-12	CHO, H-11, H-12 α , H-12 β
CHO	9,60	191,4	-	C-6a, C-7, C-8	H-1, H-7, NCH_3

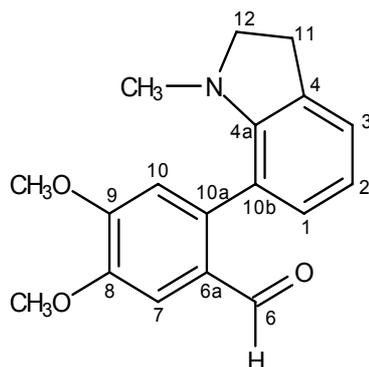


Figura I.22: Estrutura proposta para o composto HB5 (breviflorina-B).

I.4.4.6 Composto HB6

A substância HB6 foi obtida na forma de um semi-sólido amarelo, sendo totalmente solúvel em metanol. Este composto apresentou reação positiva frente aos reagentes de precipitação de alcalóides Mayer, Bertrand e Dragendorff.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

No espectro realizado em metanol observam-se máximos de absorção em 234 nm e 282 nm (Figura I.23).

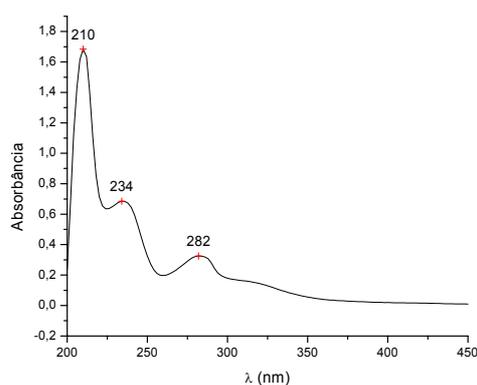


Figura I.23: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB6 em metanol.

Devido à pequena quantidade de material, o composto HB6 não pode ter sua estrutura elucidada.

I.4.4.7 Composto HB7

O composto HB7 apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela escura, sendo totalmente solúvel em metanol e clorofórmio. A faixa de fusão, determinada em triplicata, foi de 78-80°C.

Os espectros relacionados ao composto HB7 encontram-se no Anexo 5.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

O espectro obtido em solução metanólica apresentou bandas em 244, 300 e 330 nm (Figura I.24). O espectro é característico de compostos carboxilados α,β -insaturados apresentando bandas entre 195-250 nm e 310-330 nm (PAVIA *et al.*, 1996; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

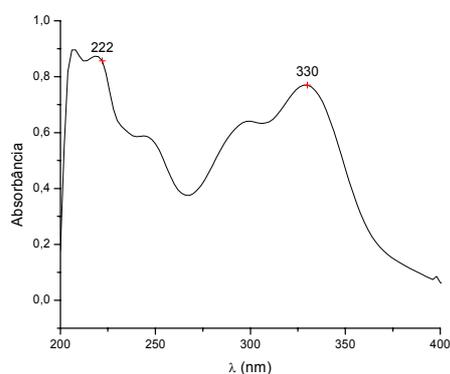


Figura I.24: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB7 em metanol.

Espectrometria de massas

Para realização do espectro de massas empregou-se modo scan negativo. Verificou-se o pico do íon molecular em m/z 207 [M^+] (100%). Outros sinais importantes foram m/z (%) 179 (27), 161 (66), 133 (70), 108 (08).

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN ¹H)

Os deslocamentos observados para o composto HB7 no espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO, ppm) foram: 1,22 (3H, *t*, CH₃); 4,22 (2H, *q*, CH₂); 6,23 (1H, *d*, *J*=15,9 Hz, H-8); 6,75 (1H, *d*, *J*=8,1 Hz, H-5); 6,97 (1H, *d*, *J*=8,1 Hz, H-6); 7,04 (1H, *s*, H-2); 7,45 (1H, *d*, *J*=15,9 Hz, H-7).

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono (RMN ¹³C)

A partir do espectro de RMN ¹³C verifica-se a presença de 11 átomos de carbono. Os deslocamentos (400 MHz, DMSO, ppm) observados para o composto HB7 foram: 14,2 (CH₃, C-11); 59,6 (CH₂, C-10); 114,1 (CH, C-5); 114,7 (CH, C-2); 115,8 (CH, C-8); 121,3 (CH, C-6); 125,5 (CH, C-1); 144,9 (Cq, C-3); 145,6 (CH, C-7); 148,4 (Cq, C-4); 166,5 (Cq, C-9). Os valores de deslocamentos dos carbonos C-8, C-5 e C-2 podem estar trocados devido à proximidade dos sinais e ausência de espectros de correlações.

Através da análise dos dados espectroscópicos pode-se inferir que a substância HB7 trata-se do composto etil-3,4-diidrox*-trans*-cinamato, um derivado do ácido caféico também conhecido como etilcafeato (Figura I.25).

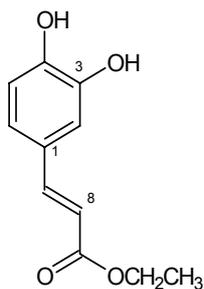


Figura I.25: Estrutura proposta para o composto HB7 (etilcafeato).

I.4.4.8 Composto HB8

O composto HB8 foi obtido na forma de um semi-sólido de coloração marrom, sendo totalmente solúvel em metanol e clorofórmio.

Os espectros relacionados ao composto HB8 encontram-se no Anexo 6.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

O espectro obtido em solução metanólica apresentou bandas em 222 e 284 nm (Figura I.26). A banda em 284 nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) é característica de derivados do benzeno cujo cromóforo principal é Ar-CHO (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

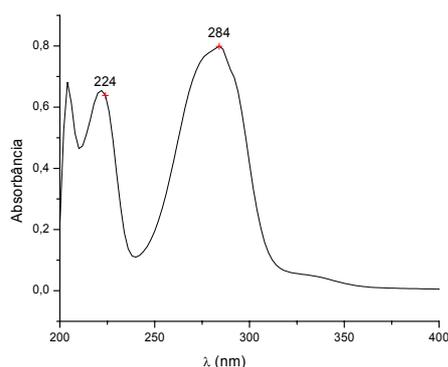


Figura I.26: Espectro na região do ultravioleta obtido para o composto HB8 em metanol.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN ¹H)

Os deslocamentos observados para o composto HB8 foram (400 MHz, DMSO, ppm): 7,72 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-3 e H-5); 6,90 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-2 e H-6); 9,75 (1H, *s*, CHO).

Os sinais obtidos do espectro de RMN ¹H indicam a presença de um anel aromático *p*-substituído e de um grupo ácido carboxílico ou aldeído, sendo que o primeiro pode ser excluído por ocorrer em regiões de campo mais baixo que o observado no espectro (PAVIA *et al.*, 1996).

Como se trata de um anel benzênico *p*-disubstituído do tipo AA'BB', as constantes de acoplamento J_{AB} e $J_{A'B'}$ são iguais (8,5 Hz) e correspondem ao acoplamento em *orto* entre os hidrogênios do anel aromático (PAVIA *et al.*, 1996; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Os hidrogênios em posição *orto* ao aldeído encontram-se ligeiramente deslocados para campo mais baixo devido ao efeito de desblindagem adicional do grupamento carbonila (7,72 ppm) enquanto que os hidrogênios em posição *orto* ao grupamento hidroxila estão mais blindados (6,90 ppm) devido ao efeito doador de elétrons deste grupamento nesta posição. Estes valores foram confirmados através dos valores teóricos para os deslocamentos dos átomos de hidrogênio calculados a partir de método previamente descrito (PAVIA *et al.*, 1996).

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono (RMN ¹³C)

Os deslocamentos observados no espectro (100 MHz, DMSO, ppm) foram: 115,9 (CH, C-2 e C-6); 128,0 (Cq, C-4); 132,1 (CH, C-3 e C-5); 164,1 (Cq, C-1); 190,8 (Cq, CHO). Observou-se que os sinais em 115,9 e 132,1 ppm correspondiam a dois átomos de carbono.

Para a correta atribuição dos sinais obtidos pelo espectro de RMN ¹³C calcularam-se os valores teóricos para os deslocamentos dos átomos de carbono do composto HB8 a partir de método previamente descrito para benzenos polissubstituídos (PAVIA *et al.*, 1996; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Os valores encontrados foram: 116,4 (C-2 e C-6); 129,4 (C-4); 131,3 (C-3 e C-5); 160,9 (C-1). Como os valores calculados são bem próximos dos valores encontrados no espectro, a atribuição dos sinais foi realizada a partir destes. Considerando os resultados espectrais obtidos para HB8, propõe-se para o produto a estrutura do *p*-hidroxibenzaldeído (Figura I.27)

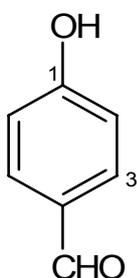


Figura I.27: Estrutura proposta para o composto HB8 (*p*-hidroxibenzaldeído).

I.4.4.9 Compostos HB9 e HB10

Os compostos HB9 e HB10 apresentaram-se como sólidos amorfos de coloração amarelada, sendo totalmente solúveis em metanol. A faixa de fusão, determinado em triplicada para cada um dos compostos, foi de 314-316°C e 192-194°C, respectivamente.

Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

Através da análise por espectroscopia na região do ultravioleta (UV) em solução metanólica, HB9 apresentou máximos de absorção em 256 e 372 nm característicos de flavonóis com a hidroxila da posição 3 livre. O espectro de HB10 em solução metanólica apresentou máximos em 256 e 356 nm indicando ser um flavonol com a hidroxila da posição 3 substituída (Figura I.28) (MABRY *et. al.*, 1970).

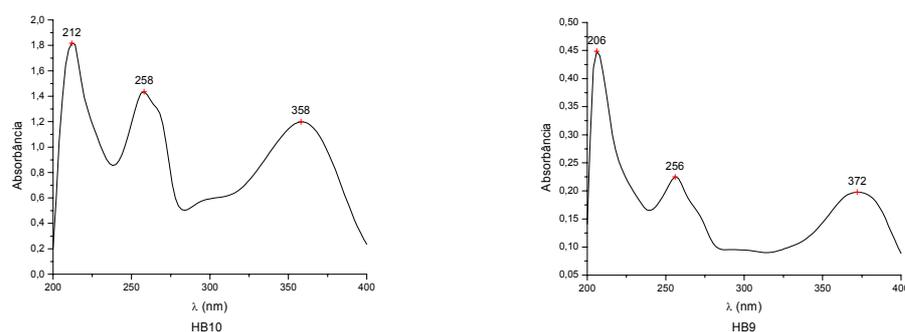


Figura I.28: Espectros na região do ultravioleta para os compostos HB9 e HB10 em metanol.

Análise por CCD e CLAE

Os compostos foram analisados por CCD com amostras autênticas dos flavonóides rutina e quercetina. HB9 e HB10. Apresentaram fatores de retenção idênticos a estes flavonóis, respectivamente. Estes valores de *R_f* também estão de acordo com encontrados na literatura para estas substâncias (WAGNER & BLADT, 1996).

Assim, através da coinjeção com substâncias de referência em CLAE empregando o sistema eluente descrito no item I.3.7.3. para os extratos CH₂Cl₂-B,

da análise dos fatores de retenção em CCD e da comparação dos máximos de absorção e das faixas de fusão destes compostos com a literatura (MABRY *et. al.*, 1970) pode-se inferir que HB9 e HB10 são os flavonóis quercetina e rutina, respectivamente (Figura I.29).

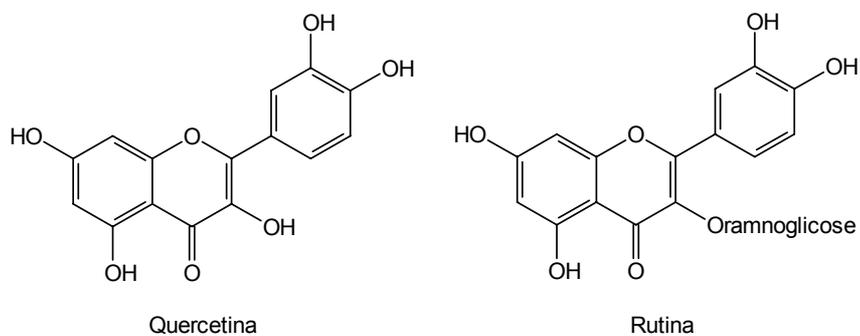


Figura I.29: Estrutura proposta para os compostos HB9 (quercetina) e HB10 (rutina).

CAPÍTULO II
Avaliações Biológicas

As publicações utilizadas no embasamento desta revisão bibliográfica foram localizadas através das seguintes bases de dados: BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE-BIREME, HIGHWIRE LIBRARY OF SCIENCE AND MEDICINE, MEDLINE (1966/2005), SCIENCE DIRECT (1950/2005), SCIRUS FOR SCIENTIFIC INFORMATION, THIEME-CONNECT (1999/2005), WEB OF SCIENCE/CAPES (1945/2005). Nestas bases não foram encontradas referências de trabalhos biológicos para *Hippeastrum breviflorum*.

II.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS

II.1.1 Usos populares de espécies de Amaryllidaceae

São diversos os usos populares atribuídos às plantas da família Amaryllidaceae sendo estes relatados desde a Antiguidade como, por exemplo, o uso de *Narcissus poeticus* pelo médico grego Hipócrates no tratamento de tumores uterinos (PETTIT *et al.*, 1986).

O vegetal *Narcissus tazetta*, que contém licorina, pseudolicorina e tazetina em seus bulbos, é citado na medicina tradicional chinesa e utilizado em picadas de insetos, carbúnculos e furúnculos (HSU *et al.*, 1999). Também há relatos do uso deste vegetal e de outras espécies pertencentes a este gênero no tratamento de tumores (HARTWELL, 1967).

O gênero *Crinum* apresenta grande número de aplicações na medicina popular principalmente em países africanos. Dentre os usos relatados, podem-se destacar seu emprego como analgésico (ELLIOTT & BRIMACOMBE, 1987), antimalárico (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; FENNEL & STADEN, 2001), antiespasmódico (OKPO & ADEYEME, 1998) no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, como antitumoral, antiinflamatório e contra o reumatismo (LOUW *et al.*, 2002). Os bulbos de *C. giganteum* são usados *in natura* na Nigéria contra picadas de cobras, no tratamento da tosse crônica e da asma, enquanto que o decocto é empregado no combate de doenças do trato urinário e como vermífugo (AMOS *et al.*, 2003). Na Índia, o suco das folhas de *C. bulbispermum* é usado no alívio de dores de ouvido (RATNASOORIYA *et al.*, 2005).

Espécies pertencentes ao gênero *Cyrtanthus* são amplamente empregadas na medicina popular africana para o tratamento de doenças como cistite, tosse crônica, lepra e dores de cabeça. O gênero *Gethyllis*, encontrado principalmente no sul da África, também é utilizado como remédio contra cólicas, flatulência e indigestão. Os frutos são usados na forma de infusão alcoólica ou decoção para o tratamento de desordens estomacais enquanto que o decocto das flores é empregado para dor de dente (ELGORASHI & VAN STADEN, 2004).

Os bulbos de *Boophane disticha* são usados sobre diversos tipos de lesões causadas por circuncisão, queimaduras e eczema além de serem usadas como alucinógenos e veneno de flechas em algumas regiões da África. Esta espécie é cultivada próxima às moradias para afastar espíritos maus, trazer boa sorte e chuva (KOORBANALLY *et al.*, 2000; DU PLOOY *et al.*, 2001, LOUW *et al.*, 2002; BOTHA *et al.*, 2005).

A espécie *Pancratium trianthum* é conhecida popularmente em Botswana (África) como “kwashi”. Os bulbos deste vegetal são esfregados sobre incisões feitas na cabeça para causar alucinações visuais (DE SMET, 1998).

Na medicina tradicional da Turquia, *Galanthus nivalis* é usado devido às suas propriedades cardiotônicas, emenagogas e estomacais (KAYA *et al.*, 2004).

No Brasil, o suco obtido dos bulbos de algumas espécies de *Hippeastrum* é utilizado popularmente como excitante, purgativo, emético e contra doenças respiratórias (CORRÊA, 1984; LORENZI & MATOS, 2002).

II.1.2 Atividades biológicas relatadas

O interesse crescente envolvendo os alcalóides de Amaryllidaceae deve-se ao amplo espectro de atividades biológicas apresentadas para esta classe de compostos como atividade antimalárica (SENER *et al.*, 2003), antibacteriana (TRAM *et al.*, 2002; ELGORASHI & VAN STADEN, 2004), antiviral, antifúngica (GHOSAL *et al.*, 1985; SENNER *et al.*, 1998), ação citotóxica, antitumoral e antineoplásica (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; WENIGER *et al.*, 1995), atividade

imunoestimulante (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993), hipotensiva (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2000), antiplaquetária (SENER *et al.*, 1998) e diversas atividades sobre o sistema nervoso central, atuando como analgésicos (OKPO *et al.*, 2001), anticolinesterásicos (HARVEY, 1995) e sedativos (AMOS *et al.*, 2003) além de apresentarem atividade inseticida (SENER *et al.*, 1998; ABOU-DONIA *et al.*, 2002).

II.1.2.1 Atividade antiviral

O extrato dos bulbos de *Haemanthus albiflos* mostrou-se ativo principalmente contra vírus do tipo RNA ocasionando uma redução da síntese protéica e de ácidos nucléicos (HUSSON *et al.*, 1995). Um estudo realizado por HUSSON e colaboradores (1991) demonstrou que o extrato das folhas de *Haemanthus albiflos* possui atividade virostática sobre o vírus da poliometite tipo I, da estomatite vesiculosa tipo 11 (VSV) e rotavírus (SA 11), todos com genoma RNA. Este extrato também mostrou uma atividade virucida sobre os vírus herpes simples tipo 1 (HSV).

As espécies da família Amaryllidaceae têm provido diversos alcalóides com promissora atividade antiviral. Dentre estes, licorina, um dos principais alcalóides presentes em Amaryllidaceae, exerce efeito antiviral em vários vírus RNA e DNA por bloquear a síntese de proteínas virais (IEVEN *et al.*, 1983).

Licorina e haemantamina apresentaram moderada inibição da replicação do vírus HIV-1 *in vitro* (SZLAVIK *et al.*, 2004) assim como o alcalóide litoralina (LIN *et al.*, 1995).

RENARD-NOZAKI e colaboradores (1989) testaram a atividade antiviral de 36 alcalóides isolados de plantas da família Amaryllidaceae. Dentre estes compostos, pretazetina, hipeastrina, pseudolicorina e cloridrato de licorina mostraram ter atividade virostática marcante sobre o vírus herpes simples, sendo que o último também foi ativo contra o vírus da poliometite tipo 1 (IEVEN *et al.*, 1982; IEVEN *et al.*, 1983).

Pancreatistatina mostrou-se ativa em culturas celulares contra vários tipos de vírus, incluindo os pertencentes à família Flaviviridae (RNA) como o da encefalite japonesa, da febre amarela e da dengue (PETTIT *et al.*, 1995; KHAN *et al.*, 1999).

Pretazetina também mostrou atividade antiviral em ratos, suprimindo a replicação viral e inibindo a síntese protéica (FURUSAWA *et al.*, 1980; MARTIN, 1987). Este alcalóide também apresentou atividade contra diversos vírus oncogênicos como o da leucemia Rauscher murina (SZLAVIK *et al.*, 2004).

Um grande interesse tem sido demonstrado nas lectinas isoladas de espécies de Amaryllidaceae. Alguns destes compostos inibem a infecção de células pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2) (FENNEL *et al.*, 2001; VERMANI & GARG, 2002).

II.1.2.2 Atividades citotóxica e antitumoral

Diversos trabalhos – motivados principalmente pelo extenso uso popular destes vegetais contra o câncer – têm sido realizados visando estudar o potencial antitumoral das espécies desta família e conseqüentemente dos alcalóides obtidos a partir destas.

Alguns alcalóides deste grupo são de particular interesse, como pancreatistatina [62] e narciclasina [3] (Figura II.1), os quais são potenciais candidatos para o desenvolvimento de fármacos devido à atividade contra câncer de ovário e leucemia linfocítica (PETTIT *et al.*, 1993; HOHMANN *et al.*, 2002; PETTIT *et al.*, 2003; RINNER *et al.*, 2004). Estudos mais recentes de atividade citotóxica realizados pelo NCI (U. S. National Cancer Institute) apontam o alcalóide pancreatistatina como o mais potente do grupo (MUTSUGA *et al.*, 2002).

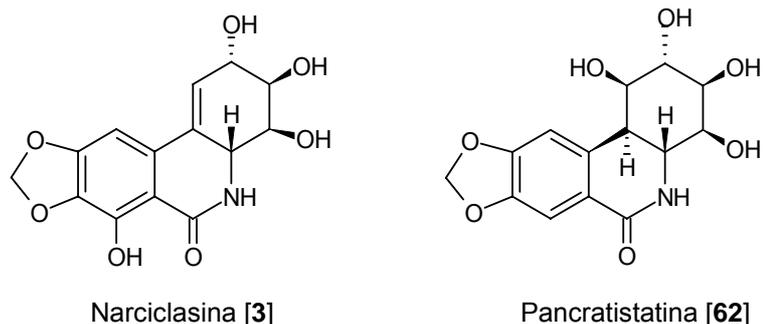


Figura II.1: Estrutura dos alcalóides narciclasina e pancratistatina.

O alcalóide pretazetina tem propriedades antileucêmicas e significativa atividade antitumoral. Assim como a narciclasina, a pretazetina inibe o crescimento de células HeLa e exibe atividade terapêutica na leucemia Rauscher murina. Outros estudos mostraram sua ação contra carcinoma pulmonar e leucemia linfocítica (FENNEL *et al.*, 2001).

Licorina, o principal alcalóide do grupo, apresenta atividade citotóxica contra uma grande variedade de linhagens de células tumorais (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; WENIGER *et al.*, 1995). Este alcalóide mostrou-se ativo contra células de melanoma do tipo BL-6 assim como os compostos crinamina e 6-hidroxicrinamina (TRAM *et al.*, 2002).

Muitas vezes, a pequena atividade *in vivo* destes compostos pode aumentar com a quaternização da molécula como na ungeremina [45], também chamada de licobetaína, produzida semi-sinteticamente por oxidação da licorina. Estudos demonstram que esta molécula inibe *in vitro* o crescimento de diversas linhagens de células cancerígenas e, quando testada *in vivo*, apresentou resultados significativos no tratamento de carcinoma ovariano e gástrico (BARTHELMES *et al.*, 2001; BRUNETON, 2001; KUO & KING, 2001). Ungeremina também demonstrou ter ação antitumoral *in vitro* contra vários tipos de câncer, sendo que sua porção betaína e o grupamento metilenodioxo são essenciais para sua atividade (TANG *et al.*, 2003).

II.1.2.3 Atividade antimalárica

Acredita-se que os alcalóides de Amaryllidaceae possam ser vistos como uma potencial fonte para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 1993).

Extratos de *Pamianthe peruviana* e *Crinum amabile* (Amaryllidaceae), por apresentarem relatos de uso popular contra malária, foram testados para esta atividade mostrando inibição do crescimento de cepas de *Plasmodium* resistentes e sensíveis à cloroquina. Estes extratos também foram ativos frente a protozoários do gênero *Trypanosoma* (ALI *et al.*, 2002).

A atividade antimalárica de alguns alcalóides isolados de plantas pertencentes a esta família foi testada contra cepas de *P. falciparum*. Dentre os alcalóides testados, crinamina e augustina, encontrados em *Crinum amabile*, demonstraram moderada atividade antimalárica tanto para as cepas resistentes como para as sensíveis à cloroquina, assim como licorina e seu éster diacetato (1,2-di-O-acetilicorina) isolados de *Brunsvigia littoralis* (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; CAMPBELL *et al.*, 1998).

Crinamina encontra-se amplamente distribuída em diversas espécies desta família como em *Crinum bulbispermum*, *C. firmifolium*, *Brunsvigia orientalis*, *B. radulosa*. Apesar de não haver relatos do uso popular destes vegetais no tratamento da malária, pode-se esperar que estes tenham esta atividade devido à presença deste alcalóide (RAZAFIMBELO *et al.*, 1996, VILADOMAT *et al.*, 1996; ELGORASHI *et al.*, 1999).

Em estudo realizado por SENER e colaboradores (2003), dentre os alcalóides de Amaryllidaceae testados frente a uma cepa cloroquina-resistente, licorina, haemantamina e 6-hidroxihaemantamina apresentaram valores de IC₅₀ de 0,38; 0,43 e 0,35 µg/ml, respectivamente. Neste ensaio, os valores obtidos para os padrões foram de 3,94 µg/ml para mefloquina e 6,06 µg/ml para cloroquina. Galantamina e tazetina apresentaram atividade inibitória do crescimento do protozoário bem menos expressiva (15,93 e 5,08 µg/ml, respectivamente). As diferenças encontradas nos

valores de IC₅₀ dos alcalóides podem ser atribuídas à diferença estrutural existente entre eles. Com exceção da galantamina e da tazetina, nenhum outro alcalóide possui nitrogênio metilado em sua estrutura. Entretanto, os demais apresentam grupamento metilenodioxo ligado ao anel benzênico da molécula. Os resultados deste estudo sugerem que a presença do grupamento metilenodioxo bem como a ausência de metilação no nitrogênio da molécula aumentam o potencial para atividade antimalárica destes compostos.

A partir de estudos com a espécie *Brunsvigia radulosa*, foram isolados e testados vários alcalóides ativos contra cepas de *P. falciparum* resistente (FAC8) e sensível (D10) à cloroquina. Dentre os compostos, licorina apresentou a maior atividade para ambas as cepas testadas (CAMPBELL *et al.*, 2000).

II.1.2.4 Atividade anticolinesterásica

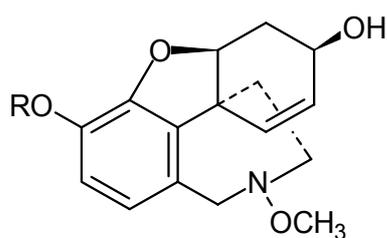
Durante anos a espécie *Galanthus nivalis* foi usada na medicina popular da Bulgária e da Turquia para o tratamento de doenças neurológicas (HOWES *et al.*, 2003). Desde a década de 50, na Europa Ocidental e na antiga União Soviética, decoctos dos bulbos de algumas espécies de *Galanthus* eram usados internamente para reverter bloqueio neuromuscular e para o tratamento de paralisias ocasionadas por poliomielite e miastenia grave (EVANS, 2002; HEINRICH & TEOH, 2004).

Os primeiros trabalhos envolvendo a galantamina [4], a substância responsável pelo efeito farmacológico destas espécies, tiveram início em 1951. A partir de 1958, a galantamina estava disponível no mercado na forma injetável para o tratamento da poliomielite, sob o nome de Nivalin (HEINRICH & TEOH, 2004).

A galantamina [4] é um alcalóide encontrado em *Galanthus nivalis* e em outras espécies de Amaryllidaceae como *Lycoris spp.*, *Galanthus woronowi*, *Narcissus spp.* Este fármaco possui atividade anticolinesterásica sendo empregado atualmente no tratamento do Mal de Alzheimer com grandes vantagens sobre outros medicamentos da mesma classe (HARVEY, 1995; HOWES *et al.*, 2003).

Comercialmente, como sua síntese não é economicamente viável, este fármaco é obtido de *Leucojum aestivum* com rendimentos entre 0,1% a 2% do peso seco. Entretanto, um rendimento em torno de 7,4% foi obtido de *Phaedranassa negistrophylla* outra espécie de Amaryllidaceae (HARVEY, 1995; EICHHORN *et al.*, 1998). Diversos cultivares obtidos a partir do gênero *Narcissus* têm sido testados para a produção deste alcalóide. Estes testes mostraram que o tamanho dos bulbos, a remoção dos brotos, a profundidade dos vegetais no solo e a densidade de plantas por m² não alteram o conteúdo de galantamina (MORAES-CERDEIRA *et al.*, 1997).

Estudos demonstraram que a atividade anticolinesterásica está intimamente relacionada com a presença dos núcleos galantamina ou licorina na molécula. Exemplo disso é o alcalóide sanguinina (9-O-desmetilgalantamina) [63] (Figura II.2) isolado de *Eucharis grandiflora*, o qual mostrou-se dez vezes mais potente que a própria galantamina em ensaios *in vitro* (LÓPEZ *et al.*, 2002; VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2004). A adição de grupamentos hidrofílicos na molécula da galantamina contribui para uma efetiva ligação desta à enzima, o que justifica a intensa atividade inibitória atribuída a sanguinina (LÓPEZ *et al.*, 2002). Derivados da sanguinina sob a forma de pró-farmaco foram testados apresentando maior seletividade para inibição da acetilcolinesterase vs. butirilcolinesterase e maior índice terapêutico que galantamina (BORES *et al.*, 1996).



Galantamina [4] R=CH₃

Sanguinina [63] R=H

Figura II.2: Estrutura dos alcalóides galantamina e sanguinina.

Assoanina, oxoassoanina e licorina foram os alcalóides mais potentes dentre os testados que apresentam núcleo do tipo licorina (LÓPEZ *et al.*, 2002; ORHAN & SENER, 2003)

II.1.2.5 Outras atividades

Em estudo realizado por OKPO e colaboradores (2001), o extrato aquoso de *Crinum glaucum* apresentou atividades analgésica e antiinflamatória promissoras que podem estar relacionadas à presença de alcalóides. A atividade analgésica exibida por estes compostos é atribuída à presença de esqueletos de morfina e codeína em suas estruturas, sendo os alcalóides narvedina e vitatina capazes de potencializar o efeito analgésico da morfina (GHOSAL *et al.*, 1985). O extrato de *C. glaucum* também apresentou atividade antiespasmódica que corrobora seu uso na medicina popular (OKPO & ADEYEMI, 1998).

O extrato aquoso do vegetal *Crinum giganteum* apresentou efeito inibitório do sistema nervoso central em roedores sugerindo seu potencial uso como neurosedativo no combate a estados de ansiedade (AMOS *et al.*, 2003).

Extratos de folhas, bulbos e raízes de vegetais pertencentes aos gêneros *Gethyllis* e *Cyrtanthus* apresentaram ação inibidora da COX-1 e COX-2 (antiinflamatória) assim como atividade bacteriostática. Extratos de *C. falcatus* e *C. suaveolens* demonstraram poder mutagênico, o que indica que estes vegetais devem ser usados com cautela na medicina popular (ELGORASHI & VAN STADEN, 2004).

Licorina, o alcalóide mais estudado deste grupo, apresenta diversas atividades biológicas entre elas inibição específica da biossíntese de ácido ascórbico em plantas, inibição da divisão celular em plantas, algas e leveduras (LISO *et al.*, 1984), inibição da síntese de DNA e da síntese protéica em células tumorais *in vitro* (KUKHANOVA *et al.*, 1983; GHOSAL *et al.*, 1985). Atividades semelhantes também foram reportadas para diidroligorina, pseudoligorina, haemantamina, pretazetina e narciclasina (GHOSAL *et al.*, 1985). Licorina também apresentou ação analgésica maior que o próprio ácido acetilsalicílico (FENNEL *et al.*, 2001).

Crinamina exibiu importante atividade antibacteriana enquanto que outros alcalóides como licorina, hamaína e 6-hidroxicrinamina mostraram-se inativas (TRAM *et al.*, 2002).

Um alcalóide obtido de *Boophane disticha*, denominado bufanina, possui ação similar a escopolamina, exibindo midríase, inibição da secreção salivar e paralisia das terminações nervosas do coração conduzindo à morte por falência respiratória (BOTHA *et al.*, 2005).

O flavonóide 7,4'-diidroxí-8-metilflavana encontrado nos bulbos de *Narcissus pseudonarcissus* e em *Pancratium littorale* demonstrou ser um agente antioxidante equipotente ao BHT (butilidroxitolueno), porém menos ativo que a quercetina (IOSET *et al.*, 2001)

II.1.2.6 Toxicidade

Os vegetais da família Amaryllidaceae têm se tornado foco de diversos estudos farmacológicos os quais revelaram que, enquanto algumas espécies podem ser usadas na terapia, outras plantas são altamente tóxicas. Efeitos adversos como sedação, alucinações, comportamento irracional e mais seriamente, coma e morte já foram relatados (BOTHA *et al.*, 2005).

Os bulbos das espécies desta família podem ser confundidos com os existentes em outras espécies comestíveis como da cebola (Liliaceae) e com isso causarem intoxicações. A ingestão destes induz rapidamente a náusea, vômito e intensa diarreia. Em 1999, no Reino Unido, foi relatado pelo menos um caso de morte pela ingestão destes bulbos confundidos com cebolas (EVANS, 2002). Algumas espécies de *Narcissus* também podem causar reações alérgicas cutâneas (BRUNETON, 2001).

Preparações contendo bulbos de *Boophane disticha* causam sedação, analgesia, alucinações visuais, inconsciência, alterações de comportamento e coma, sendo estes efeitos dependentes da dose utilizada pelo indivíduo (DU PLOOY *et al.*, 2001).

A natureza tóxica de diversas plantas desta família se deve, na maioria das vezes, à presença de licorina como componente majoritário que, em pequenas

doses, possui efeito emético e conduz à diarreia e, em doses maiores, paralisia e colapso generalizado (COOK & LOUDON, 1952; BRUNETON, 2001).

II.2 MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1 Determinação da atividade anticolinesterásica

Tendo em vista o grande potencial destes vegetais no descobrimento de novos agentes inibidores da acetilcolinesterase, os compostos isolados, os extratos éter, CH₂Cl₂-A e CH₂Cl₂-B de todas as partes do vegetal (VERMELHO), bem como as 18 microfrações obtidas a partir do extrato CH₂Cl₂-B de bulbos (VERMELHO) foram testadas quanto à atividade anticolinesterásica através do método descrito por MARSTON e colaboradores (2002).

Este teste bioautográfico baseia-se na clivagem do acetato de 1-naftila pela acetilcolinesterase para formar 1-naftol que, por sua vez, reage com o sal "fast blue B" resultando na coloração púrpura do diazônio (Figura II.3). A placa de CCD permanece coberta por uma coloração púrpura e a inibição da enzima resulta em manchas incolores.

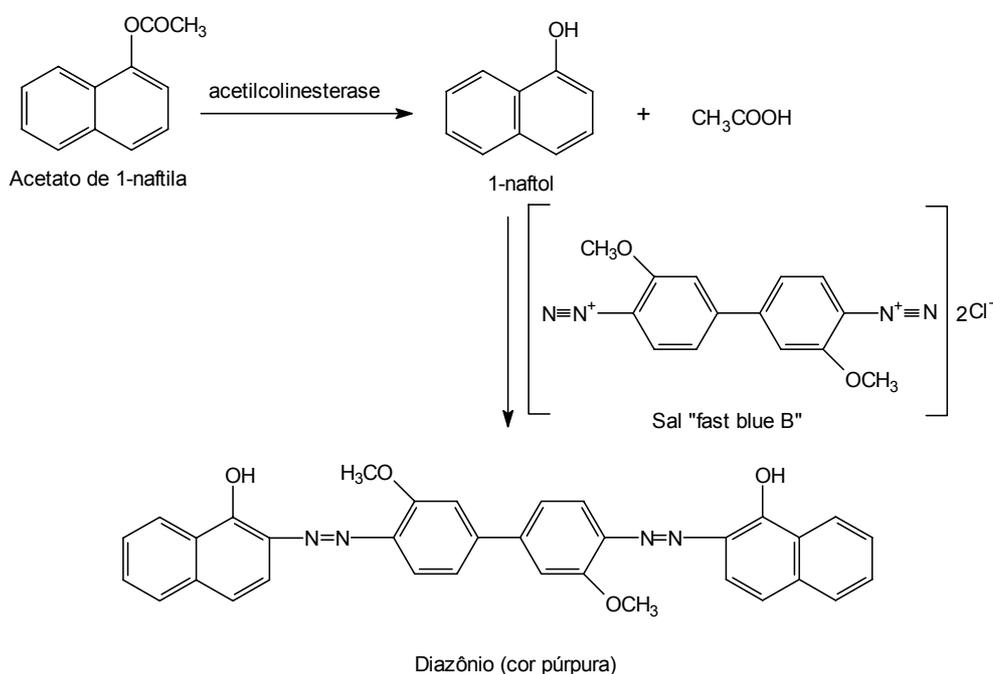


Figura II.3: Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e a formação subsequente da coloração púrpura na cromatografia em camada delgada.

A enzima acetilcolinesterase (1000 U) foi dissolvida em 150 ml de tampão Tris-HCl 0,05M em pH 7,8 seguida da adição de albumina de soro bovino (150 mg) para estabilizar a enzima. Esta solução foi mantida à temperatura de 4°C.

Neste ensaio, foram aplicados sobre cromatoplaça de gel de sílica Merk F₂₅₄ o volume correspondente a 10 e 20 µg para os produtos isolados e 10 µg para o extrato CH₂Cl₂-B de bulbos em concentração de 1 mg/ml eluído em sistema CH₂Cl₂/MeOH (95/5).

O extrato CH₂Cl₂-B de bulbos foi microfracionado, através da coleta de picos a 0,7 ml/min após injeção em CLAE/UV-DAD seguindo metodologia descrita no item I.3.6 para este extrato. Cada fração foi concentrada sob pressão reduzida, ressuspensa em 10 µl de metanol, os quais foram aplicados sobre a cromatoplaça. Utilizou-se como padrão o alcalóide galantamina em concentração de 1 mg/ml e volume de aplicação 10 e 20 µl.

As placas cromatográficas foram nebulizadas com a solução contendo a enzima acetilcolinesterase e incubadas à temperatura de 37°C estando suspensas em um recipiente de plástico contendo uma camada de água no fundo.

Preparou-se uma solução de acetato de 1-naftil (250 mg) em etanol (100 ml) e uma solução do sal "fast blue B" (400 mg) em água destilada (160 ml). Após 20 minutos de incubação das placas, estas são retiradas e reveladas com uma mistura constituída de 10 ml da solução de acetato de 1-naftil e 40 ml de uma solução do sal "fast blue B". Verifica-se a atividade anticolinesterásica através da presença de manchas brancas sobre um fundo púrpura 2 à 3 minutos após a revelação das placas.

II.2.2 Determinação da atividade antioxidante

Os compostos isolados HB1, HB2, HB5, HB6, HB7, HB8, HB9 e HB10 (obtidos conforme item I.3.7) foram avaliados quanto à atividade antioxidante frente à 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

A análise dos produtos isolados foi realizada empregando-se 10 µl de uma solução 1 mg/ml sobre cromatoplaça de gel de sílica Merk F₂₅₄.

Após secagem, a placa foi revelada com uma solução metanólica de DPPH a 0,2%. A atividade antioxidante pode ser observada pela presença de manchas amarelas contra a coloração púrpura de fundo (CAVIN *et al.*, 1998).

II.2.3 Avaliação da atividade antiviral

II.2.3.1 Preparo das soluções teste

Os extratos mole, éter de petróleo, CH₂Cl₂-A e CH₂Cl₂-B das diferentes partes do vegetal (VERMELHO) foram preparados a uma concentração de 40 mg/ml em água bidestilada estéril e dimetilsulfóxido (DMSO).

Os produtos HB7 e HB8 foram solubilizados em DMSO e água bidestilada estéril nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 µg/ml. Devido à ausência de dados de citotoxicidade e de atividade antiviral dos compostos HB7 e HB8 em culturas de células VERO, estes produtos foram testados em uma ampla faixa de concentração com base em trabalhos anteriores envolvendo o ácido caféico (VAN DEN BERGUE *et al.*, 1986; CHIANG *et al.*, 2002). A concentração máxima de DMSO empregada foi de 10 µl/ml.

II.2.3.2 Cultura celular

Utilizaram-se células VERO, culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) linhagem ATCC CCL-81, cultivadas em meio de cultura mínimo essencial de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino suplementado com o antimicrobiano enrofloxacino (10 mg/l de MEM) e o antifúngico anfotericina B (2 mg/l de MEM).

II.2.3.3 Preparo das placas de microtitulação

Após tripsinização da cultura de células, cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² e contagem em câmara de Fuchs Rosental, foi preparada uma suspensão celular com aproximadamente 400.000 células/ml. Foram colocados 100 µl desta suspensão em cada poço da placa de 96 poços, ou seja, aproximadamente 40.000 células por poço. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e atmosfera úmida por 24 horas. Para todos os ensaios os poços das bordas das placas não foram utilizados sendo preenchidos apenas com 200 µl de PBS.

II.2.3.4 Vírus

Os estoques do vírus Herpes simples tipo I cepas KOS e ATCC-VR733 (procedentes do Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina) foram preparados a partir da infecção de culturas de células VERO, incubadas por 1-2 dias, congeladas a -70°C, descongeladas e centrifugadas. O sobrenadante foi dividido em criotubos de 1 ml e mantidos em nitrogênio líquido até o momento de uso.

II.2.3.5 Determinação do título infeccioso viral

O título viral é definido como o número de partículas virais infectantes por unidade de volume.

Os estoques virais foram titulados pelo método de Kärber (PAYMENT & TRUDEL, 1989) empregando-se placas de microtitulação de 96 poços. O título viral foi estimado pelo efeito citopático viral e expresso em doses infectantes para 50% da cultura celular por unidade de volume (TCID₅₀/50µl).

Para a cepa KOS o título encontrado foi de 10⁶ TCID₅₀/50µl e para a cepa ATCC-VR733 10^{4.75} TCID₅₀/50µl.

II.2.3.6 Avaliação da citotoxicidade das substâncias em teste

Para a determinação da concentração máxima não-tóxica (CMNT) e da concentração que provoca alteração morfológica em aproximadamente 50% do tapete celular (CC_{50}), as soluções preparadas a partir dos extratos vegetais foram adicionadas às células em concentrações de 20 mg/ml a 19 μ g/ml e as soluções dos produtos HB7 e HB8 nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 μ g/ml. A alteração morfológica (caracterizada pelo aspecto desorganizado, arredondado e granular das células) foi avaliada após 72 horas de incubação através da observação do aspecto do tapete celular em microscópio invertido (MONTANHA *et al.*, 1995).

II.2.3.7 Determinação do efeito citopático viral

O efeito citopático (ECP) observado para o vírus da herpes compreende alterações que caracterizam-se pelo arredondamento celular, desorganização tecidual, formando algumas vezes focos de aglomerados celulares arredondados ou mesmo a destruição completa do tapete celular.

Os extratos obtidos a partir dos bulbos, folhas, flores, raízes e frutos foram testados sobre o vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) cepa KOS e ATCC-VR733.

Para este estudo utilizaram-se placas de microtitulação de 96 poços preparadas com 24 horas de antecedência conforme item II.2.3.3.

As diluições dos extratos e produtos isolados foram preparadas a partir da CMNT previamente determinada. Os extratos e produtos isolados foram adicionados em quatro poços à cultura celular nas concentrações correspondentes a CMNT, CMNT/2, CMNT/4, CMNT/8, CMNT/16 e CMNT/32 conforme mostra a Figura II.4. Empregou-se aciclovir nas concentrações de 10 e 20 μ g/ml como controle positivo.

Após adição da amostra em teste, foi colocada a suspensão viral a 100 doses infectantes. Após 72 h de incubação, correspondente a quatro ciclos de multiplicação viral, as placas foram analisadas em microscópio invertido para determinação da inibição do efeito citopático viral (MONTANHA *et al.*, 2004). O

ensaio para determinação do efeito citopático viral foi realizado em triplicata. Cada análise foi realizada concomitantemente com o controle celular, o controle viral e o controle positivo empregando aciclovir nas concentrações de 10 e 20 µg/ml.

Ao mesmo tempo em que era realizado o estudo da atividade antiviral, controlou-se a toxicidade dos extratos, repetindo-se o teste de citotoxicidade na mesma placa. Um desenho esquemático do ensaio de determinação do efeito citopático viral é apresentado na Figura II.4.

Os extratos ou produtos que exibiram alguma inibição do efeito citopático viral quando comparados aos controles foram submetidos à determinação da redução do título infeccioso (BURLESON *et al.*, 1992). Após leitura das placas, estas foram congeladas a -70°C e descongeladas por três vezes. O conteúdo dos poços idênticos (com a mesma concentração de amostra) foi misturado, centrifugado e o sobrenadante titulado pelo método de Kärber. A atividade antiviral foi expressa em redução do título viral ($\log_{10}TCID_{50}/50\mu l$) comparado ao controle viral. Todos ensaios foram realizados em triplicata.

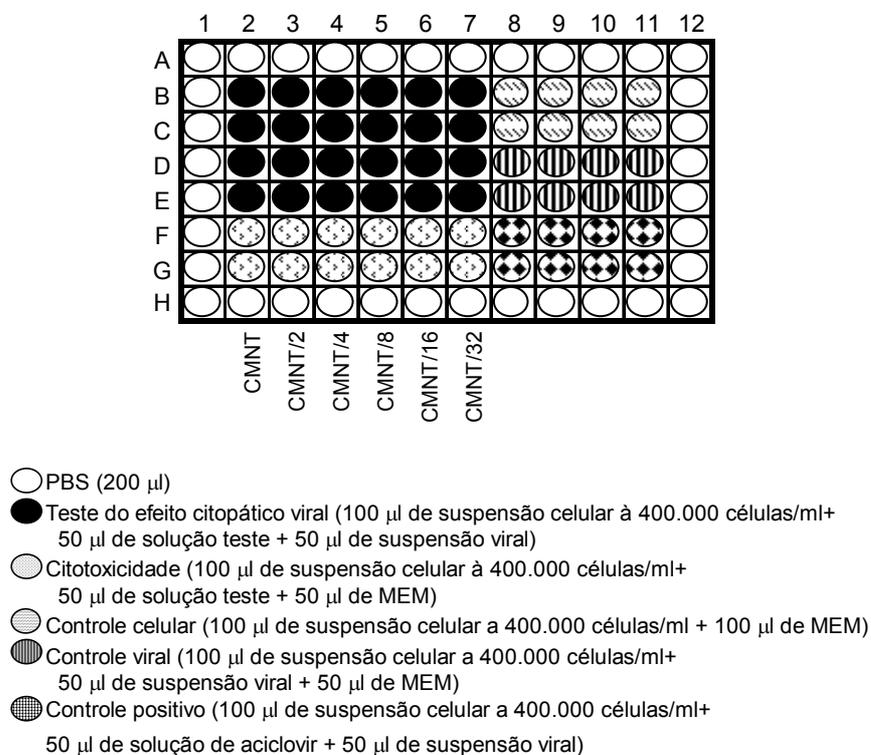


Figura II.4: Esquema da disposição da placa de microtitulação utilizada para o ensaio de determinação do efeito citopático viral.

II.3 Resultados e Discussão

II.3.1 Atividade anticolinesterásica

O extrato CH₂Cl₂-B de bulbos, após ser cromatografado e revelado, apresentou atividade anticolinesterásica caracterizada pela coloração branca contrastando com o fundo púrpura. Porém, não foi possível definir quais bandas foram ativas, pois estas se apresentaram de forma contínua.

O extrato CH₂Cl₂-B de bulbos foi microfracionado em CLAE resultando em 18 frações conforme apresentado na Figura II.5. Dentre as frações obtidas por microfracionamento em CLAE do extrato CH₂Cl₂-B de bulbos apenas as frações iniciais, ou seja, mais polares, mostraram atividade anticolinesterásica. As frações 2, 4, 6 e 8 apresentaram atividade marcante sendo esta proporcional à atividade do padrão galantamina. Dentre os extratos e compostos isolados testados, apenas o extrato CH₂Cl₂-B de bulbos e os compostos HB1 (breviflorina-A) e HB5 (breviflorina-B) foram ativos. A Tabela II.1 apresenta as frações, extratos e produtos isolados que apresentaram atividade anticolinesterásica.

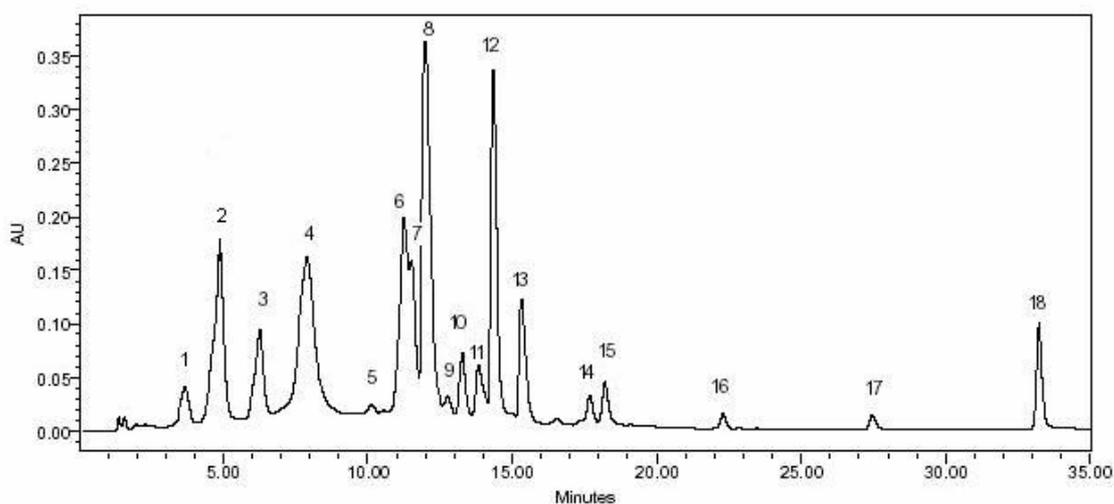


Figura II.5: Microfracionamento do extrato CH₂Cl₂-B de bulbos em CLAE.

Tabela II.1: Frações ativas de *H. breviflorum* quando à atividade anticolinesterásica.

Fração testada	Atividade anticolinesterásica	Extrato ou Produto isolado testado	Atividade anticolinesterásica
1	+	15	+
2	+++	CH ₂ Cl ₂ -B de bulbos	++
3	+	HB1	+
4	+++	HB5	++
6	+++	Galantamina (10 µl/ml)	+++
8	+++	Galantamina (20 µl/ml)	+++
12	++	CH ₂ Cl ₂ -B de bulbos	++

Os principais compostos responsáveis pela atividade anticolinesterásica correspondem às frações 2, 4, 6 e 8 coletadas através de microfracionamento em CLAE. As frações 1 e 3 também apresentaram atividade anticolinesterásica sendo esta inferior à observada para o padrão galantamina. Dentre os compostos isolados apenas HB1 e HB5 inibiram a enzima acetilcolinesterase, sendo esta inibição inferior a apresentada pelo padrão. Estes dois compostos correspondem às frações 12 e 15 do microfracionamento em CLAE (conforme Figura II.5).

II.3.2 Atividade antioxidante

Dentre os compostos testados, apenas HB7 (etilcafeato), HB9 (quercetina) e HB10 (rutina) apresentaram atividade antioxidante marcante observada pela intensa coloração amarela no ponto de aplicação. HB1, HB5 e HB6 mostraram coloração amarela menos intensa evidenciando um leve potencial antioxidante na concentração testada.

Dentre os compostos fenólicos, as agliconas apresentam maior ação antiperoxidativa quando comparadas aos derivados glicosilados correspondentes (SKERGET *et al.*, 2005). Diversos estudos indicam quercetina como um dos flavonóides mais ativos do grupo apresentando atividade antioxidante superior a de seu derivado rutina frente a diversas metodologias (CHOI *et al.*, 2002; KUMAZAWA *et al.*, 2004). Entretanto, no ensaio realizado não foi possível visualizar, através da intensidade de coloração da placa cromatográfica, a diferença existente entre a

atividade dos compostos HB9 e HB10. Este resultado encontra-se de acordo com estudos anteriores empregando esta metodologia (CHOI *et al.*, 2002).

Os ácidos fenólicos têm demonstrado diversas atividades biológicas destacando-se principalmente a atividade antioxidante. Em estudo realizado por CHALAS e colaboradores (2001), dentre diversos ácidos fenólicos esterificados, etilcafeato (HB7) mostrou ser o mais ativo sendo sua atividade superior a do seu ácido correspondente.

II.3.3 Atividade antiviral

A concentração que provocou alteração morfológica em aproximadamente 50% do tapete celular (CC_{50}) e a concentração máxima não tóxica (CMNT) determinada para cada extrato vegetal encontram-se na Tabela II.2.

Nenhum dos extratos testados foi capaz de inibir em 100% o efeito citopático do vírus HSV-1 cepa KOS e ATCC-VR733 em células VERO. Entretanto, para todos os extratos de folhas testados (mole, éter, CH_2Cl_2 -A e CH_2Cl_2 -B) observou-se uma inibição do efeito citopático viral inferior a 50% (Tabela II.3). Para a caracterização de uma inibição inferior a 50% os poços contendo as amostras em teste foram comparados aos poços do controle celular e do controle viral.

Com o objetivo de verificar quais os compostos responsáveis pela atividade dos extratos de folhas, testaram-se os produtos HB7 (etilcafeato) e HB8 (*p*-hidroxibenzaldeído) isolados a partir do extrato CH_2Cl_2 -A de folhas, conforme descrito no item I.3.7.2. Estes compostos isolados apresentaram uma inibição marcante do ECP de até 100% conforme ilustra a Tabela II.3.

Tabela II.2: Valores de CC₅₀ e CMNT para os extratos e produtos isolados testados de *H. breviflorum*.

Extrato/Produto	CC ₅₀ (mg/ml)	CMNT (mg/ml)
Bulbos		
Mole	0,312	0,019
Éter de Petróleo	0,312	0,078
CH ₂ Cl ₂ -A	0,078	0,019
CH ₂ Cl ₂ -B	0,156	0,019
Raízes		
Mole	1,250	0,078
Éter de Petróleo	0,156	0,039
CH ₂ Cl ₂ -A	0,078	0,039
CH ₂ Cl ₂ -B	0,312	0,039
Folhas		
Mole	0,312	0,078
Éter de Petróleo	0,312	0,078
CH ₂ Cl ₂ -A	0,625	0,312
CH ₂ Cl ₂ -B	0,625	0,156
Frutos		
Mole	NT	NT
Éter de Petróleo	0,625	0,078
CH ₂ Cl ₂ -A	0,312	0,078
CH ₂ Cl ₂ -B	NT	NT
Flores		
Mole	NT	NT
Éter de Petróleo	2,500	0,625
CH ₂ Cl ₂ -A	NT	NT
CH ₂ Cl ₂ -B	NT	NT
HB7	ND	0,200
HB8	ND	0,400

NT= Não testado

ND= Não determinado

Tabela II.3: Determinação do efeito citopático viral (ECP) dos extratos de folhas e produtos isolados da fração CH₂Cl₂-A de folhas frente a HSV-1 cepas KOS e ATCC-VR733.

Extrato (folhas) ou produto isolado	CMNT (mg/ml)	HSV -1	
		Cepa KOS Inibição ECP (%)	Cepa ATCC-VR733 Inibição ECP (%)
Mole	0,078	< 50%	< 50%
Éter	0,078	< 50%	< 50%
CH ₂ Cl ₂ -A	0,312	< 50%	< 50%
CH ₂ Cl ₂ -B	0,156	< 50%	< 50%
HB7	0,200	> 50%	100%
HB8	0,400	> 50%	> 50%
Aciclovir	0,01*	100%	100%

* Concentração testada. CMNT > 0,02.

Os extratos mole, éter, CH₂Cl₂-A e CH₂Cl₂-B de folhas e os produtos isolados, por apresentarem certo grau de inibição do efeito citopático (ECP) do vírus HSV, foram selecionados para determinação da redução do título infeccioso viral visando a quantificação da inibição viral. A redução do título viral é expressa em log₁₀TCID₅₀/50μl, estão apresentados nas Figuras II.6 e II.7.

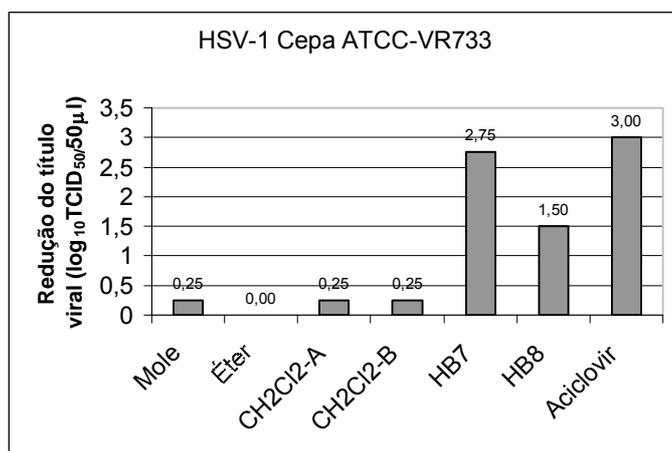


Figura II.6: Gráfico demonstrativo da redução do título infeccioso viral, expresso em log₁₀TCID₅₀/50μl, exibida pelos extratos e produtos isolados testados contra o vírus HSV-1 cepa ATCC-VR733.

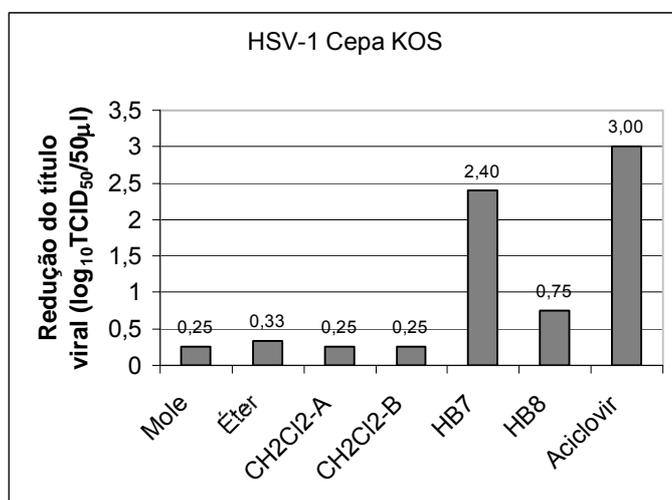


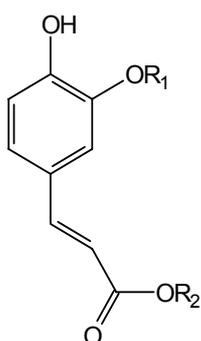
Figura II.7: Gráfico demonstrativo da redução do título infeccioso viral, expresso em log₁₀TCID₅₀/50μl, exibida pelos extratos e produtos isolados testados contra o vírus HSV-1 cepa KOS.

Alguns extratos de folhas apresentaram redução do título infeccioso viral de aproximadamente 0,25 log, sendo esta redução coerente com o percentual de inibição do ECP (<50%) observado para os mesmos extratos. Ambos os produtos

isolados HB7 e HB8 apresentaram redução do título infeccioso viral superior a 50% nas concentrações de 200 e 400 µg/ml, respectivamente. O composto isolado HB7 inibiu em 100% o vírus HSV-1 cepa ATCC-VR733, sendo esta inibição equivalente à exibida pelo controle positivo empregado.

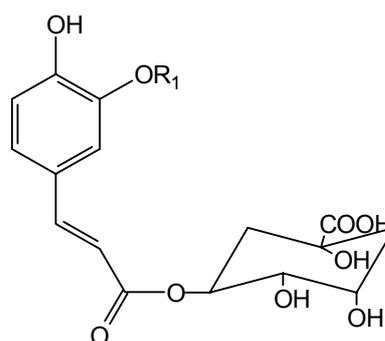
Embora não tenham sido encontrados na literatura estudos de avaliação da atividade antiviral para o composto HB7, identificado como etilcafeato, esta ação é coerente por este ser um derivado do ácido caféico [64] cuja atividade está relatada em trabalhos anteriores (CHIANG *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003). O ácido caféico apresentou atividade máxima contra HSV-1 em concentração de 40 µg/ml e um índice de seletividade (razão entre concentração não tóxica para 50% das células e concentração efetiva para 50% das células) 7 vezes superior ao do controle aciclovir (CHIANG *et al.*, 2002).

Verificou-se que compostos diidroxilados no anel aromático como o ácido caféico e o ácido clorogênico [65] apresentam atividade antiviral mais pronunciada que compostos que apresentam apenas uma hidroxila ligada ao anel aromático como, por exemplo, o ácido ferúlico [66] (CHIANG *et al.*, 2002).



Ácido caféico [64] $R_1=R_2=H$

Ácido ferúlico [66] $R_1=CH_3, R_2=H$



Ácido clorogênico [65]

Figura II.8: Estrutura dos ácidos caféico, ferúlico e clorogênico.

Os alcalóides de Amaryllidaceae possuem uma grande diversidade estrutural e apresentam promissoras atividades farmacológicas. Dentre esta classe de compostos destacam-se a pancratistatina, a qual apresenta acentuada ação citotóxica, demonstrando ser um agente antitumoral em potencial (MUTSUGA *et al.*, 2002); a licorina, o alcalóide mais abundante do grupo, com diversas atividades biológicas comprovadas; a galantamina, anticolinesterásico disponível comercialmente para o tratamento da Doença de Alzheimer e a sanguinina, que mostrou ser mais potente até que a própria galantamina em ensaios *in vitro* (LÓPEZ *et al.*, 2002) o que aumenta o interesse na utilização destes alcalóides na terapêutica de distúrbios envolvendo o sistema nervoso. Conseqüentemente, estudos sobre as atividades biológicas desta classe de compostos são relevantes, já que constituem substâncias com imenso potencial farmacológico.

É necessário uma reconsideração sobre a definição dos alcalóides de Amaryllidaceae – considerados uma classe distinta entre os alcalóides derivados da tirosina e da fenilalanina – assim como o perfil destes, uma vez que, recentemente, estes compostos foram encontrados em outras famílias e novos compostos com núcleos diferentes dos apresentados na Figura I.2 foram relatados na literatura.

Estudos de relação estrutura-atividade (REA) indicam que a presença do grupamento metilenodioxí, existente na maioria dos alcalóides de Amaryllidaceae, é considerada um indicativo de potencial atividades antiviral e citotóxica destas moléculas (WU *et al.*, 1989; MONTANHA *et al.*, 1995).

Os trabalhos envolvendo a investigação da constituição química e a avaliação das atividades biológicas das espécies de *Hippeastrum* são bem menos numerosos quando comparados aos existentes na literatura sobre outros gêneros da família Amaryllidaceae como *Crinum* e *Narcissus*. Isso se deve provavelmente ao fato deste gênero ter uma distribuição predominantemente na América Latina e muito limitada no restante do mundo, havendo relatos de sua presença, fora da América, apenas em alguns países como Vietnã e Egito (ALI *et al.*, 1981; PHAM *et al.*, 1997; YOUSSEF *et al.*, 2001).

Dentre as espécies do gênero *Hippeastrum*, *H. equestre* e *H. vittatum* são as mais investigadas quanto a sua composição em alcalóides. Diversos trabalhos envolvendo este gênero de vegetais têm sido desenvolvidos. Entretanto entre as 6 espécies nativas presentes no Estado do Rio Grande do Sul apenas *H. vittatum* e *H. glaucescens* foram estudados química e farmacologicamente até o momento. O estudo envolvendo *H. glaucescens* foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa na Faculdade de Farmácia (UFRGS).

Os alcalóides mais freqüentemente encontrados nas espécies do gênero são licorina, hipeastrina, pseudolicorina, tazetina e haemantamina. Entretanto, uma análise dos alcalóides isolados até o momento de espécies do gênero *Hippeastrum* revela que os núcleos mais freqüentemente encontrados são licorina, licorenina e crinina, enquanto que os compostos do tipo galantamina são os de menor ocorrência. Por outro lado, não há relatos de ocorrência de núcleos do tipo plicamina, galantindol e gracilina.

Um dos objetivos deste trabalho foi comparar o perfil cromatográfico entre os dois grupos vegetais da espécie *Hippeastrum breviflorum*, um com flores vermelhas (chamado VERMELHO) e outro com flores brancas (chamado BRANCO). Como estes vegetais foram coletados no mesmo local, estando homogeneamente dispersos e sob mesmas condições de solo, iluminação e nutrientes, optou-se em separá-los em dois grupos de acordo com a coloração das flores. Do ponto de vista botânico, ambos os grupos pareciam ser a mesma espécie, porém não havia explicação para esta diferença de coloração das flores. Desta forma, um estudo da constituição química poderia servir como uma ferramenta adicional para a correta identificação do vegetal.

Através de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) não se observou diferença qualitativa entre os extratos analisados de ambos os grupo de vegetais VERMELHO e BRANCO. Pode-se verificar algumas diferenças entre os rendimentos dos extratos para os dois grupos VERMELHO e BRANCO (Tabelas I.3 e I.4), porém não há uma explicação para estas diferenças. A partir das análises fitoquímicas realizadas pode-se sugerir que os dois grupos de plantas eram a mesma espécie, todavia, outras análises devem

ser realizadas a fim de sustentar estes dados. A diferença na coloração das flores é um aspecto intrigante neste vegetal e pode ser atribuída a distintas concentrações de alguns compostos fenólicos como, por exemplo, os antocianos os quais não foram investigados neste trabalho.

Todos os extratos CH₂Cl₂-A (proveniente de extração com diclorometano em meio ácido) e CH₂Cl₂-B (proveniente de extração com diclorometano em meio alcalino) do vegetal apresentaram bandas cromatográficas que foram reveladas pelo reagente de Dragendorff. Quanto aos extratos éter de petróleo, apenas o de bulbos e raízes mostraram a presença de compostos alcalóidicos indicando que nestes órgãos se encontram compostos com estruturas distintas dos demais presentes nas outras partes do vegetal.

Dentre as frações avaliadas, tanto os extratos CH₂Cl₂-B de raízes e bulbos como os extratos CH₂Cl₂-B de frutos e flores mostraram perfil cromatográfico semelhante que pode ser atribuído à estreita relação anatômica entre estas partes do vegetal, sendo muitas vezes difícil diferenciar uma e outra.

Alguns extratos como CH₂Cl₂-B de frutos, flores, raízes e bulbos apresentaram compostos em comum, indicando que estas substâncias estão amplamente distribuídas em todo vegetal. Apenas o extrato CH₂Cl₂-B de folhas mostrou um perfil cromatográfico mais simples e diferente dos demais.

Foram isolados 10 compostos a partir dos bulbos, folhas e frutos de *Hippeastrum breviflorum*. Os compostos HB7, HB8, HB9 e HB10 identificados como sendo etilcafeato, *p*-hidroxibenzaldeído, quercetina e rutina, respectivamente, são compostos fenólicos amplamente distribuídos nos vegetais. Os produtos etilcafeato e *p*-hidroxibenzaldeído são compostos fenólicos do tipo C₆-C₃ e C₆-C₁ derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico, respectivamente e fazem parte da mesma rota biossintética (CARVALHO *et al.*, 2003). Já outros compostos como HB3, identificado como sendo o alcalóide licorina é característico de plantas de Amaryllidaceae e encontrado em diversos gêneros da família.

Foram isolados dois produtos inéditos HB1 e HB5 denominados de breviflorina-A e breviflorina-B os quais apresentam núcleo semelhante ao composto galantindol isolado de *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus* (UNVER *et al.*, 2003). Não há relatos na literatura do isolamento de alcalóides com este tipo de núcleo a partir de espécies de *Hippeastrum*, podendo-se afirmar que trata-se de um novo tipo de estrutura alcaloídica presente no gênero.

Considerando-se que os compostos encontrados em Amaryllidaceae constituem substâncias com grande potencial farmacológico, paralelamente ao estudo químico de *H. breviflorum*, alguns extratos e compostos isolados foram investigados quanto às atividades anticolinesterásica, antioxidante e antiviral.

Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio possam induzir dano oxidativo nas biomoléculas (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) podendo essa ser a causa de um grande número de enfermidades como aterosclerose, envelhecimento, câncer, diabetes mellitus, inflamação, AIDS e diversas doenças degenerativas (CHOI *et al.*, 2002; KUMAZAWA *et al.*, 2004). Assim, os antioxidantes de origem natural constituem uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre estas substâncias, os flavonóides e os ácidos fenólicos, amplamente distribuídos no reino vegetal, são caracterizados pela habilidade de formarem radicais mais estáveis (CETKOVIC *et al.*, 2004).

Dentre os compostos testados, HB7 (etilcafeato), HB9 (quercetina) e HB10 (rutina) exibiram marcante atividade antioxidante. Estes compostos estruturalmente apresentam em comum um grupo 1,2-diidroxifenila, também chamado catecol, já relatado na literatura como característica importante para esta atividade (KUMAZAWA *et al.*, 2004). Este grupamento consegue efetivamente capturar radicais livres gerando outras formas radicalares pouco reativas que podem ser facilmente eliminadas por diversos mecanismos (CETKOVIC *et al.*, 2004).

Embora no ensaio para atividade antioxidante realizado o composto HB8 (*p*-hidroxibenzaldeído) não tenha apresentado atividade, em ensaio *in vitro* realizado por HA e colaboradores (2000) verificou-se que *p*-hidroxibenzaldeído reduziu significativamente a peroxidação lipídica cerebral e apresentou inibição da enzima

GABA transaminase mais efetiva que o anticonvulsivante ácido valpróico. Esta diferença de atividade pode ser atribuída ao tipo de método empregado na realização do ensaio. Este estudo corrobora a importância do emprego de vários métodos para verificação de uma determinada ação farmacológica.

Quanto à atividade anticolinesterásica, RHEE e colaboradores (2001) desenvolveram outro ensaio para avaliação de inibidores da acetilcolinesterase que preconiza a utilização do reagente de Ellmann [5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)]. Neste método, a placa cora-se de amarelo enquanto que a região de inibição permanece descorada o que dificulta a visualização das zonas de inibição enzimática devido ao tênue contraste entre as cores. Os dois testes apresentam um baixo limite de detecção em relação a outros métodos clássicos de detecção como absorção no UV (254 nm) e revelação com reagente de Dragendorff. Entretanto, o método utilizado neste trabalho desenvolvido por MARSTON e colaboradores (2002) apresenta um limite de detecção até 10 vezes menor frente aos ensaios que utilizam o reagente de Ellman.

Dentre os extratos testados apenas o extrato CH₂Cl₂-B de bulbos apresentou atividade anticolinesterásica. O microfracionamento deste extrato em CLAE possibilitou a identificação das frações responsáveis pela atividade observada. As frações 2, 4, 6 e 8 apresentaram atividade proporcional a do padrão galantamina. As frações 12 e 15 apresentaram atividade inferior à exibida pelo padrão galantamina. Estas frações correspondem aos compostos HB1 (breviflorina-A) e HB5 (breviflorina-B) que também foram ativos no ensaio quando testados isoladamente. Portanto, a atividade do extrato CH₂Cl₂-B de bulbos não pode ser atribuída a um único composto, mas sim ao conjunto de substâncias que o compõe.

Todos extratos de folhas de *Hippeastrum breviflorum* apresentaram inibição do vírus HSV-1 cepas KOS e ATCC-VR733 inferior a 50%. Com a finalidade de encontrar o composto responsável por esta atividade foram testados os produtos isolados do extrato CH₂Cl₂-A das folhas. Os compostos HB7 e HB8 (etilcafeato e *p*-hidroxibenzaldeído) apresentaram percentual de inibição do ECP viral superior a 50%. Etilcafeato foi o mais ativo exibindo redução do título infeccioso viral equivalente ao do fármaco controle aciclovir (3log₁₀).

Dentre os dados obtidos, deve-se destacar o isolamento de duas substâncias inéditas a partir de *Hippeastrum breviflorum* mostrando o grande potencial das espécies de Amaryllidaceae nativas do Estado do Rio Grande do Sul quanto à obtenção de novos compostos e conseqüentemente do potencial estudo das atividades biológicas relacionadas a estes.

Desta forma, este trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento sobre as espécies do gênero *Hippeastrum* apresentando grande relevância para estudos subseqüentes envolvendo a quimiotaxonomia destes vegetais bem como o estudo das atividades biológicas dos compostos encontrados nestes.

CONCLUSÕES

Os extratos obtidos de ambos os grupos de vegetais, com flores vermelhas (VERMELHO) e com flores brancas (BRANCO), apresentaram o mesmo perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. Desta forma, pode-se verificar a importância dos estudos fitoquímicos como ferramenta quimiotaxonômica.

A presença de alcalóides foi detectada em todos os órgãos do vegetal, sendo encontrados tanto nos extratos CH₂Cl₂-A quanto nos extratos CH₂Cl₂-B para todas as partes da planta flores, frutos, bulbos, raízes e folhas.

Foram isolados 10 compostos obtidos a partir dos bulbos, folhas e frutos de *Hippeastrum breviflorum*. Destes, 7 tiveram sua estrutura determinada através do uso de métodos espectroscópicos e cromatográficos.

Os compostos breviflorina-A e breviflorina-B são compostos inéditos encontrados apenas no extrato CH₂Cl₂-B dos bulbos do vegetal.

Dos compostos isolados, licorina, breviflorina-A e breviflorina-B são alcalóides. As demais substâncias obtidas etilcafeato, *p*-hidroxibenzaldeído, quercetina e rutina são compostos fenólicos.

As frações mais polares do extrato CH₂Cl₂-B de bulbos apresentaram atividade anticolinesterásica e, dentre os compostos isolados, breviflorina-A e breviflorina-B foram os mais ativos.

Os produtos etilcafeato, quercetina e rutina apresentaram atividade antioxidante.

Etilcafeato, em concentração de 400 µg/ml apresentou atividade antiviral equivalente ao fármaco empregado como controle positivo (aciclovir).

REFERÊNCIAS

ABOU-DONIA, A. H.; AMER, M. E.; DARWISH, F. A.; KASSEM, F. F.; HAMMODA, H. M.; ABDEL-KADER, M. S.; ZHOU, B.; KINGSTON, D. G. I. Two new alkaloids of the crinine series from *Pancratium sickenbergeri*. **Planta Medica**, v. 68, p. 379-381, 2002.

ALI, A. A.; MESBAH, M. K.; FRAHM, A. W. Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. Part III: Structural elucidation of hippadine. **Planta Medica**, v. 29, p. 407-409, 1981.

ALI, A. A.; MESBAH, M. K.; FRAHM, A. W. Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum*. Part IV: Stereochemistry of pancracine, the first 5,11-methanomorphanthridine alkaloid from *Hippeastrum* - structure of hippagine. **Planta Medica**, v. 50, p. 188-189, 1984.

ALI, A. A.; KÖNIG, G. M.; KHALID, S. A.; WRIGHT, A. D.; KAMINSKY, R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their *in vitro* activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 219-228, 2002.

ALMANZA, G.R.; FERNÁNDEZ, J. M.; WAKORI, E. W. T.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA J. Alkaloids from *Narcissus* cv. Salome. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1375-1378, 1996.

AMOS, S.; BINDA, L.; AKAH, P.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Central inhibitory activity of the aqueous extract of *Crinum gigatum*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 23-28, 2003.

BARTHELMES, H. U.; NIEDERBERGER, E.; ROTH, T.; SCHULTE, K.; TANG, W. C.; BOEGE, F.; FIEBIG, H. H.; EISENBRAND, G.; MARKO, D. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II β poison and inhibits the growth of human tumour cells. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 1585-1591, 2001.

BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; RUBIRALTA, M.; QUIRION, J. C.; HUSSON, H. P. 9-O-dimetil-2 α -hidroxihomolicorina, an alkaloid from *Narcissus tortifolius*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2683-2684, 1990.

BASTIDA, J.; CODINA, C.; PORRAS, C. L.; PAIZ, L. Alkaloids from *Hippeastrum solandriflorum*. **Planta Medica**, v. 62, p. 74-75, 1996.

BERKOV, S.; SIDJIMOVA, B.; EVSTATIEVA, L.; POPOV, S. Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 579-586, 2004.

BOIT, H. G. Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota pupurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI Mitteil. Über Amaryllidaceen alkaloide). **Chemische Berichte**, v. 89, p. 1129-1123, 1956.

BORES, G. M.; HUGER, F. P.; PETKO, W.; MUTLIB, A. E.; CAMACHO, F.; RUSH, D. K.; SELK, D. E.; WOLF, V.; KOSLEY, R. W.; DAVIS, L.; VARGAS, H. M. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, p. 728-738, 1996.

BOTHA, E. W.; KAHLERA, C. P.; DU PLOOY, W. J.; DU PLOOY, S. H.; MATHIBE, L. Effect of *Boophone disticha* on human neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 385-388, 2005.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Zaragoza: Acribia S.A., 1991. 594p.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica - Plantas Medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia S.A., 2001. 1099p.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: A laboratory manual**. San Diego: Academic, 1992.

CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v. 64, p. 91-93, 1998.

CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Bioactive alkaloids from *Brunsvigia radulosa*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 587-591, 2000.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS- Editora da UFSC, 2003. cap. 20, p. 519-536.

CASTILHOS, T. S. Investigação química em *Habranthus erectus* Ravenna e *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub (Amaryllidaceae) e avaliação biológica *in vitro* do alcalóide montanina, 2004. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFRGS, Porto Alegre.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W. Use of on-flow LC/¹H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CETKOVIC, G. S.; DJILAS, S. M.; BRUNET-CANADANOVIC, J. M.; TUMBAS, V. T. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food Research International**, v. 37, p. 643-650, 2004.

CHALAS, J.; CLAISE, C.; EDEAS, M.; MESSAOUDI, C.; VERGNES, L.; ABELLA, A.; LINDENBAUM, A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. **Biomed Pharmacotherapy**, v. 55, p. 54-60, 2001.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; CHANG, M. Y., NG, L. T., LIN, C. C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 55, p. 53-62, 2002.

CHOI, J. S.; CHUNG, H. Y.; KANG, S. S.; JUNG, M. J.; KIM, J. W.; NO, J. K.; JUNG, H. A. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 232-235, 2002.

COOK J. W.; LOUDON J. D. Alkaloids of the Amaryllidaceae. In: MANSKE R. H. F.; HOLMES H. L. **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. Nova Iorque: Academic Press, 1952. v. II, cap. XI, p. 331-352.

CORDELL, G. A; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, vol. IV, 1984.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons: Structure, evolution, and taxonomy**. Berlin: Springer- Verlag, 1985. 520p.

DE SMET, P. A. G. M. Traditional pharmacology and medicine in Africa ethnopharmacological themes in Sub-Saharan art objects and utensils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 1-175, 1998.

DÖPKE, W.; PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; BARTOSZEK, M.; FLATAU, S. Alkaloids from *Hippeastrum equestre*; Part I: Phamine, a new phenanthridone alkaloid. **Planta Medica**, v. 61, p. 564-566, 1995.

DU PLOOY, W. J.; SWART, L.; HUUSTEEN, G. W. Poisoning with *Boopane disticha*: A forensic case. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, p. 277-278, 2001.

EICHHORN, J.; TAKADA, T.; KITA, Y.; ZENK, M. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1037-1047, 1998.

EL MOHGAZI, A. M.; ALI, A. A.; MESBAH, M. K. Phytochemical investigation of *Hippeastrum vittatum* growing in Egypt. Part II: Isolation and identification of new alkaloids. **Planta Medica**, v. 28, p. 336-342, 1975.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; STADEN VAN, J. Alkaloids from *Crinum bulbispermum*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 533-536, 1999.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; STADEN VAN, J. Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 490-495, 2002.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; MORRIS, C.; STADEN, J. V. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 601-615, 2003.

ELGORASHI, E. E.; STADEN VAN, J. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 27-32, 2004.

ELLIOTT, S.; BRIMACOMBE, J. The medicinal plants of Gunung Leuser National Park, Indonesia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, p. 285-317, 1987.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. Nova Iorque: WB Saunders. 15 ed. 2002. cap. 27. p. 333-393.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ABOU- DONIA, A. H.; TOUEMA, S. M.; HAMMODA, H. A. M.; SHAWKY, E.; MOTTA, A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2113-2118, 2004.

FABRIS, H. A. Pteridófitas, Gimnospermas y Monocotiledóneas (excepto Gramíneas). In: CABRERA, A. L. **Flora de La Provincia de Buenos Aires**. Buenos Aires: Collection Cient INTA, 1968. v. 1, p. 531-534.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 965-981, 1985.

FENNEL, C. W.; STADEN, J. V. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 15-26, 2001.

FENNEL, C. W.; ELGORASHI, E. E.; STADEN, J. V. Alkaloid production in *Crinum moorei* cultures. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1524-1526, 2003.

FUGANTI, C. The Amaryllidaceae alkaloids. In: MANSKE R. H. F. (Ed.) **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. New York: Academic Press Inc., 1975. v. XV. cap. 3. p. 83-164.

FURUSAWA, E.; IRIE, H.; COMBS, D.; WILDMAN, W. Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: Comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids. **Chemotherapy**, v. 26, p. 36-45, 1980.

GABRIELSEN, B.; MONATH, T. P.; HUGGINS, J. W.; KEFAUVER, D. F.; PETTIT, G. R.; GROSZEK, G.; HOLLINGSHEAD, M.; KIRSI, J. J.; SHANNON, W. M.; SCHUBERT, E. M.; DARE, J.; UGARKAR, B.; USSERY, M. A.; PHELAN, M. J. Antiviral (RNA) Activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1569-1581, 1992.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; FRAHM, A. W. Alkaloids of *Crinum latifolium*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2305-2309, 1983.

GHOSAL S.; KUMAR Y.; SINGH S. P. Glucosyloxy alkaloids from *Pancratium biflorum*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1167-1171, 1984.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2141-2156, 1985.

GHOSAL, S.; SINGH, S. K.; KUMAR, Y.; UNNIKRIISHNAN, S.; CHATTOPADHYAY, S. The role of ungeremine in the growth-inhibiting and cytotoxic effects of lycorine: evidence and speculation. **Planta Medica**, v. 54, p. 114-116, 1988.

GRUNDON, M. F. Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 4, p. 89-94, 1987.

HA, J. H.; LEE, D. U.; LEE, J. T.; KIM, J. S.; YONG, C. S.; KIM, J. A.; HA, J. S.; HUH, K. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 329-333, 2000.

HARTWELL, J. L. Plants Used Against Cancer. A Survey. **Lloydia**, v. 30, p. 379-393, 1967.

HARVEY, A. L. The pharmacology of galanthamine and analogues. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 68, p. 113-128, 1995.

HEGNAUER, R. The taxonomic significance of alkaloids. In: SWAIN, T. **Chemical plant taxonomy**. London: Academic Press, 1963. cap. 14. p. 389-428.

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**, v. 92, p. 147-162, 2004.

HENDRICKSON, J. B. **The molecules of nature: a survey of biosynthesis and chemistry of natural products**. Nova Iorque: W. A. Benjamin, 1965. cap. 5. p. 143-177.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade-UFRGS/Editora da UFSC, 2003. cap. 29. p. 765-791.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Londres: BT Batsford, 1993. 335p.

HOFMANN JÚNIOR, A. E. **Análise química e biológica de alcalóides em *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert**, 2002. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFRGS, Porto Alegre.

HOFMANN JÚNIOR, A. E.; SEBEN, C.; SOBRAL, M.; DUTILH, J. H. A.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. S. Alkaloids of *Hippeastrum glaucescens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1455-1456, 2003.

HOHMANN, J.; FORGO, P.; MOLNÁR, J.; WOLFARD, K.; MOLNÁR, A.; THALHAMMER, T.; MÁTHÉ, I.; SHARPLES, D. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. **Planta Medica**, v. 68, p. 452-454, 2002.

HOSHINO, O. The Amaryllidaceae alkaloids. In: CORDELL, G. A. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Londres: Academic Press INC., 1998. v. 51. cap. 4. p. 323-417.

HOWES, M. J. R.; PERRY, N. S. L.; HOUGHTON, P. J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's Disease and other cognitive disorders. **Phytotherapy research**, v. 17, p. 1-18, 2003.

HRAZDINA, G. Purification and properties of a UDPglucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase from *Hippeastrum* petals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 955, p. 301-309, 1988.

HSU, H. Y.; CHEN, Y. P.; HSU, C. S.; SHEN, S. J.; CHEN, C. C.; CHANG, H. C. **Matéria médica oriental: um guia conciso**. São Paulo: Editora Roca, 1999. 774p.

HUSSON, G. P.; VILAGINES, P.; SARRETTE, B.; VILAGINES, R. Effet antiviral d'un extrait de feuilles d'*Haemanthus albiflos* sur le virus de l'herpès, l'Adénovirus, le virus de la stomatite vésiculeuse, le Rotavirus et le Poliovirus. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 49, p. 40-48, 1991.

HUSSON, G. P.; VILAGINES, P.; SARRETTE, B.; VILAGINES, R. Utilisation des cultures cellulaires pour la recherche des effets cytotoxiques et antiviraux d'un extrait naturel d'Amaryllidaceae. Efficiency of tissue culture for quantitative evaluation of cytotoxicity and antiviral properties of natural extract. **Compte-Rendu de la Société de Biologie**, v. 189, p. 679-692, 1995.

IEVEN, M.; VLIETINCK, A. J.; VAN DEN BERGHE, D. A.; TOTTE, J. Plant antiviral agents III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 564-573, 1982.

IEVEN, M.; VAN DEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Plant antiviral agents IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses. **Planta Medica**, v. 49, p. 109-114, 1983.

INSTITUTO PLANTARUM. *Hippeastrum breviflorum*. Disponível em <<http://www.plantarum.com.br/acucenas.html>>. Acesso em: março de 2005.

IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. A methylflavan with free radical scavenging properties from *Pancratium littorale*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 35-39, 2001.

ITO, M.; KAWAMOTO, A.; KITA, Y.; YUKAWA, T.; KURITA, S. Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on *matK* sequence data. **Journal of Plant Research**, v. 112, p. 207-216, 1999.

JIN, Z.; LI, Z.; HUANG, R. Muscarine, imidazole, oxazole, thiazole, Amaryllidaceae and sceletium alkaloids. **Natural Products Report**, v. 19, p. 454-476, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

KAYA, G. I.; UNVER, N.; GÖZLER, B.; BASTIDA, J. (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1059-1062, 2004.

KHAN, P.; ABBAS, S.; PETIT, B.; CAFFREY, R.; MEGRAM, V.; MCGOWN, A. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic assay using solid-phase extraction for the novel antitumor agent pancratistatin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 726, p. 249–254, 1999.

KOORBANALLY, N.; MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N. Alkaloids and triterpenoids from *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v. 54, p. 93-97, 2000.

KRISHNA RAO, R. V.; VIMALADEVI, R. Crystalline alkaloids from *Hippeastrum equistre* Herb. **Planta Medica**, v. 21, p. 142-143, 1972.

KUKHANOVA, M.; VICTOROVA, L.; KRAYEVSKY, A. Peptidyltransferase center of ribosomes: On the mechanism of action of alkaloid lycorine. **FEBBS Letters**, v. 160, p. 129-133, 1983.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

KUO, Y. H.; KING, M. L. Antitumor agents from the secondary metabolites of higher plants. In: TRINGALI, C. **Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterization and biological properties**. 1 ed. New York: Taylor & Francis, 2001. cap. 6. p. 189-281.

LEWIS, J. R. Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 7, p. 549-556, 1990.

LEWIS, J. R. Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 14, p. 303-308, 1997.

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1331-1338, 1993.

LIN, L.; SHIEH, H.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; XUE, L.; JOHNSON, M. E.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea barbata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 22-29, 1993.

LIN, L.; HU, S.; CHAI, H.; PENGSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1295-1298, 1995.

LISO, R.; CALABRESE, G.; BITONTI, M. B.; ARRIGONI, O. Relationship between ascorbic acid and cell division. **Experimental Cell Research**, v. 150, p. 314-320, 1984.

- LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.
- LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Galanthamine pattern in *Narcissus confusus* plants. **Planta Medica**, v. 69, p. 1166-1168, 2003.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512p.
- LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 147-154, 2002.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354p.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and detection of butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- MARTIN, S. F. The Amarillidaceae Alkaloids. In: BROSSI, A. (Ed). **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. San Diego: Academic Press INC., 1987. v. 30. cap. 3. p. 251-376.
- MEEROW, A. W.; SNIJMAN, D. A. Amaryllidaceae. In: Kubitzki, K. **The families and genera of vascular plants - Flowering plants Monocotyledons Liliaceae (except Orchidaceae)**, Berlin: Springer-Verlag, 1998. v. 3, p. 83-110.
- MEEROW, A. W.; FAY, M. F.; GUY, C. L.; LI, Q.; ZAMAN, F. Q.; CHASE, M. W. Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 1325-1345, 1999.
- MEEROW, A. W.; GUY, C. L.; LI, Q.; YANG, S. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA *ITS* sequences. **Systematic Botany**, v. 25, p. 708-726, 2000.
- MONTANHA, J. A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Anti-herpes virus activity of aporphine alkaloids. **Planta Medica**, v. 61, p. 419-424, 1995.
- MONTANHA, J. A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S. A. L.; SHENKEL, E. P.; ROEHE, P. M. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 183-186, 2004.
- MORAES-CERDEIRA, R. M.; BURANDT, C. L. J.; BASTOS, J. K.; NANAYAKKARA, N. P. D.; MIKELL, J.; THRUN, J.; MCCHESENEY, J. D. Evaluation of four *Narcissus* cultivars as potencial sources for galanthamine production. **Planta Medica**, v. 63, p. 472-474, 1997.

MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N.; DECKER, B.; SMITH, M. T. The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoriaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 183-185, 2002.

MUTSUGA, M.; KOJIMA, K.; YAMASHITA, M.; OHNO, T.; OGIHARA, Y.; INOUE, M. Inhibition of cell cycle progression through specific phase by pancratistatin derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 223-228, 2002.

NAIR, J. J.; CAMPBELL, W. E.; BRUN, R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 373-382, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOYAN, S.; RENTSCH, G. H.; ÖNUR, M. A.; GÖZLER, T.; GÖZLER, B.; HESSE, M. The gracilines: a novel subgroup of the Amaryllidaceae alkaloids. **Heterocycles**, v. 48, p. 1777-1791, 1998.

OKETCH-RABAH, H. A.; DOSSAJI, S. F.; MBERU, E. K. Antimalarial activity of some Kenyan medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, p. 329-334, 1999.

OKPO, S. O.; ADEYEMI, O. O. Effects of *Crinum glaucum* aqueous extract on intestinal smooth muscle activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 413-416, 1998.

OKPO, S. O.; FATOKUN, F.; ADEYEMI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 207-211, 2001.

ORHAN, I.; SENER, B. Bioactivity-directed fractionation of alkaloids from some Amaryllidaceae plants and their anticholinesterase activity. **Chemistry of Natural Products**, v. 39, p. 383-386, 2003.

PACHECO, P.; SILVA, M.; STEGLICH, W.; WATSON, W. H. Alkaloids of Chilean Amaryllidaceae - Hippeastidine and epi-homolycorine two novel alkaloids. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 9, p. 28-32, 1978.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 2. ed. Filadélfia: Saunders College Publishing, 1996. cap. 4. p. 146-182.

PAYMENT, P.; TRUDEL, M. **Manuel de Techniques Virologiques**. Québec: Presses de L'université Du Québec, 1989.

PETTIT, G. R.; GADDAMIDI, V.; HERALD, D. L.; SINGH, S. B.; CRAGG, G. M.; SCHMIDT, J. M.; BOETTNER, F. E.; WILLIAMS, M.; SAGAWA, Y. Antineoplastic Agents, 120. *Pancratium littorale*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 995-1002, 1986.

PETTIT, G. R.; PETTIT III, G. R.; BACKHAUS, R. A. Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostryls from *Hymenocallis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1682-1687, 1993.

- PETTIT, G. R.; PETTIT III, G. R.; GROSZEK, G.; BACKHAUS, R. A.; DOUBEK, D. L.; BARR, R. J.; MEEROW, A. W. Antineoplastic Agents, 301. An investigation of the Amaryllidaceae genus *Hymenocallis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 756-759, 1995.
- PETTIT, G. R.; MELODY, N.; SIMPSON, M.; THOMPSON, M.; HERALD, D. L.; KNIGHT, J. C. Antineoplastic agents 500. Narcistatin. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 92-96, 2003.
- PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; DÖPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. (Amaryllidaceae) - Part III. **Pharmazie**, v. 52, p. 160-163, 1997.
- PHAM, L. H.; DÖPKE, W.; WAGNER, J.; MÜGGE, C. Alkaloids from *Crinum amabile*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 371-376, 1998.
- PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; WAGNER, J.; BARTOSZEK, M.; DÖPKE, W. Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.: 3-O-demethyltazettine and egonine. **Phytochemistry**, v. 51, p. 327-332, 1999.
- PHILLIPSON. J. D. New drugs from nature - It could be yew. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 2-8, 1999.
- PHILLIPSON. D. 50 years of medicinal plant research - Every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- QUIRION, J. C.; HUSSON, H. P. (-)-3-O-Acetylnarcissidine, a new alkaloid from *Hippeastrum puniceum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1112-1114, 1991.
- RAMADAN, M. A.; KAMEL, M. S.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Minor phenolics from *Crinum bulbispermum*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 891-896, 2000.
- RATNASOORIYA, W. D.; DERANIYAGALA, S. A.; BATHIGE, S. D. N. K.; HETTIARACHCHI, H. D. I. Leaf extract of *Crinum bulbispermum* has antinociceptive activity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 123-128, 2005.
- RAZAFIMBELO, J.; ANDRIANTSINFERANA, M.; BAUDOUIN, G.; TILLEQUIN, F. Alkaloids from *Crinum firmifolium* var. *Hygrophilum*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 323-326, 1996.
- RENARD-NOZAKI, J.; KIM, T.; IMAKURA, Y.; KIHARA, M.; KOBAYASHI, S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on Herpes Simplex Virus. **Research in Virology**, v. 140, p. 115-128, 1989.
- RHEE, K.; VAN de MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RINNER, U.; HILLEBRENER, H. L.; ADAMS, D. R.; HUDLICKY, T.; PETTIT, G. R. Synthesis and biological activity of some structural modifications of pancratistatin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2911-2915, 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; LOYOLA, J. I.; ASTUDILLO, L.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 6, p. 309-312, 2000.

SCHULTZ, A. **Introdução a Botânica Sistemática**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 1990. v. 2. 414p.

SENER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1220-1223, 2003.

SENNER, B.; KOYUNCU, M.; BINGÖL, F.; MUHTAR, F. Production of bioactive alkaloids from Turkish. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 2131-2136, 1998.

SEUBERT, M. Amaryllidaceae. In: Martius, K. F. P. **Flora Brasiliensis**, 1855. v. 3, p. 141-163.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

SZALAVIK, L.; GYURIS, A.; MINAROVITS, J.; FORGO, P.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta Medica**, v. 70, p. 871-873, 2004.

TANG, W.; HEMM, I.; BERTRAM, B. Recent development of antitumor agents from Chinese herbal medicines; Part I. Low molecular compounds. **Planta Medica**, v. 69, p. 97-108, 2003.

TRAM, N. T. N.; TITORENKOVA, T. V.; BANKOVA, V. S.; HANDJIEVA, N. V.; POPOV, S. S. *Crinum* L. Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 83-208, 2002.

ÜNVER, N.; GÖZLER, T.; WALCH, N.; GÖZLER, B.; HESSE, M. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v. 50, p. 1255-1261, 1999.

ÜNVER, N.; KAYA, G. I.; WERNER, C.; VERPOORTE, R.; GÖZLER, T. Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp. *byzantinus*. **Planta Medica**, v. 69, p. 869-871, 2003.

VANDEBROEK, I.; CALEWAERT, J.; DE JONCKHEERE, S.; SANCA, S.; SEMO, L.; VAN DAMME, P.; VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N. Use of medicinal plants and

pharmaceuticals by indigenous communities in the Bolivian Andes and Amazon. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, p. 243-250, 2004.

VAN DEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J.; HOOFF, L. V. Plant products as potencial antiviral agents. **Bulletin Institute Pasteur**, v. 84, p. 101-147, 1986.

VERMANI, K.; GARG, S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 49-66, 2002.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Quimica Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

VILADOMAT, F.; ALMANZA, G. R.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; CAMPBELL, W. E.; MATHEE, S. Alkaloids from *Brunsvigia orientalis*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1379-1384, 1996.

WAGNER, H.; BRADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1996. 384 p.

WENIGER, B.; ITALIANO, L.; BECK, J. P.; BASTIDA, J.; BERGOÑON, S.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. **Planta Medica**, v. 61, p. 77-79, 1995.

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

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

WU, Y. C.; LIOU, Y. F.; LU, S. T.; CHEN, C. H.; CHANG, J. J.; LEE, K. H. Cytotoxicity of isoquinoline alkaloids and their *N*-oxides. **Planta Medica**, v. 55, p. 163-165, 1989.

YOUSSEF, D.; RAMADAN, M. A.; KHALIFA, A. A. Acetophenones, a chalcone, a chromone and flavonoids from *Pancreatum maritimum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2579-2583, 1998.

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

ZAHREDDINE H.; CLUBBE, H.; BAALBAKI, R.; GHALAYINI, A.; TALHOUK, S. N. Status of native species in threatened Mediterranean habitats: the case of *Pancreatum maritimum* L. (sea daffodil) in Lebanon. **Biological Conservation**, v. 120, p. 11-18, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)