

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo Químico e Biológico em alcaloides de *Hippeastrum
aulicum* (KER GAWL.) HERB.: uma espécie da família
Amaryllidaceae**

Carlioni Dal Piero Betzel Bessa

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2015**

Carlani Dal Piero Betzel Bessa

**Estudo Químico e Biológico em alcaloides de *Hippeastrum aulicum*
(KER GAWL.) HERB.: uma espécie da família Amaryllidaceae**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges

**Vitória
2015**

Estudo químico e biológico em alcaloides de *Hippeastrum
aulicum* (KER GAWL) HERB: uma espécie da família
Amaryllidaceae

Carlani Dal Piero Betzel Bessa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro
de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito
parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado em 05/11/2015 por:



Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Márcio Fronza
Universidade de Vila Velha



Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, novembro de 2015.

Dedico esse trabalho a minha família, por todo apoio, amor, carinho e dedicação.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Regina e Valentin, por todo amor e apoio, e por nunca medirem esforços para me dar oportunidades de estudo e crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido, Rafael, por todo amor, carinho e compreensão.

Às minhas irmãs, Viviani e Regiani, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus sobrinhos, Alícia, Arthur e Luise por me proporcionarem tantos momentos de alegria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Warley de Souza Borges por me dar a oportunidade de trabalho, pela confiança, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Dr. Antônio José Nunes Faria, por me ajudar a passar por esses dois anos da forma mais tranquila possível.

Aos amigos de laboratório, pela companhia, momentos de descontração e ajuda nos afazeres.

Aos amigos que conquistei no programa de mestrado, pelo companheirismo e conversas, especialmente ao Thales, Caroline e Leandra, que muito me ajudaram no laboratório no início da minha pesquisa.

Ao Jean Paulo de Andrade, por toda a ajuda durante o último ano de pesquisa e por me passar tantos conhecimentos a respeito da família Amaryllidaceae.

Ao Prof. Dr. Jaume Bastida pelas análises de CG-EM e comparação com a biblioteca de alcaloides de Amaryllidaceae, pelas análises de dicróismo circular e por me ensinar a analisar espectros de RMN de alcaloides.

Ao Dr. André G. Tempone e ao Instituto Adolfo Lutz pelos testes de atividade antiparasitária.

Ao Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto e ao Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa pelas sugestões para o aprimoramento do trabalho durante participação na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto e ao Prof. Dr. Márcio Fronza por aceitarem o convite de participação da banca de defesa da dissertação desse trabalho.

À Secretaria de Educação do Estado do Espírito Santo por me conceder licença do meu trabalho para que me dedicasse integralmente ao mestrado.

Ao laboratório de RMN do NCQP-UFES e a Christiane pelas análises de RMN.

Ao laboratório de Espectrometria de Massas (NCQP-UFES) pelas análises realizadas.

À Dr. Renata Souza de Oliveira pela identificação da espécie da planta trabalhada.

À CAPES-PVE N° 88881.030427/2013-01 e pela bolsa de mestrado.

À FAPES.

Ao programa de pós-graduação em Química pela formação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da Coniina	18
Figura 2: Exemplos de substâncias isoladas de plantas	20
Figura 3: Acoplamentos fenol oxidativos em Amaryllidaceae (BASTIDA, BERKOV, TORRAS <i>et al.</i> , 2011).....	23
Figura 4: Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae (BASTIDA, BERKOV, TORRAS <i>et al.</i> , 2011).....	24
Figura 5: <i>Hippeastrum aulicum</i> (Ker Gawl.) Herb (Fonte: Arquivo pessoal)	27
Figura 6: Estruturas dos alcaloides isolados de <i>Hippeastrum aulicum</i> por de ANDRADE e colaboradores (2014)	27
Figura 7 : Processo de extração ácido-base do extrato de folhas	34
Figura 8: Processo de extração ácido-base do extrato de bulbos	35
Figura 9: Fracionamento da amostra HAFH em cromatografia em coluna.....	37
Figura 10: Fracionamento cromatográfico da amostra HAFA.....	39
Figura 11: Fracionamento cromatográfico da amostra HABH	41
Figura 12: Fracionamento cromatográfico de HABA 13	44
Figura 13: Estruturas dos alcaloides identificados por CG-EM em <i>Hippeastrum aulicum</i>	51
Figura 14: Estruturas dos alcaloides obtidos de <i>Hippeastrum aulicum</i>	52
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H do composto 1 com expansões (CD ₃ OD, 400 MHz)	53
Figura 16: Esqueleto tipo 5,10b-etanofenantridina	54
Figura 17: Ilustração dos tipos de junção de anéis.....	55
Figura 18: Estruturas dos alcaloides dos tipos crinina e haemantamina	55
Figura 19: Espectro de dicroísmo circular do composto 1	56
Figura 20: Estrutura química do alcaloide Haemantamina (1).....	56
Figura 21: Espectro de massas do composto 1	58
Figura 22: Espectro de RMN ¹ H do composto 2 com expansões (CD ₃ OD, 400 MHz)	61

Figura 23: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto 2 (CD_3OD , 400 MHz)	62
Figura 24: Ampliação do mapa de contornos HSQC do composto 2 (CD_3OD , 400 MHz).....	62
Figura 25: Estrutura química do alcaloide albomaculina (2)	63
Figura 26: Espectro de RMN ^1H dos compostos 3 e 4 com expansões (CDCl_3 , 400 MHz).....	65
Figura 27: Mapa de contornos HSQC dos compostos 3 e 4 (CDCl_3 , 400 MHz)	66
Figura 28: Espectro de COSY ^1H - ^1H dos compostos 3 e 4 (CDCl_3 , 400 MHz).....	67
Figura 29: Estrutura dos alcaloides haemantidina (3) e 6-epihaemantidina (4).....	68
Figura 30: Dicroísmo circular do composto 5	69
Figura 31: Espectro de RMN ^1H do composto 5 (CD_3OD , 400 MHz)	71
Figura 32: Estrutura química do <i>N</i> -óxido crinamina.....	73
Figura 33: Espectro de massas de alta resolução do composto 5	74
Figura 34: Estrutura química do <i>N</i> -óxido haemantamina (5)	74
Figura 35: Espectro de IV do composto 5	75
Figura 36: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto 5 (CD_3OD , 400 MHz)	77
Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C do composto 5 (CD_3OD , 100 MHz)	78
Figura 38: Mapa de contornos HSQC do composto 5 (CD_3OD , 400 MHz).....	79
Figura 39: Mapa de contornos HMBC do composto 5 (CD_3OD).....	80
Figura 40: Espectro de NOESY do composto 5 (CD_3OD , 400 MHz)	81
Figura 41: Espectro de RMN ^1H do composto 6 (CD_3OD , 400 MHz)	83
Figura 42: Estrutura química do 7-metoxi- <i>O</i> -metillicorenina (6)	84
Figura 43: Espectro de RMN ^1H do composto 7 (CD_3OD , 400 MHz)	86
Figura 44: Espectro de dicroísmo circular do composto 7	88
Figura 45: Estrutura química do alcaloide aulicina (7).....	88
Figura 46: Espectro de RMN ^1H do composto 8 (CD_3OD , 400 MHz)	91
Figura 47: Estrutura química do alcaloide licorina (8).....	92
Figura 48: Espectro de RMN ^1H do composto 9 (CD_3OD , 400 MHz)	94

Figura 49: Estrutura química do alcaloide trisfaeridina (9).....	95
Figura 50: Espectro de RMN ¹ H do composto 10 (CD ₃ OD, 400 MHz)	97
Figura 51: Espectro de COSY ¹ H- ¹ H do composto 10 (CD ₃ OD, 400 MHz)	98
Figura 52: Mapa de contornos HSQC do composto 10 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	98
Figura 53: Estrutura química do alcaloide galantina (10).....	99
Figura 54: Espectro de RMN ¹ H do composto 11 (CD ₃ OD, 400 MHz)	101
Figura 55: Espectro de COSY ¹ H- ¹ H do composto 11 (CD ₃ OD, 400 MHz)	102
Figura 56: Mapa de contornos HSQC do composto 11 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	103
Figura 57: Estrutura química do 9-O-demetilpluvina	103
Figura 58: Espectro de NOESY do composto 11	104
Figura 59: Estrutura química do alcaloide norpluvina (11).....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subfrações obtidas a partir de CCDP de HAFA 10 e HAFA11.....	40
Tabela 2 – Subfrações obtidas no fracionamento de HABH 9.....	42
Tabela 3 – Subfrações obtidas no fracionamento de HABH10.....	42
Tabela 4 – Subfrações obtidas no fracionamento de HABA.....	43
Tabela 5 – Subfrações obtidas no fracionamento de HABA 13.10.....	45
Tabela 6 – Dados de CG-EM de <i>Hippeastrum aulicum</i>	50
Tabela 7 – Dados de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400MHz) do composto 1 comparados com a literatura (CDCl ₃ /1%C ₅ D ₅ N, 360 MHz)(PABUÇÇUOGLU, RICHOME, GÖZLER <i>et al</i> , 1989).....	57
Tabela 8 – Dados de RMN ¹ H e COSY (CD ₃ OD, 400MHz) do composto 2 comparados com a literatura (CDCl ₃ , 400 MHz) (ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA <i>et al</i> , 2014)	63
Tabela 9 – Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) dos compostos 3 e 4 comparados com a literatura (CDCl ₃ /1%C ₅ D ₅ N, 360 MHz)((PABUÇÇUOGLU, RICHOME, GÖZLER <i>et al</i> , 1989)	68
Tabela 10 – Dados de RMN mono e bidimensionais do composto 5 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	72
Tabela 11 – Dados de RMN ¹ H do composto 6 (CD ₃ OD, 400 MHz) em comparação com a literatura (CD ₃ OD, 500 MHz)(ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA, 2014).....	84
Tabela 12 – Dados de RMN ¹ H do composto 7 (CD ₃ OD, 400 MHz) em comparação com a literatura (CDCl ₃ , 400 MHz)(ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA <i>et al.</i> , 2014)..	87
Tabela 13 – Dados de RMN ¹ H do composto 8 (CD ₃ OD, 400 MHz) em comparação com a literatura (DMSO-d ₆ , 300 MHz) (LIKHITWITAYAWUID, ANGERHOFER, CHAI <i>et al</i> , 1993).....	92
Tabela 14 – Dados de RMN ¹ H do composto 9 (CD ₃ OD, 400 MHz) em comparação com a literatura (CDCl ₃ , 200 MHz) (SUAU, GOMEZ, RICO, 1990).....	95
Tabela 15 – Dados de RMN ¹ H e de COSY do composto 10 (CD ₃ OD, 400 MHz) comparados com a literatura (CDCl ₃ , 200 MHz) (BASTIDA, CODINA, VILADOMAT <i>et al</i> , 1990).....	99

Tabela 16 – Dados de RMN ¹ H do composto 11 (CD ₃ OD, 400 MHz) comparados com a literatura (CDCl ₃ , 400 MHz) (LAMORAL-THEYS, ANDOLFI, VAN GOIETSENOVEN et al, 2009)	105
Tabela 17 – Atividades antiparasitárias e citotóxica dos alcaloides isolados, 1 , 2 , 6 , 7 e 8 , realizadas pelo método MTT.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

AChE – acetilcolinesterase

AcOEt – acetato de etila

ax – axial

br – largo

$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ – piridina deuterada

CCD – cromatografia em camada delgada

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CD_3OD – metanol deuterado

CDCl_3 – clorofórmio deuterado

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH_2Cl_2 – diclorometano

CH_3COCH_3 – acetona

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLV – cromatografia líquida a vácuo

d – dubleto

DC – dicroísmo circular

dd – duplo dubleto

ddd – duplo duplo dubleto

DMSO – dimetilsulfóxido

DMSO- d_6 – dimetilsulfóxido deuterado

eq – equatorial

h – altura

H_2SO_4 – ácido sulfúrico

HABA – *Hippeastrum aulicum* bulbo acetato de etila

HABAc+Me – *Hippeastrum aulicum* bulbo acetato de etila e metanol

HABH – *Hippeastrum aulicum* bulbo hexano

HAFa – *Hippeastrum aulicum* folha acetato de etila

HAFAc+Me – *Hippeastrum aulicum* folha acetato de etila e metanol

HAFH – *Hippeastrum aulicum* folha hexano

Hex – hexano

Hz – hertz

IV – infravermelho

m – multiplete

m/z – relação massa/carga

Me – metil

MeOH – metanol

mg – miligrama

MHz – mega hertz

mL – mililitro

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio

NH₃ – amônia

NH₄OH – hidróxido de amônio

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

q – quadruplete

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono 13.

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s – singleto

SBF – soro bovino fetal

td – triplo dubleto

tdd – triplo duplo dubleto

UV – ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

ε – absorvidade molar

J – constante de acoplamento

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

α – alfa

β – beta

δ – deslocamento químico em partes por milhão

ϕ – diâmetro

RESUMO

As espécies da família Amaryllidaceae estão distribuídas em regiões quentes e temperadas ao redor do mundo. Essa família produz um grupo bem conhecido de alcaloides, os isoquinolínicos, que demonstram ampla variedade de atividades biológicas, assim como antiviral, anticâncer, inibição da acetilcolinesterase (AChE), antimalárica, entre outras. Nesse trabalho, são relatados o estudo químico dos alcaloides presentes na espécie brasileira *Hippeastrum aulicum* e a investigação de atividades antiparasitárias contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* dos alcaloides isolados. Para tanto, foi realizada extração ácido-base dos extratos metanólicos de bulbos e folhas de *H. aulicum*, seguida por técnicas cromatográficas de separação, com o objetivo de isolar os alcaloides presentes na espécie. Foram obtidos 11 alcaloides: haemantamina (1), albomaculina (2), haemantidina (3), 6-epihaemantidina (4), *N*-óxido haemantamina (5), 7-metoxi-*O*-metillicorenina (6), aulicina (7), licorina (8), trisfaeridina (9), galantina (10) e norpluvina (11). O *N*-óxido haemantamina é relatado pela primeira vez a partir de fonte natural e nesse trabalho foi totalmente caracterizado por métodos espectrométricos e espectroscópicos. Os alcaloides 1, 2, 6, 7 e 8 foram testados *in vitro* contra os parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* em diferentes concentrações e haemantamina (1) apresentou-se como importante agente contra a forma promastigota de *L. infantum* com IC₅₀ de 0,6 µM, enquanto 7-metoxi-*O*-metillicorenina (6) mostrou atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, sendo mais ativo (IC₅₀ = 89,55 µM) e mais seletivo (IS > 2,2) que o padrão utilizado (benzonidazol, IC₅₀ = 440,7 µM, IS = 1,0).

Palavras-chave: Amaryllidaceae, *Hippeastrum*, alcaloides, *N*-óxido haemantamina, antiparasitários.

ABSTRACT

The species of Amaryllidaceae family are found in warm and tropical regions around the world. This family produces a well-known group of isoquinolines alkaloids which have demonstrated a wide range of biological activities such as antiviral, anticancer, acetylcholinesterase (AChE) inhibition, antimalarial, among others. In this paper it is going to be reported the chemical study of alkaloids present in the Brazilian species *Hippeastrum aulicum* and the investigation of antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* of the isolated alkaloids. In order to conclude the study and investigation it was performed classical acid-base extraction of methanol extracts of bulbs and leaves of *H. aulicum*, followed by chromatographic separation techniques. 11 alkaloids were obtained: haemanthamine (1), albomaculine (2), haemanthidine (3), 6-epihaemanthidine (4), haemanthamine *N*-oxide (5), 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (6), aulicine (7), lycorine (8), trisphaeridine (9), galanthine (10) and norpluvine (11). Haemanthamine *N*-oxide was obtained for the first time from natural source and it has been characterized by spectrometric and spectroscopic methods. The alkaloids 1, 2, 6, 7 and 8 were tested *in vitro* against parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* in different concentrations. Haemanthamine (1) showed to be an important agent against promastigote form of *L. infantum* with IC_{50} of 0,6 μ M while 7-methoxy-*O*-methyllycorenine (6) displayed activity against trypomastigote forms of *T. cruzi*, which is more active ($IC_{50} = 89,55 \mu$ M) and more selective ($IS > 2,2$) than the standard (benzonidazol, $IC_{50} = 440,7 \mu$ M, $IS = 1,0$).

Keywords: Amaryllidaceae, *Hippeastrum*, alkaloids, haemanthamine *N*-oxide, antiparasitic compounds.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	18
1.1 – Utilização e importância dos produtos naturais.....	18
1.2 – A família Amaryllidaceae.....	21
1.2.1 – Alcaloides de Amaryllidoideae	22
1.3 – O gênero <i>Hippeastrum</i> Herb.	25
1.3.1 – <i>Hippeastrum aulicum</i> (Ker Gawl.) Herb	27
1.4 – Doenças parasitárias	28
2 – OBJETIVOS	31
2.1 – Objetivos gerais	31
2.2 – Objetivos específicos	31
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.1 – Materiais e equipamentos	32
3.2 – Coleta de <i>Hippeastrum aulicum</i>	33
3.3 – Preparação dos extratos	33
3.4 – Extração ácido-base	34
3.4.1 – Folhas.....	34
3.4.2 – Bulbos.....	35
3.5 – Fracionamento cromatográfico.....	36
3.5.1 – Folhas.....	36
3.5.1.1 – Fracionamento de HAFH.....	36
3.5.1.2 – Fracionamento de Hafa	38
3.5.2 – Bulbos.....	40
3.5.2.1 – Fracionamento de HABH.....	40
3.5.2.2 – Fracionamento de HABA	42
3.6 – Ensaio Biológico contra <i>Leishmania infantum</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
3.6.1 – Manutenção dos parasitas	45

3.6.2 – Células de Mamíferos	46
3.6.3 – Determinação da atividade contra a forma promastigota de <i>L.infantum</i> .46	
3.6.4 – Determinação da atividade contra a forma amastigota <i>L.infantum</i>	46
3.6.5 – Determinação da atividade contra a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	47
3.6.6 – Determinação da atividade contra a forma amastigota de <i>T. cruzi</i>	47
3.6.6 – Determinação da citotoxicidade em células de mamíferos.....	48
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 – Compostos isolados.....	52
4.1.1 – Composto 1.....	52
4.1.2 – Composto 2.....	59
4.1.3 – Compostos 3 e 4.....	64
4.1.4 – Composto 5.....	69
4.1.5 – Composto 6.....	82
4.1.6 – Composto 7.....	85
4.1.7 – Composto 8.....	89
4.1.8 – Composto 9.....	93
4.1.9 – Composto 10.....	96
4.1.10 – Composto 11.....	100
4.2 – Avaliação da atividade antiparasitária dos alcaloides isolados	105
5 – CONCLUSÃO.....	109
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1 – INTRODUÇÃO

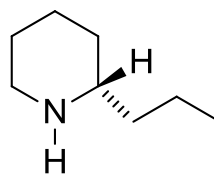
1.1 – Utilização e importância dos produtos naturais

Desde milhares de anos atrás a humanidade utiliza recursos naturais para os mais diversos fins, seja para sua alimentação, alívio de dores, cura de doenças, extração de corantes ou rituais religiosos. A utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, faz parte da história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Indícios também apontam para o uso de produtos naturais como drogas pelas antigas civilizações. No Equador, folhas de coca eram utilizadas há 5000 anos. (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002). Rapés e bebidas alucinógenas eram utilizados em rituais religiosos e de magia. O uso de *Papaver somniferum* é relatado desde a época dos Sumérios (4000 a.C.). O ópio, retirado dessa planta, possui conhecidas propriedades soporíferas e analgésicas (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Corantes naturais eram utilizados para fins estéticos, religiosos e de proteção. Civilizações indígenas americanas pintavam corpos e cabelos como forma de comunicação (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Os índios utilizavam o curare, um veneno natural, para produzir flechas envenenadas utilizadas na caça (PINTO, 1995). O veneno de Hemlock (*Conium maculatum*), cujo principal constituinte é a coniina (Figura 1), era utilizado na execução de prisioneiros durante o Império Grego. O veneno provocava paralisia muscular gradual seguida de convulsões e morte por paralisia respiratória (DEWICK, 2002).



Coniina

Figura 1: Estrutura química da Coniina

O conhecimento dos povos antigos e indígenas a respeito da natureza e a troca de experiências entre diferentes povos e culturas levaram ao desenvolvimento de estudos de produtos naturais e de pesquisas para encontrar os compostos químicos responsáveis pelas atividades biológicas observadas e/ ou relatadas (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

A maioria dos compostos orgânicos conhecidos é produzida pela natureza, sendo o reino vegetal o contribuinte mais significativo para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos deles com grande valor agregado (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002). Os metabólitos secundários são encontrados em organismos específicos, ou grupo de organismos e são uma expressão da individualidade das espécies (DEWICK, 2002). Apresentam-se como importantes matérias-primas para a produção de medicamentos (BARREIRO e BOLZANI, 2009) ou como modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002).

No século XVIII deu-se início ao isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal, sendo os séculos XVIII e XIX caracterizados pelos trabalhos de extração (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002). É dessa época o isolamento da morfina (Figura 2), constituinte majoritário do ópio (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006). A morfina é utilizada até os dias atuais, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), para o tratamento de dor intensa especialmente em casos de pacientes com câncer terminal (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Outros compostos com importantes atividades biológicas já foram isolados de plantas, como o taxol (Figura 2), isolado de *Taxus brevifolia*, utilizado no tratamento contra o câncer (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006) e a quinina (Figura 2), um antimalárico, isolado das cascas de espécies de *Cinchona*. Na região amazônica, as cascas de *Cinchona* foram muito utilizadas pelos índios para tratamento de febre e no início dos anos 1600 foram introduzidas na Europa para o tratamento da malária (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Um grande marco para a pesquisa de desenvolvimento de fármacos a partir de compostos obtidos de plantas foi a síntese do ácido acetilsalicílico (Aspirina®),

que utilizou como protótipo um produto natural isolado de *Salix alba* L., a salicina (Figura 2) (BRAGA e CASTILHO, 2011).

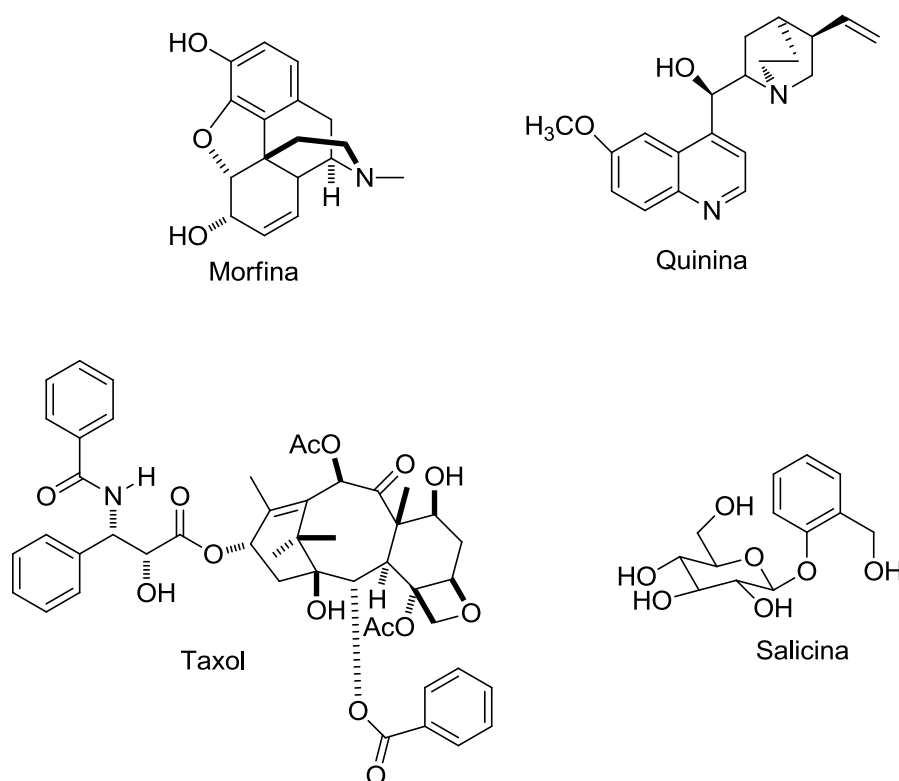


Figura 2: Exemplos de substâncias isoladas de plantas

Os produtos naturais ainda representam importantes fontes de pesquisa, uma vez que são fontes de compostos com estruturas químicas diversificadas, muitas vezes complexas, que apresentam atividades biológicas variadas sendo de grande importância para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos.

Uma análise feita por NEWMAN e CRAGG (2012) das fontes de novos fármacos no período de 1981-2010 revelou que somente 36 % dos novos compostos utilizados na terapêutica, com exceção de produtos biológicos e vacinas, podem ser classificados como verdadeiramente sintéticos, ou seja, não possuem inspiração de estruturas de origem natural.

A necessidade de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças demanda uma exploração vigorosa de todas as fontes para descoberta de medicamentos e a natureza desempenha um papel vital nesse processo (CRAGG e NEWMAN, 2013).

O Brasil apresenta importantes fontes de pesquisa, uma vez que possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do mundo, dispondo de imensa biodiversidade, sendo um celeiro para descoberta de novas substâncias de interesse biológico ou não (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002). Mesmo dispondo de grande diversidade de espécies vegetais ao longo de seu extenso território, apenas poucas destas espécies são estudadas a fim de identificar e isolar os compostos biologicamente ativos.

1.2 – A família Amaryllidaceae

Em 2009, CHASE, REVEAL e FAY reuniram as famílias Agapanthaceae, Alliaceae e Amaryllidaceae em uma única família denominada Amaryllidaceae e propuseram as subfamílias Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidoideae. Contudo, ainda é comum o uso do nome Amaryllidaceae para se referir às espécies da subfamília Amaryllidoideae.

A família Amaryllidaceae é uma família de monocotiledôneas que está largamente distribuída em regiões temperadas e quentes do mundo (JIN, 2011), possuindo pronunciados centros de diversidade na África do Sul e na região dos Andes (BASTIDA, BERKOV, TORRAS, *et al.*, 2011). É uma família de plantas bulbosas, muito utilizada em ornamentação devido à beleza de suas flores. Suas espécies são conhecidas popularmente como estrela do norte, bastão do imperador, açucena e lírio (HOFMANN JUNIOR, SEBEN, MONTANHA, *et al.*, 2004). Amaryllidaceae compreende três subfamílias, 73 gêneros e 1605 espécies (CANDIDO, FOURNY, GONÇALVES-ESTEVEZ *et al.*, 2013). No Brasil encontra-se distribuída por todo o território nacional, onde são reconhecidos 18 gêneros e 135 espécies (DUTILH e OLIVEIRA, 2015).

O uso de espécies de Amaryllidaceae como medicamento tem relatos desde a antiguidade. No século IV a.C., o óleo de *Narcissus poeticus* L. era utilizado pelo médico grego Hipócrates para o tratamento de câncer (PETTIT, GADDAMIDI, HERALD *et al.*, 1986). *Lycoris radiata* era utilizada na medicina popular chinesa para o tratamento de poliomielite (FENG, WANG, SU *et al.*, 2011) e *Crinum zeylanicum* L.

era usado no tratamento de reumatismo e de dor de ouvido (BERKOV, ROMANI, HERRERA *et al.*, 2011). Outras espécies de Amaryllidaceae também são usadas na medicina popular, com diversas atividades descritas, tais como antiviral, antiespasmódica e controle de doenças mentais (da SILVA, 2006). As atividades biológicas das espécies de Amaryllidaceae (subfamília Amaryllidoideae) são atribuídas aos alcaloides, que são seus principais constituintes.

Desde o isolamento de licorina a partir de *Lycoris*, em 1877, houve um grande progresso nos estudos de espécies de Amaryllidoideae. Mais de 500 alcaloides foram isolados ao longo das últimas três décadas, muitos dos quais apresentam significativas atividades biológicas (HE, QU, GAO *et al.*, 2015), tais como: inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (PAGLIOSA, MONTEIRO, SILVA *et al.*, 2010), antimalárica (SENER, ORHAN e SATAYAVIVAD, 2003), anticâncer (LUO, WANG, ZHANG *et al.*, 2012) e antiprotozoários (OSORIO, BERKOV, BRUN *et al.*, 2010).

1.2.1 – Alcaloides de Amaryllidoideae

Os alcaloides de Amaryllidoideae são comumente conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae, devido à antiga classificação das espécies. Esse grupo exclusivo de alcaloides é do tipo isoquinolínico e tem sido isolado de todos os gêneros da subfamília e, a maioria deles não é conhecida por ocorrer em plantas de outras famílias (BASTIDA, BERKOV, TORRAS *et al.*, 2011).

Alcaloides isoquinolínicos de Amaryllidoideae são derivados dos aminoácidos L-tirosina e L-fenilalanina, que dão origem ao intermediário chave O-metilnorbeladina. E, após diversos tipos de acoplamentos fenol oxidativos desse intermediário, são geradas as estruturas químicas básicas dos alcaloides que ocorrem preferencialmente nesta subfamília (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006) (Figura 3).

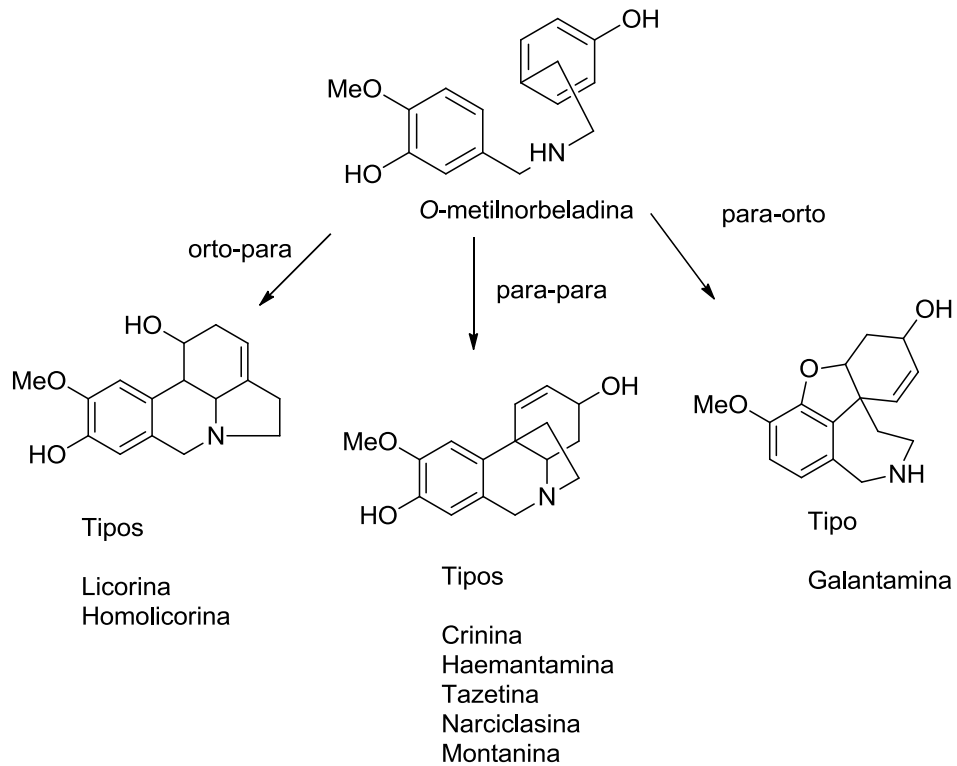


Figura 3: Acoplamentos fenol oxidativos em Amaryllidaceae (BASTIDA, BERKOV, TORRAS *et al.*, 2011)

As diversas estruturas dos alcaloides de Amaryllidoideae são classificadas, principalmente, em nove tipos de esqueletos: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina e galantamina (Figura 4) (BASTIDA, BERKOV, TORRAS *et al.*, 2011). E o sistema de numeração utilizado para as estruturas está de acordo com o proposto por GHOSAL, SAINI e RAZDAN (1985).

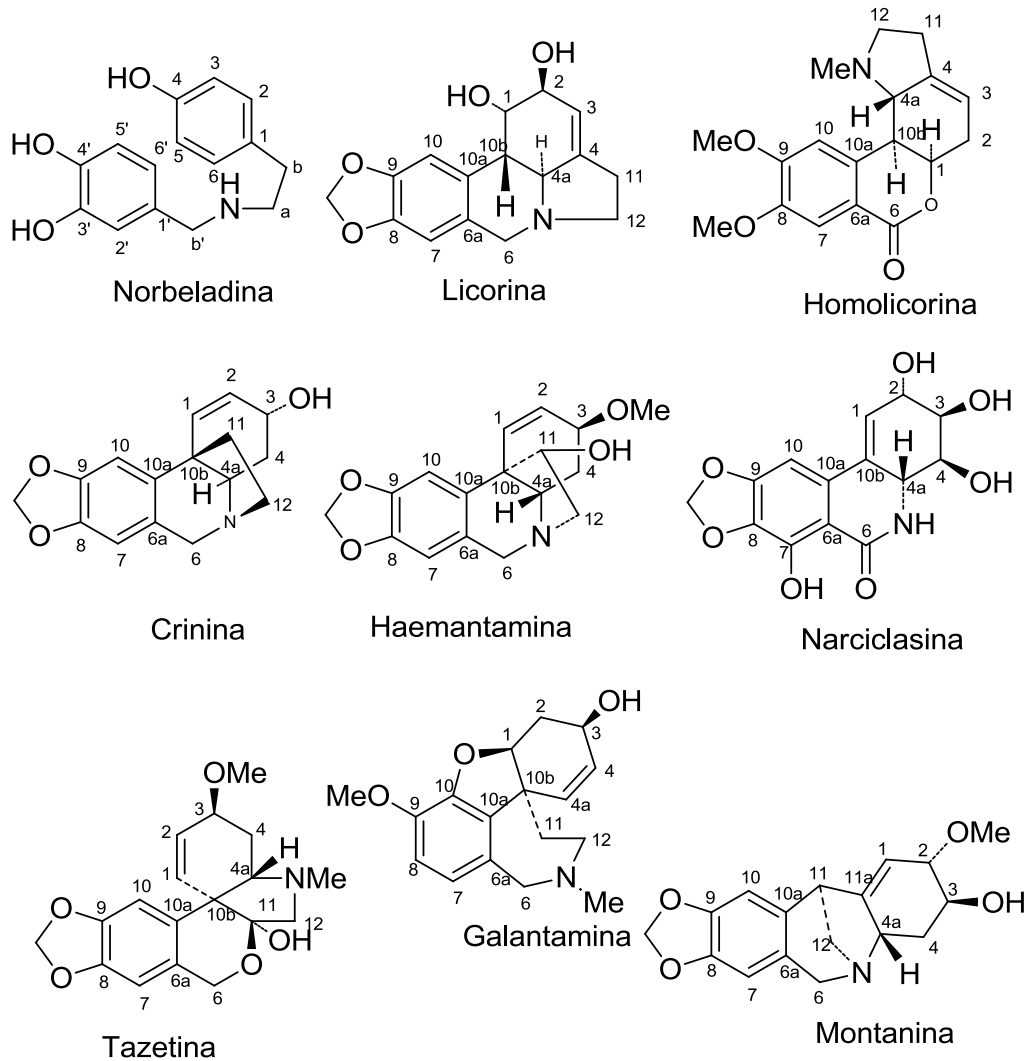


Figura 4: Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae (BASTIDA, BERKOV, TORRAS et al, 2011).

O alcaloide galantamina, inicialmente isolado de *Galanthus woronowii*, e atualmente obtido a partir de *Narcissus* sp. e *Leucojum aestivum*, assim como sinteticamente (GIORDANI, PAGLIOSA, HENRIQUES *et al.*, 2008), é um inibidor seletivo e reversível da enzima acetilcolinesterase, o que provoca um aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro e, por isso, é utilizado no tratamento da doença de Alzheimer (REYES-CHILPA, BERKOV, HERNANDEZ-ORTEGA *et al.*, 2011). Como resultado, em 2001, a galantamina foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para tratamento paliativo da doença de Alzheimer (GIORDANI, PAGLIOSA, HENRIQUES *et al.*, 2008). Atualmente, o bromidrato de galantamina é um fármaco comercializado como Razydine® e Reminyl® para os sintomas

cognitivos da doença (REYES-CHILPA, BERKOV, HERNANDEZ-ORTEGA *et al.*, 2011).

Com a confirmação da ação da galantamina no tratamento da Doença de Alzheimer houve um aumento nas buscas por novos compostos que possuam o esqueleto do tipo galantamina, uma vez que compostos que são estruturalmente relacionados podem ter propriedades farmacológicas semelhantes (REYES-CHILPA, BERKOV, HERNANDEZ-ORTEGA *et al.*, 2011). Além disso, a maior parte da galantamina utilizada em clínicas é fornecida a partir de fontes naturais, sendo assim, há um grande interesse em encontrar novas espécies de Amaryllidaceae para produção sustentável desse alcaloide (de ANDRADE, BERKOV, VILADOMAT *et al.*, 2011).

Através dos estudos fitoquímicos das espécies de Amaryllidoideae, outros alcaloides já demonstraram possuir atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase semelhantes ou mais potentes que a galantamina (IC_{50} 1,07 μ M, *in vitro*), como a sanguinina (IC_{50} 0,10 μ M), a 11-hidroxicgalantamina (IC_{50} 1,61 μ M) e 1-O-acetillicorina (IC_{50} 0,96 μ M) (HOUGHTON, REN e HOWES, 2006).

Além da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, outras atividades biológicas já foram confirmadas para os alcaloides de Amaryllidoideae. A licorina, por exemplo, possui uma variedade de atividades biológicas já relatadas, tais como: antifúngica (EVIDENTE, ANDOLFI, ABOU-DONIA *et al.*, 2004), antiparasitária (LIKHITWITAYAWUID, ANGERHOFER, CHAI *et al.*, 1993), anti-inflamatória (CITOGU, TANKER e GUMUSEL, 1998) e antiviral (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006). Estes fatos anteriormente relatados confirmam que espécies da família Amaryllidaceae são fontes importantes para a descoberta de novos compostos bioativos.

1.3 – O gênero *Hippeastrum* Herb.

O gênero *Hippeastrum* Herb., pertence à família Amaryllidaceae, subfamília Amaryllidoideae. Apresenta muitas espécies ornamentais no Brasil, com grande

variação de cor das suas flores (DUTILH, 2005). Comercialmente este gênero também é conhecido como *Amaryllis*, o que gera uma confusão na atribuição do gênero a determinadas espécies. O gênero *Amaryllis* possui descrição que se encaixa tanto para uma espécie encontrada na África do Sul, quanto para uma espécie encontrada nas Américas (DUTILH, 1987). Contudo, em estudos iniciais, foi determinado que as espécies que ocorressem na África devem ser pertencentes ao gênero *Amaryllis* e, as de ocorrências nas Américas, devem ser pertencentes ao gênero *Hippeastrum*. Ainda assim, ocorre muita confusão a respeito dessa classificação (CANDIDO, FOURNY, GONÇALVES-ESTEVES *et al*, 2013).

O nome do gênero é proveniente do grego *Hippos* = cavalo + *Astron* = estrela, devido ao aspecto peculiar de suas flores (AMARAL, 2006). O gênero *Hippeastrum* é endêmico da América do Sul (de ANDRADE, BERKOV, VILADOMAT *et al.*, 2011) e largamente distribuído no Brasil, apresentando 30 espécies, das quais 21 são endêmicas (DUTILH e OLIVEIRA, 2015). As espécies desse gênero aparecem em vários ambientes diferentes, como em pântanos, prados, árvores, rochas, perto da praia ou em altas montanhas (DUTILH, 2005).

Apesar de existirem poucos estudos envolvendo aspectos químicos e farmacológicos de espécies de *Hippeastrum*, em comparação aos demais gêneros de ocorrência na Europa e Ásia (GIORDANI, PAGLIOSA, HENRIQUES *et al.*, 2008), alguns compostos bioativos importantes já foram descritos em espécies de *Hippeastrum* no sul do Brasil. Candimina, isolada de *H. morelianum*, apresentou citotoxicidade para o parasita *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI, VIEIRA, WEIZENMANN *et al.*, 2010). Montanina isolada de *H. vittatum* apresentou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (PAGLIOSA, MONTEIRO, SILVA *et al.*, 2010) e atividades psicofarmacológicas, como antidepressiva, anticonvulsiva e ansiolítica (da SILVA, de ANDRADE, BEVILAQUA *et al.*, 2006). Licorina, um alcaloide bem conhecido da família Amaryllidaceae, também já foi isolado a partir de espécies de *Hippeastrum*, onde demonstrou importante ação antioxidante (GIORDANI, PAGLIOSA, HENRIQUES *et al.*, 2008). As atividades biológicas relatadas para os alcaloides encontrados no gênero *Hippeastrum* têm impulsionado os estudos das espécies desse gênero, na busca por novas fontes de alcaloides biologicamente ativos.

1.3.1 – *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb

A espécie *Hippeastrum aulicum* (Figura 5) é endêmica do Brasil e apresenta-se distribuída nas regiões sul e sudeste do país (DUTILH e OLIVEIRA, 2015). É encontrada em mata úmida, epífita ou terrestre sobre húmus (DUTILH, 1987).



Figura 5: *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb (Fonte: Arquivo pessoal)

Em 2014, de ANDRADE e colaboradores isolaram os alcaloides licorina, nerinina, 7-metoxi-O-metillicorenina, galantamina, haemantamina, aulicina, 11-oxohaemantamina e tazetina (Figura 6), a partir dos bulbos de *Hippeastrum aulicum*. Desses, aulicina e 11-oxohaemantamina foram isolados pela primeira vez e ainda não possuem atividades biológicas relatadas.

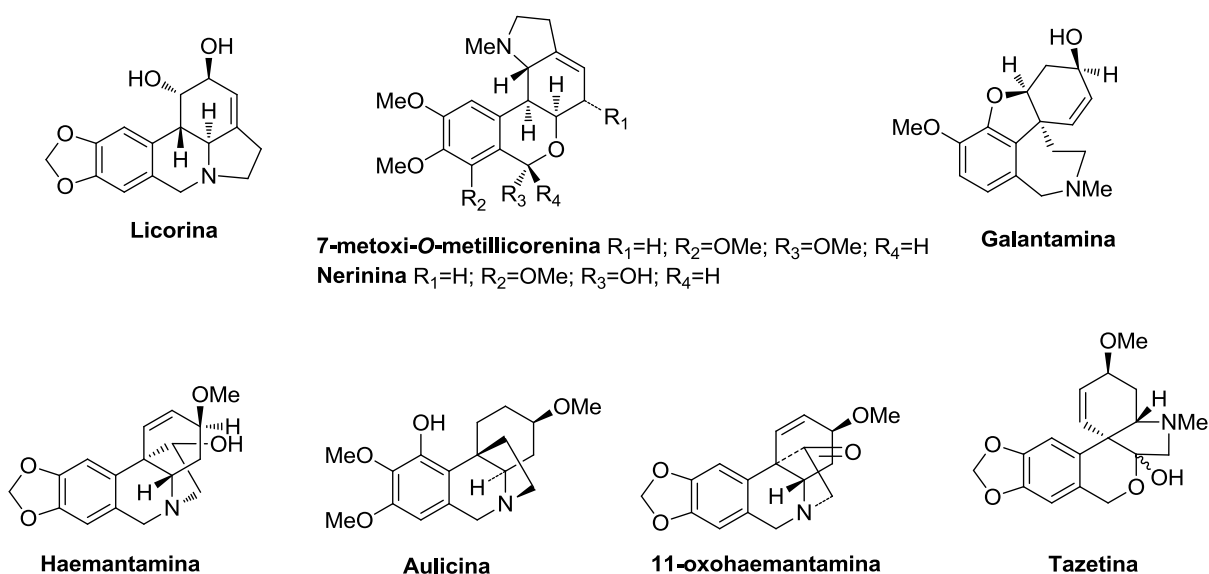


Figura 6: Estruturas dos alcaloides isolados de *Hippeastrum aulicum* por de ANDRADE e colaboradores (2014)

1.4 – Doenças parasitárias

Alcaloides de Amaryllidoideae demonstraram atividade antiparasitária ao serem testados, em ensaios *in vitro*, contra os protozoários causadores da malária, da doença do sono e da doença de Chagas (HERRERA, MACHOCHO, BRUN *et al*, 2001).

As doenças causadas por protozoários, assim como a doença de Chagas e a Leishmaniose, estão entre as infecções crônicas mais comuns em áreas rurais e urbanas de baixa renda em regiões tropicais e subtropicais do mundo (OSORIO, BERKOV, BRUN *et al.*, 2010).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, sendo a principal forma de transmissão através de vetores, que ocorre pela passagem do protozoário das fezes dos triatomíneos (barbeiro) através da pele ferida ou de mucosas do ser humano (BRASIL, 2010). Quando é eliminado pelas fezes do barbeiro, o parasita *Trypanosoma cruzi* apresenta forma alongada e com flagelo, que facilita o movimento, denominada tripomastigota. Os tripomastigotas metacíclicos ao entrarem no organismo do hospedeiro infectam as células próximas ao local da picada. Dentro da célula se transformam em uma forma ovóide e sem flagelo, os amastigotas, que se multiplicam rapidamente levando ao rompimento da célula. Os tripanossomídeos são espalhados na corrente sanguínea e voltam a ter a forma flagelada, desta forma, são disseminados pelo organismo e infectam mais células em novos ciclos. O barbeiro ao se alimentar do sangue dos vertebrados infectados, ingere o parasita na forma de tripomastigota sanguíneo, que se transformam em epimastigotas no intestino médio do inseto e passam a se multiplicar. No intestino posterior do inseto, essas formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos que vão ser eliminados juntamente com as fezes e urina durante o repasto sanguíneo, penetrando no organismo do vertebrado pela picada ou mucosas, renovando o ciclo de transmissão do parasita (ARGOLO, FELIX, PACHECO *et al.*, 2008).

No Brasil, essa doença atinge, principalmente, populações pobres que residem em situações precárias (NEVES, de MELO, LINARDI *et al.*, 2004). Estima-se que 10 milhões de pessoas no mundo são afetadas pela Doença de Chagas,

principalmente nas áreas endêmicas, como os países da América Latina (WHO, 2010).

A leishmaniose humana é causada por espécies do gênero *Leishmania*, protozoário membro do grupo dos hemoflagelados, que possuem reservatórios em roedores, cães, marsupiais e outros animais e, é transmitida por mosquitos infectados do gênero *Lutzomia* e *Phlebotomus* (ROCHA, ALMEIDA, MACEDO *et al.*, 2005). A transmissão ocorre pela picada da fêmea infectada, que ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, libera, juntamente com a saliva, as formas promastigotas metacíclicas do parasita. Os promastigotas que atingem o ferimento são fagocitados pelos macrófagos e por outras células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, os promastigotas transformam-se em amastigotas e multiplicam-se até rompimento dos mesmos. Amastigotas liberados são fagocitados por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo a disseminação para outras células do sistema fagocítico mononuclear. O vetor é infectado quando a fêmea do inseto alimenta-se de sangue de mamíferos infectados, pois ingerem macrófagos parasitados com a forma amastigota do parasita. Após o rompimento do macrófago no interior do inseto, as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas, que se multiplicam por processos de divisão binária e migram para a parte superior do inseto, de onde será liberada juntamente com a saliva do inseto durante um novo processo de repasto sanguíneo, dando início novamente ao ciclo do parasita (CDC, 2015), (REIMÃO, 2012).

Leishmaniose é uma doença predominantemente rural e são estimados 1,6 milhões de novos casos por ano, dos quais se estima que 500000 são viscerais (90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão) e 1,1 milhão são cutâneas (90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão e Síria) ou mucocutâneas (WHO, 2010).

A falta de interesse da indústria farmacêutica, a ausência de vacinas e o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos têm tornado a erradicação e o controle dessas doenças quase impossíveis (KAYA, SARIKAYA, ONUR *et al.*, 2011). A quimioterapia utilizada no combate a essas doenças não é satisfatória, uma vez

que apresenta falta de eficácia e toxicidade associada ao longo prazo de tratamento (OSORIO, BERKOV, BRUN *et al.*, 2010).

Devido à alta toxicidade e a resistência dos medicamentos utilizados para o tratamento de doenças parasitárias, identifica-se a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam mais eficazes e menos agressivos. Nesse contexto, as plantas aparecem como importantes fontes de pesquisa de candidatos a novos fármacos.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi o estudo dos alcaloides presentes em bulbos e folhas de *Hippeastrum aulicum*, uma espécie da família Amaryllidaceae, seguido de avaliação de atividade antiparasitária de alguns alcaloides isolados.

2.2 – Objetivos específicos

- Fazer extração ácido-base do extrato metanólico de folhas e bulbos de *Hippeastrum aulicum*;
- Isolar e identificar os alcaloides;
- Avaliar a atividade antiparasitária dos alcaloides isolados contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*.

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais e equipamentos

- A trituração do material foi feita em liquidificador Arno.
- Rotaevaporadores utilizados foram Buchi R-3 e Fisatom 801, acoplado à bomba de vácuo Vacuum Pump V-700 – Buchi, com controlador de pressão Vacuum Controller V-850 – Buchi.
- Os solventes utilizados para extração e partições foram hexano, acetato de etila, metanol, diclorometano, clorofórmio e acetona, de grau P.A. de diferentes marcas. Os utilizados em CLAE apresentavam grau HPLC e para análise de RMN foram utilizados solventes deuterados.
- Análise e separação por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em equipamento Agilent de bomba quaternária modelo G1311C-1260 e acoplado a detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD) modelo G1315D-1260.
- Cromatografia em camada delgada (CCD): placas de alumínio encobertas por sílica gel 60 F₂₅₄, Whatman analisadas sob radiação ultravioleta em câmara de UV da Camag, nos comprimentos de 254 e 366 nm e reveladas com Dragendorff.
- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP): placas de vidro, 20 x 20 cm, encobertas por sílica gel 60 F₂₅₄, Macherey-Nagel.
- Cromatografia líquida em coluna: fase estacionária sílica gel 60, 63-200 µm, Merck.
- Cromatografia líquida a vácuo (CLV): funil de placa sinterizada (7 cm de diâmetro) sobre kitassato acoplado à bomba de vácuo Buchi. Fase estacionária sílica gel 60 ACC, 6-35 µm, Chromagel-SDS.
- Espectrometria de massas de alta resolução: foi realizada em equipamento 9,4 T FT-ICRMS Solarix por injeção direta da amostra solubilizada em metanol.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): equipamento Varian 400 MHz, com sonda 5 mm ATB BroaBand ¹H/¹⁹F/X e TMS como padrão de referência.
- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM): cromatógrafo CG-17A Shimadzu, modelo GC-EM QP 5000, operando no modo EI a

70 eV usando coluna apolar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Programação da temperatura: 100–180 $^{\circ}\text{C}$ a 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 1 min em 180 $^{\circ}\text{C}$, 180–300 $^{\circ}\text{C}$ a 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e 40 min a 300 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura no injetor: 280 $^{\circ}\text{C}$. Fluxo de gás: 0,8 mL/min com gás hélio.

- Infravermelho foi realizado em equipamento Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer e as medidas foram realizadas num intervalo de comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} .
- UV foi realizado em equipamento UV-Perkin Elmer, Lambda 45, UV-Vis, utilizando metanol como solvente.
- Dicroísmo circular realizado em metanol em espectrofotômetro Jasco-J-810 (Easton, MD, USA).

3.2 – Coleta de *Hippeastrum aulicum*

Aproximadamente 1,7 kg de bulbos e 1 kg de folhas de *Hippeastrum aulicum* foram coletados no Estado de São Paulo na cidade de Biritiba-Mirim em setembro de 2013. Uma exsicata foi depositada no Herbário UEC, sob o número 114, onde foi feita a identificação do material botânico pela Dra. Renata Souza de Oliveira.

3.3 – Preparação dos extratos

Bulbos (1,7 kg) e folhas (1,0 kg) frescos de *Hippeastrum aulicum* foram, separadamente, triturados na presença de metanol. Todo o material foi submetido à maceração com metanol por 48 horas. Após esse período, o material vegetal foi filtrado em papel de filtro e novamente triturado com metanol e filtrado. Os filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório. Os extratos não foram secados completamente, originando aproximadamente 160 mL e 100 mL de extrato bruto de bulbos e folhas, respectivamente.

3.4 – Extração ácido-base

3.4.1 – Folhas

Ao extrato bruto de folhas foi adicionado, pouco a pouco, H_2SO_4 (ácido sulfúrico) 2 % até pH 2. A solução ácida foi lavada com hexano (7 x 150 mL). A parte aquosa foi alcalinizada com NH_4OH (hidróxido de amônio) 25 % até pH 10 e, em seguida, extraída com hexano (5 x 150 mL), acetato de etila (15 x 150 mL) e uma mistura de acetato de etila e metanol (3:1) (2 x 150 mL), originando as frações HAFH, HAFA e HAFAc+Me, respectivamente. A figura 7 ilustra o procedimento de extração descrito.

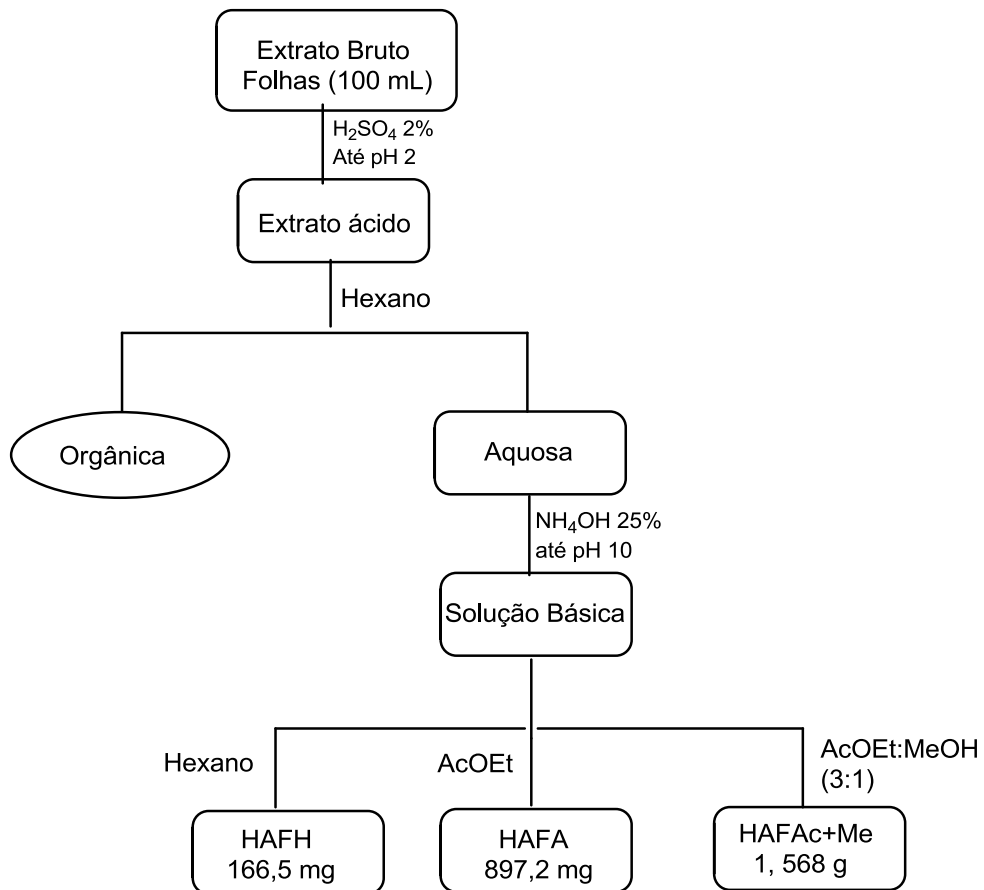


Figura 7 :Processo de extração ácido-base do extrato de folhas

3.4.2 – Bulbos

Foi adicionado H_2SO_4 2 % ao extrato bruto de bulbos até pH 2. A solução ácida foi lavada com éter etílico (4 x 200 mL) e com hexano (5 x 200 mL). À parte aquosa foi adicionado NH_4OH 25 % até pH 10. A solução alcalina foi extraída com hexano (5 x 200 mL), acetato de etila (15 x 200 mL) e uma mistura de acetato de etila e metanol (3:1) (3 x 200 mL), originando as frações HABH, HABA, HABAc+Me, respectivamente (Figura 8).

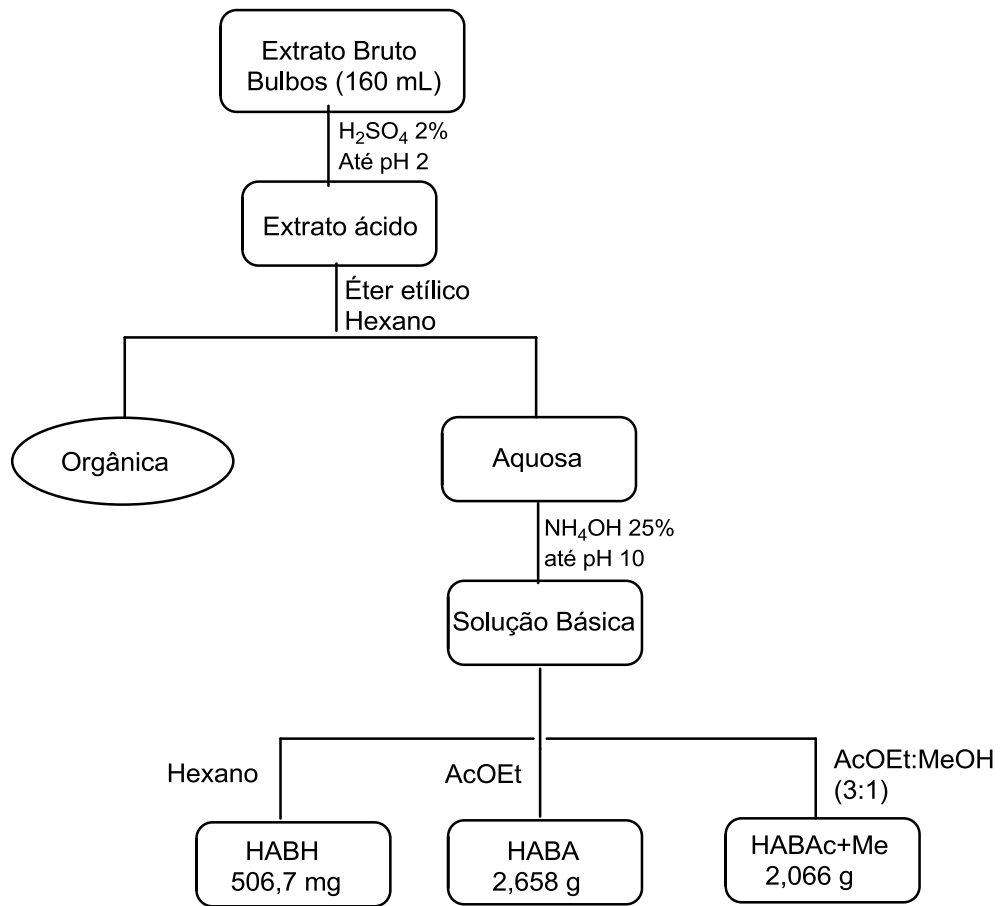


Figura 8: Processo de extração ácido-base do extrato de bulbos

3.5 – Fracionamento cromatográfico

As frações hexano, acetato de etila e acetato de etila:metanol (3:1) de folhas e bulbos foram analisadas por CG-EM para identificação prévia dos alcaloides presentes em cada fração. Os resultados foram comparados com uma biblioteca de espectros de alcaloides que é constantemente atualizada. Foram identificados 26 alcaloides nas frações hexano e acetato de etila das duas partes estudadas. As frações acetato de etila:metanol (3:1) apresentaram apenas traços de poucos alcaloides e por isso, optou-se por não dar continuidade no estudo dos alcaloides dessas frações.

As frações obtidas dos extratos de bulbos e folhas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como eluente os solventes acetato de etila, hexano, diclorometano, acetona e metanol em diferentes proporções, observadas sob luz UV (254 nm e 365 nm) e reveladas com reagente de Dragendorff.

3.5.1 – Folhas:

3.5.1.1 – Fracionamento de HAFH:

A fração hexano de folhas (HAFH) foi fracionada por cromatografia em coluna usando sílica como fase estacionária e como eluente, uma mistura de hexano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções. O processo de eluição foi gradiente. As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em seis subfrações (Figura 9).

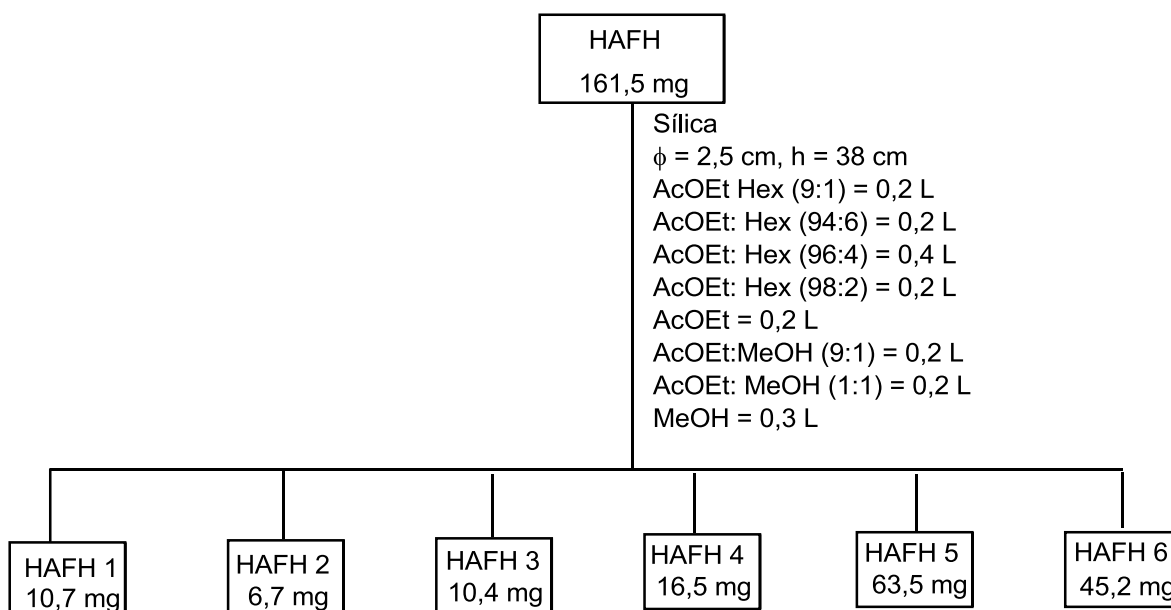


Figura 9: Fracionamento da amostra HAFH em cromatografia em coluna

As subfrações HAFH 1 – 6 foram analisadas por CCD. HAFH 5 e HAFH 6 apresentaram teste positivo para presença de alcaloides ao serem reveladas com Dragendorff.

- HAFH 5: Ao ser ressuspensa em metanol houve a formação de um precipitado branco (HAFH 5.1; 5 mg). O precipitado foi analisado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e denominado composto **1**. O sobrenadante foi purificado por CLAE, utilizando como fase estacionária uma coluna semi-preparativa de fase normal (Zorbax RX-Sil, 9,4 x 250 mm), e como fase móvel uma mistura de isopropanol, acetato de etila e hexano (5:4:1) com vazão de 3 mL.min $^{-1}$. Desta forma, foram isolados mais 15 mg do composto **1**.

- HAFH 6: Esta subfração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando, como fase móvel, uma mistura de hexano: acetato de etila: acetona: metanol: isopropanol (5:2:2:1:2) em atmosfera de amônia. Foram isolados 5,9 mg de um sólido que foi analisado por RMN ^1H (composto **2**).

3.5.1.2 – Fracionamento de HAFA:

A fração acetato de etila de folhas (HAFA) foi submetida à cromatografia em coluna usando sílica como fase estacionária e AcOEt:MeOH (49:1) e MeOH puro como fase móvel. As amostras coletadas foram combinadas por similaridade, o que resultou em 11 subfrações, denominadas HAFA 1 – 11(Figura 10). Todas as subfrações foram analisadas por CCD e HAFA 9, HAFA 10 e HAFA 11 apresentaram resultado positivo para presença de alcaloides ao serem reveladas com Dragendorff.

- HAFA 9: Esta subfração foi ressuspensa em metanol e houve a formação de um precipitado branco, denominado HAFA 9.1 (228,2 mg), que foi enviado para análise por RMN ^1H (composto **1**). O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna usando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de AcOEt:MeOH (23:2) e NH_4OH como eluente. A polaridade do eluente foi aumentada durante a eluição (Figura 10). As subfrações foram analisadas por CCD e reveladas com Dragendorff, onde se observou a presença de alcaloides na subfração HAFA 9.8.

- ✓ HAFA 9.8: foi ressuspensa em metanol e houve o depósito de um sólido branco, HAFA 9.8.1 (66 mg), que foi enviado para análise por RMN ^1H (composto **1**). O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna, onde a fase estacionária foi sílica gel e o eluente, uma mistura de AcOEt:MeOH (9:1) (Figura 10). O sistema de eluição foi gradiente e a polaridade foi aumentada acrescentando mais metanol à mistura. Após serem combinadas, doze subfrações foram obtidas, HAFA 9.8.2 – 9.8.13, das quais HAFA 9.8.8 e HAFA 9.8.10 resultaram em sinal positivo para a presença de alcaloides ao serem reveladas com Dragendorff .

- HAFA 9.8.8: foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa usando a mistura de acetato de etila, diclorometano, acetona, metanol, hexano (2:2:2:1:1) e gotas de NH_4OH como fase móvel, em atmosfera de NH_3 . Foram obtidos 13,5 mg ($R_f = 0,47$) de um produto, que ao ser analisado por RMN ^1H , foi observado que se tratava de uma mistura de epímeros, os compostos **3** e **4**.

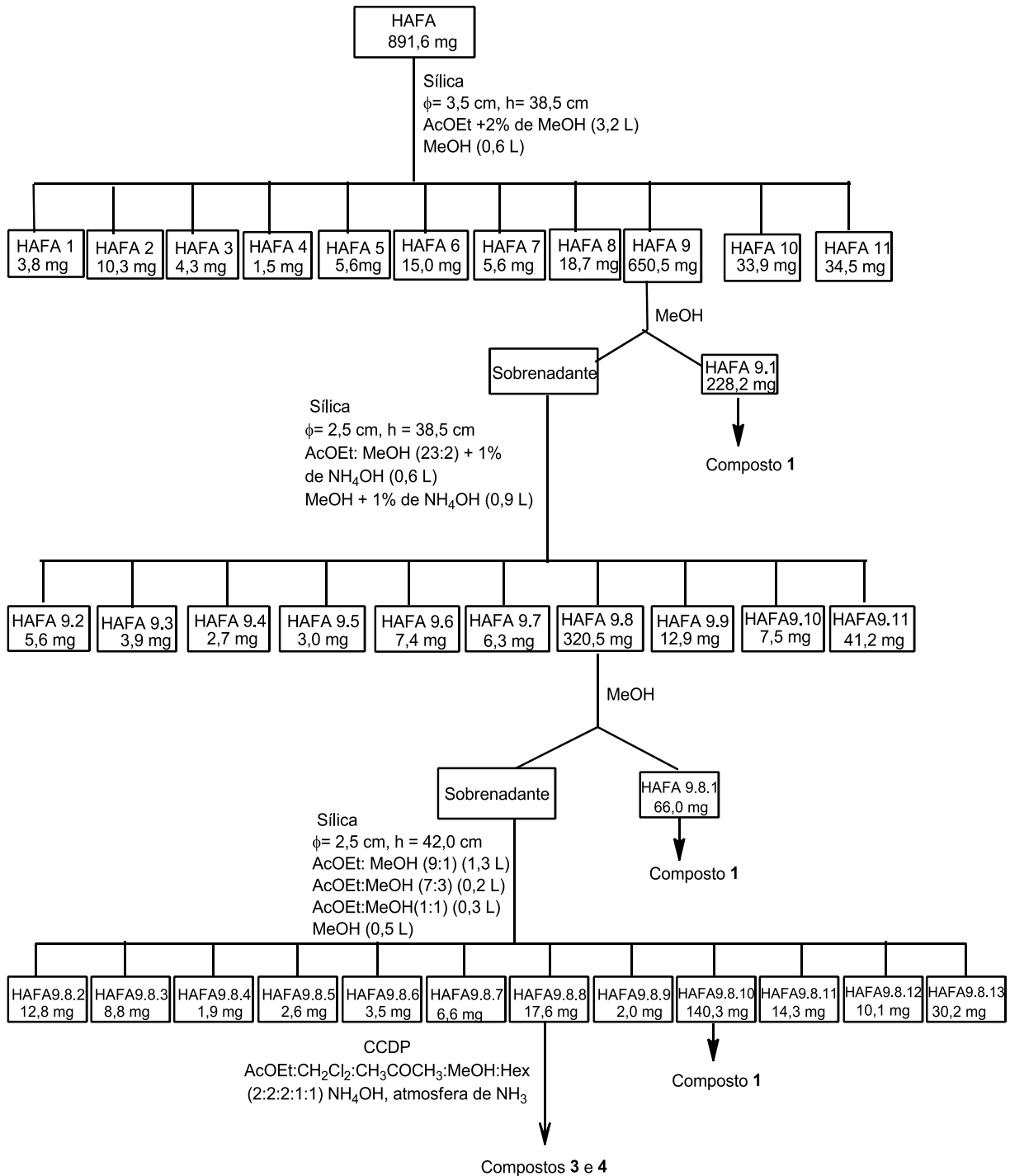


Figura 10: Fracionamento cromatográfico da amostra Hafa

- HAFA 10 e HAFA 11: Estas duas sufrações foram submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando como fase móvel uma mistura de hexano, acetato de etila, acetona, metanol e butanol (4:3:3:2:1), as subfrações obtidas foram analisadas por RMN ¹H e encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Subfrações obtidas a partir de CCDP de HAFA 10 e HAFA 11

Fração	Massa	Rf	
HAFA 10.1	3,0 mg	0,01	
HAFA 10.2	4,4 mg	0,09	
HAFA 10.3	10,1 mg	0,24	→ Composto 5
HAFA 10.4	5,3 mg	0,53	
HAFA 10.5	4,3 mg	0,71	
HAFA 10.6	5,7 mg	0,88	→ Composto 6
HAFA 11.1	3,8 mg	0,01	
HAFA 11.2	5,5 mg	0,08	
HAFA 11.3	4,3 mg	0,21	
HAFA 11.4	5,4 mg	0,53	
HAFA 11.5	6,7 mg	0,71	
HAFA 11.6	6,5 mg	0,88	→ Composto 6

3.5.2 – Bulbos:

3.5.2.1 – Fracionamento de HABH:

A fração hexano de bulbos (HABH) foi submetida à cromatografia em coluna usando sílica gel como fase estacionária e foi eluída, inicialmente, com uma mistura de acetato de etila, metanol, diclorometano (3:1:1) e gotas de hidróxido de amônio. A polaridade foi gradualmente aumentada enriquecendo a mistura com MeOH e diminuindo a quantidade de AcOEt (Figura 11). As subfrações foram coletadas, analisadas por CCD e reunidas em 18 subfrações. Das quais HABH 9, HABH 10 e HABH 11 apresentaram teste positivo para presença de alcaloides ao serem reveladas com Dragendorff.

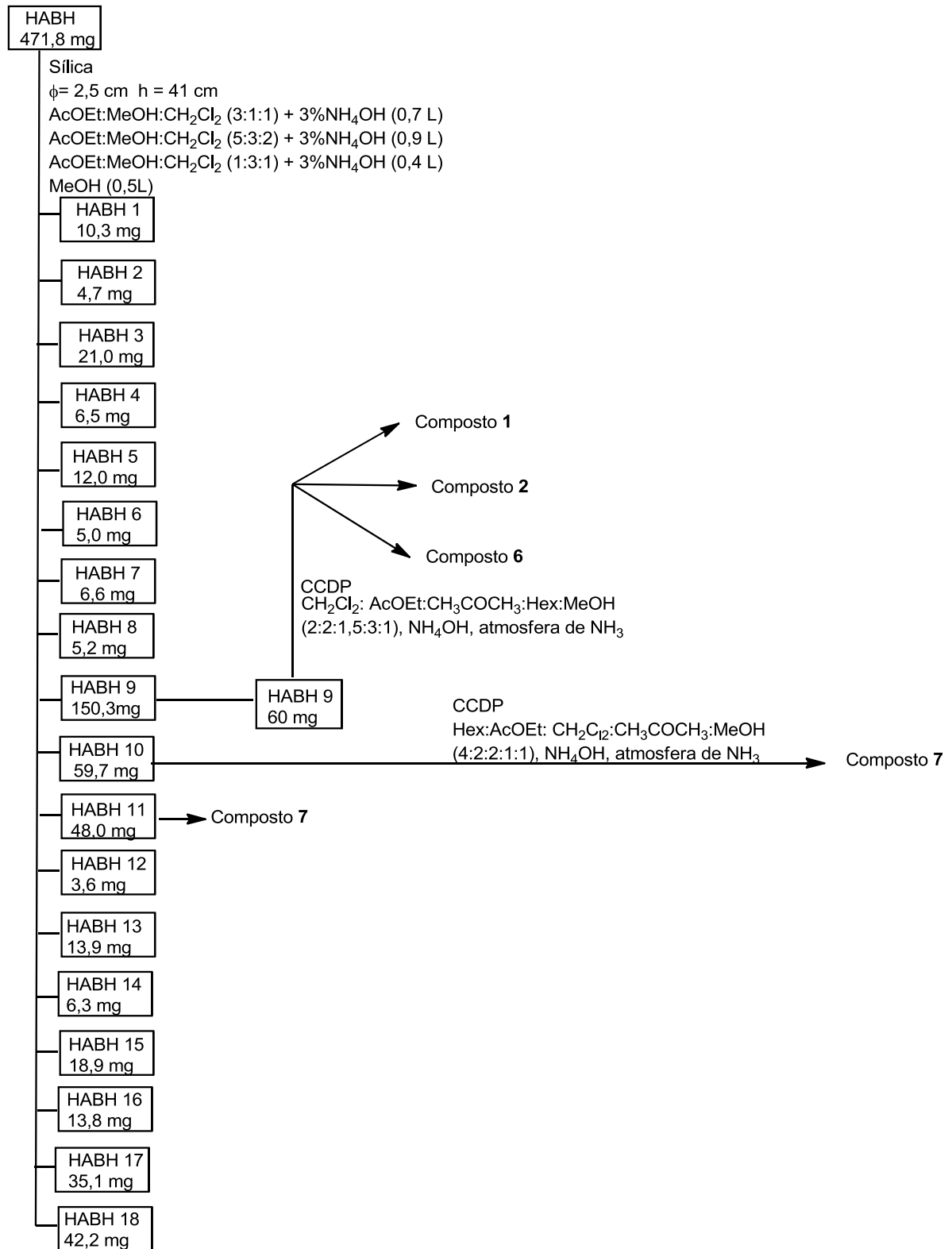


Figura 11: Fracionamento cromatográfico da amostra HABH

- HABH 9: foi realizada cromatografia em camada delgada preparativa de 60 mg desta subfração a fim de separar os alcaloides. O sistema eluente utilizado foi uma mistura de diclorometano, acetato de etila, acetona, hexano, metanol (2:2:1,5:3:1), gotas de NH_4OH e atmosfera de NH_3 . Foram obtidos três compostos conforme observado na tabela 2. Os três compostos foram analisados por RMN ^1H .

Tabela 2: Subfrações obtidas no fracionamento de HABH 9

Fração	Massa	Rf	
HABH 9.1	6,5 mg	0,41	→ Composto 1
HABH 9.2	3,5 mg	0,62	→ Composto 2
HABH 9.3	8,0 mg	0,74	→ Composto 6

- HABH 10: Esta subfração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, usando uma mistura de hexano, acetato de etila, diclorometano, acetona, metanol (4:2:2:1:1) e gotas de NH_4OH como eluente. O processo cromatográfico foi realizado em atmosfera de NH_3 e originou 4 subfrações (Tabela 3). As subfrações foram analisadas por RMN ^1H .

Tabela 3: Subfrações obtidas no fracionamento de HABH 10

Fração	Massa	Rf	
HABH 10.1	2,7 mg	0,01	
HABH 10.2	4,4 mg	0,28	
HABH 10.3	15,2 mg	0,51	→ Composto 7
HABH 10.4	3,9 mg	0,73	

3.5.2.2 – Fracionamento de HABA:

A fração acetato de etila de bulbos (2,6589 g) foi ressuspensa em metanol e houve o depósito de um sólido branco (HABA1, 160,7 mg) que foi analisado por RMN ^1H e denominado composto **8**. O sobrenadante foi submetido à cromatografia líquida a vácuo (CLV). Iniciou-se a cromatografia usando 100 % de hexano como eluente e, a polaridade foi aumentada adicionando-se acetato de etila até chegar a 100 % de acetato de etila e finalmente, metanol foi adicionado até chegar a 50 % de

metanol. Após análises das amostras coletadas, estas foram reunidas, por similaridade, em 12 subfrações, HABA 2-13 (Tabela 4). A presença de alcaloides foi confirmada por Dragendorff nas subfrações HABA 5 e HABA 13.

Tabela 4: Subfrações obtidas no fracionamento de HABA

Frações	Massa	Frações	Massa
HABA 2	16,1 mg	HABA 8	38,8 mg
HABA 3	10,9 mg	HABA 9	23,4 mg
HABA 4	9,5 mg	HABA 10	24,9 mg
HABA 5	9,0 mg	HABA 11	26,7 mg
HABA 6	2,4 mg	HABA 12	30,1 mg
HABA 7	9,5 mg	HABA 13	1,17 g

- HABA 5: foi purificada por CLAE, utilizando como fase estacionária uma coluna analítica de fase normal (RX-Sil, 4,6 x 250 mm) e como fase móvel uma mistura de acetato de etila e hexano (8:2) com vazão de 0,25 mL.min⁻¹. Obteve-se 1,5 mg de um composto que foi analisado por RMN ¹H e denominado composto **9**.

- HABA 13: esta subfração foi ressuspendida em metanol e um sólido branco (HABA 13.1, 251,6 mg) precipitou espontaneamente. O precipitado foi analisado por RMN ¹H e denominado composto **1**. O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna. A fase estacionária utilizada foi sílica gel e a eluição começou com uma mistura de acetato de etila, acetona, hexano, metanol e diclorometano (2:1:1:1:2). A polaridade do eluente foi aumentada gradativamente aumentando-se a quantidade de metanol. Foram obtidas 11 subfrações, denominadas HABA 13.2 – 13.12 (Figura 12). Análise por CCD, seguida de revelação com Dragendorff, indicou a presença de alcaloides nas subfrações HABA 13.7 – 13.10. A subfração HABA 13.8 foi analisada por RMN e corresponde ao composto **1**.

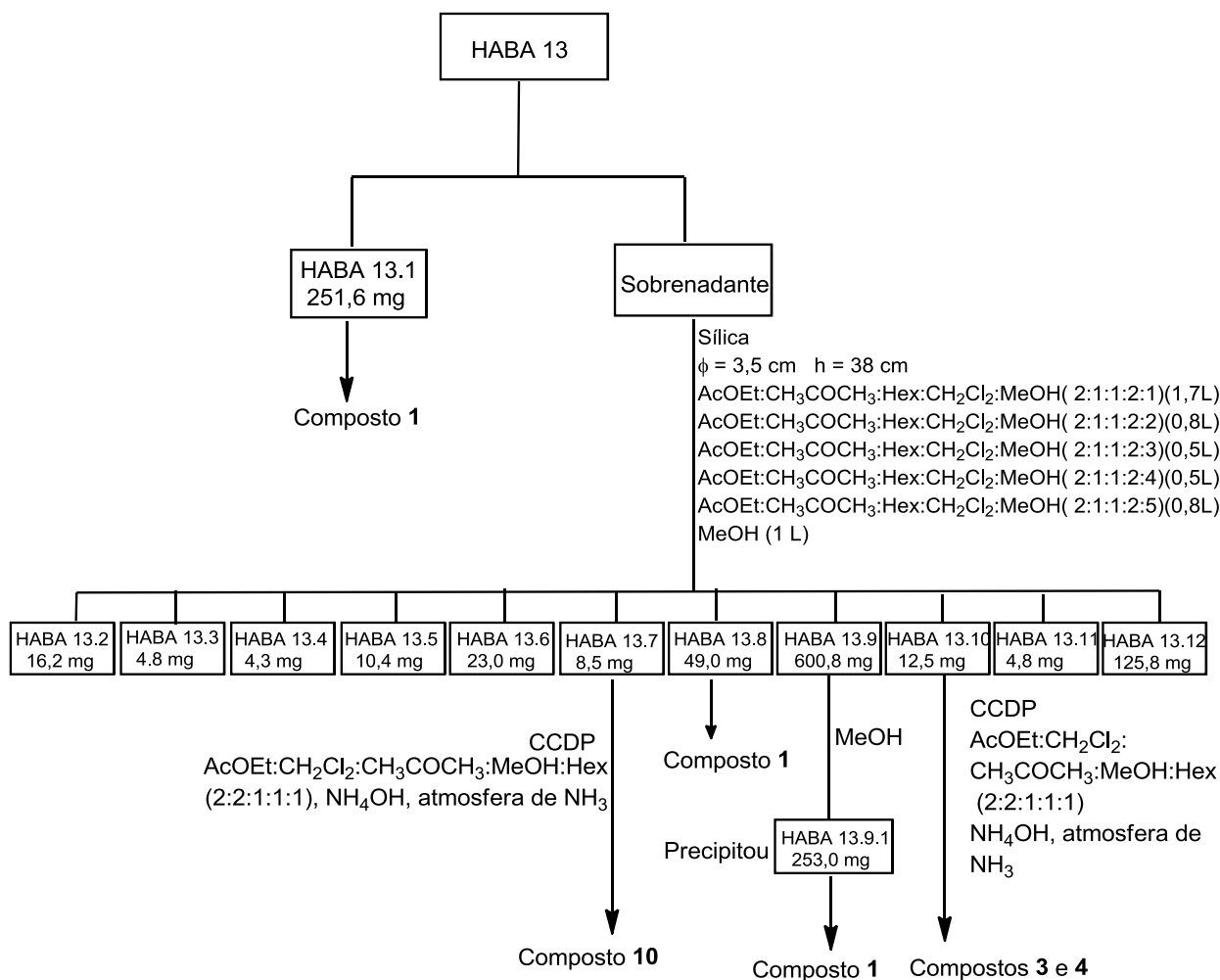


Figura 12: Fracionamento cromatográfico de HABA 13

- ✓ HABA 13.7: Esta subfração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando como eluente acetato de etila, diclorometano, acetona, metanol, hexano (2:2:1:1:1) e gotas de NH₄OH em atmosfera de NH₃. O composto obtido foi analisado por RMN ¹H e foi denominado composto **10** (3,6 mg, R_f = 0,20).
- ✓ HABA 13.9: esta subfração foi ressuspensa em metanol e houve o depósito de um sólido branco (253 mg) que foi analisado por RMN ¹H (composto **1**).
- ✓ HABA 13.10: esta subfração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, sendo o eluente uma mistura de acetato de etila,

diclorometano, acetona, metanol, hexano (2:2:1:1:1) e gotas de NH_4OH . A separação ocorreu em atmosfera de NH_3 e as subfrações obtidas encontram-se na tabela 5. Após análise por RMN ^1H , foi observado que a subfração HABA 13.10.2 correspondia aos compostos **3** e **4** e a subfração HABA 13.10.3 correspondia ao composto **11**.

Tabela 5: Subfrações obtidas no fracionamento de HABA 13.10

Fração	Massa	Rf	
HABA 13.10.1	2,8 mg	0,05	
HABA 13.10.2	3,5 mg	0,41	→ Compostos 3 e 4
HABA 13.10.3	1,5 mg	0,48	→ Composto 11
HABA 13.10.4	3,4 mg	0,63	

3.6 – Ensaios Biológicos contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios biológicos foram realizados pelo Instituto Adolfo Lutz, sob supervisão do Dr. André G. Tempone. Foram realizados testes contra as formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum*. A citotoxicidade foi testada para uma cultura de linhagem de células, NCTC.

3.6.1 – Manutenção dos parasitas

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972QLD) foram mantidos em meio M-199 suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) e 0,25 % de hemina a 24 °C. Amastigotas foram obtidos por meio de centrifugação diferencial de baços de hamsters previamente infectados. Tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) foram mantidos em células LLC-MK2 (ATCC CCL 7) em meio RPMI-1640 suplementado com 2 % de soro fetal bovino, a 37 °C, em estufa a 5 % de CO_2 .

3.6.2 – Células de Mamíferos

Macrófagos foram coletados a partir da cavidade peritoneal de fêmeas de camundongos BALB/c, por lavagem com meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 10 % de SBF. Células LLC-MK2 e NCTC (clone 929) foram mantidas em RPMI-1640 (sem vermelho de fenol e suplementado com 10 % de SBF) a 37 °C em estufa a 5 % de CO₂.

3.6.3 – Determinação da atividade contra a forma promastigota de *L.infantum*

Para determinar a concentração de 50 % de inibição (IC₅₀) contra a forma promastigota de *L. infantum*, os compostos **1**, **2**, **6**, **7** e **8** foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio M-199 em microplacas de 96 poços. Promastigotas de *L. infantum* foram contadas em um hemocitômetro Neubauer e semeadas a 1 x 10⁶/poço. Os compostos testados foram incubados com os parasitas em diferentes concentrações durante 24 horas a 24 °C. A viabilidade dos promastigotas foi determinada usando ensaio colorimétrico MTT a 550 nm (TADA, SHIHO, KUROSHIMA *et al.*, 1986). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Promastigotas incubadas sem os compostos ou DMSO foram utilizadas como controle (100% de viabilidade) e poços sem células foram utilizados como branco. Miltefosina foi utilizada como droga padrão.

3.6.4 – Determinação da atividade contra a forma amastigota *L.infantum*

Macrófagos peritoneais foram espalhados a 1x10⁵ células por poço em NuncTM 16 poços, durante 24 horas a 37°C, em estufa a 5% de CO₂. Amastigotas obtidos a partir de centrifugação diferencial de baços de hamsters infectados (STAUBER, FRANCHINO e GRUN, 1958) foram adicionados aos macrófagos na relação 10:1 (amastigotas/macrófagos) e incubados durante 24 horas. Parasitas não internalizados foram removidos através de lavagem com o meio. As células foram então incubadas com os compostos a serem testados durante 120 horas, a 37°C em 5% CO₂. Miltefosina foi utilizada como droga padrão. Ao final do ensaio, as células

foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico para determinar o número de macrófagos infectados (TEMPONE, OLIVEIRA, BERLINCK *et al.*, 2011).

3.6.5 – Determinação da atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*

Os compostos **1**, **2**, **6**, **7** e **8** foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio RPMI-1640 para determinar o IC₅₀. Tripomastigotas livres, obtidos a partir de culturas de células LLC-MK2, foram contados num hemocítmetro de Neubauer e adicionados (1 x 10⁶/poço) em microplacas de 96 poços. Os compostos testados foram incubados durante 24 horas a 37°C, em estufa a 5% de CO₂. O benzonidazol foi utilizado como droga padrão. A viabilidade dos tripomastigotas foi baseada na conversão celular do sal solúvel, MTT, no insolúvel, formazan, por enzimas mitocondriais (LANE, RIBEIRO-RODRIGUES, SUAREZ *et al.*, 1996). A extração do formazan foi realizada com 10% de dodecilsulfato de sódio (10 % v/v) durante 18 h a 24 °C e, em seguida, realizou-se a leitura das placas em espectrofotômetro (TADA, SHIHO, KUROSHIMA *et al.*, 1986).

3.6.6 – Determinação da atividade contra a forma amastigota de *T. cruzi*

O efeito sobre a forma amastigota de *T. cruzi* foi realizada em macrófagos previamente infectados com tripomastigotas derivados de cultura celular. Os tripomastigotas foram adicionados aos macrófagos à razão 10:1 (parasita/macrófago) e incubou-se durante 24 horas. Os compostos **1**, **2**, **6**, **7** e **8** foram incubados com os parasitas durante 72 horas, a 37°C, em estufa com CO₂ a 5%. Ao final do ensaio, as células foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico para determinar o número de macrófagos infectados.

3.6.6 – Determinação da citotoxicidade em células de mamíferos

Células NCTC foram distribuídas (6×10^4 células/poço) em microplacas de 96 poços a 37°C a 5% de CO₂. As células foram incubadas com os compostos testados durante 48 horas, a 37°C. A viabilidade das células foi determinada por ensaio colorimétrico MTT a 570 nm (OLIVEIRA, MESQUITA, TEMPONE *et al.*, 2012). O índice de seletividade foi determinado considerando a razão: CC₅₀ células NCTC/IC₅₀ parasitas.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Hippeastrum aulicum* é endêmica do Brasil, contudo seu conteúdo alcaloídico ainda é pouco estudado. Em estudo recente foram isolados oito alcaloides dos bulbos de *Hippeastrum aulicum* (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al.*, 2014). No presente trabalho, além dos bulbos, também foi estudado o perfil alcaloídico das folhas desta espécie.

Os extratos brutos de folhas e bulbos foram submetidos a uma extração ácido-base a fim de se obter extratos enriquecidos em alcaloides. Em seguida, foram realizadas extrações com solventes de diferentes polaridades, dando origem às frações hexano, acetato de etila e acetato etila/metanol. Essas frações foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na Universidade de Barcelona e os resultados foram comparados com a biblioteca de alcaloides do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jaume Bastida.

Através das análises de CG-EM, em comparação com os dados da biblioteca, foram identificados 26 alcaloides nas frações hexano e acetato de etila de folhas e bulbos de *Hippeastrum aulicum* (Tabela 6, Figura 13). Haemantamina foi o alcaloide mais abundante nas frações acetato de etila tanto de folhas quanto de bulbos, enquanto aulicina foi o alcaloide mais abundante nas frações hexano.

As frações obtidas na extração com a mistura acetato de etila e metanol (3:1) também foram analisadas por CG-EM e apresentaram quantidades muito pequenas e misturas de poucos alcaloides e por isso não foram trabalhadas.

Tabela 6: Dados de CG-EM de *Hippeastrum aulicum*

Alcaloide	Bulbos (%)		Folhas (%)		M ⁺	EM
	Hex	AcOEt	Hex	AcOEt		
Haemantamina (1)	7,46	25,7	12,0	38,9	301(14)	272(100), 257(10), 240(16), 181(21), 214(12), 211(14), 128(8)
Albomaculina (2)	-	0,39	-	-	345(<1)	221(1), 193(1), 165(1), 110(10), 109(100), 108(25), 94(2), 82(3)
7-Metoxi-O-metillicorenina (6)	17,7	-	-	tr	361(<1)	330(8), 221(10), 191(2), 110(8), 109(100), 108(15), 94(2), 83(2)
Aulicina (7)	22,5	4,36	35,3	1,34	319(100)	304(19), 288(37), 246(18), 233(73), 218(19), 206(26), 163(7)
Licorina (8)	-	0,26	-	tr	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
Trisfaeridina (9)	0,06	0,17	0,06	0,23	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)
Galantina (10)	-	0,15	-	0,14	317(22)	316(15), 298(10), 268(18), 243(96), 242(100), 228 (8)
Galantamina (12)	3,27	2,21	0,20	tr ^a	287(83)	286(100), 270(13), 244(24), 230(12), 216(33), 174(27), 115(12)
Licoramina (13)	tr	tr	-	-	289(62)	288(100), 232(8), 202(14), 187(14), 159(9), 115(19)
Bufanisina (14)	tr	-	-	-	285(100)	270 (33), 254(34), 215 (85), 201(24), 172(19), 157(21), 115(33)
6-Metoxilicorenina (15)	0,33	-	-	-	331(<1)	300 (3), 191(8), 147(1), 110(8), 109(100), 94(3), 77(1)
Narwedina (16)	tr	tr	tr	-	285(84)	284(100), 242(18), 216(20), 199(18), 174(31), 128(16), 115(16)
Tazetina (17)	0,23	0,57	tr	0,26	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)
Homolicorina (18)	3,32	0,61	1,81	0,77	315(<1)	206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)
Epi-macronina (19)	tr	0,09	-	tr	329(27)	314(23), 245(100), 225(14), 201(83), 139(16), 70(18)
Ismina (20)	-	tr	-	tr	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)
Vitatina (21)	-	0,20	-	-	271(100)	228(25), 199(95), 187(85), 173(28), 128(32), 115(33), 56(22)
8-O-Demetilmaritidina (22)	-	0,46	-	0,35	273(100)	256(22), 230(20), 201(83), 189(42), 174(22), 128(23), 115(24)
11-Oxohaemantamina (23)	-	tr	-	tr	299(<1)	271(100), 270(37), 240(10), 238(10), 211(23), 181(77), 152(20)
11-Hidroxitatina (24)	-	0,22	-	0,17	287(5)	258(100), 211(15), 186(20), 181(23), 153(13), 128(24), 115(23)
Incartina (25)	-	0,45	tr	tr	333(42)	332(100), 315(25), 259(73), 258(97), 244(17), 242(6), 214(9), 172(45)
2 α -Metoxihomolicorina (26)	-	-	tr	-	345(<1)	206(<1), 178(2), 150(1), 139(100), 124(64), 96(5), 94(5), 81(3)
Crinamina (27)	-	-	0,16	-	301(<1)	272(100), 242(10), 211(17), 181(23), 153(14), 128(18), 115(16), 77(6)
8-O-Demetilhomolicorina (28)	-	-	8,70	-	301(<1)	195(0.5), 164(2), 109(100), 108(25), 94(3), 82(3)
Hamaina (29)	-	-	-	0,08	287(3)	258(100), 242(6), 211(12), 186(17), 181(11), 153(10), 128(19)
Nerinina (30)	-	0,31	-	-	347(<1)	222(1), 207(2), 179(1), 164(1), 110(8), 109(100), 108(18), 94(2)

a = traços<0,05

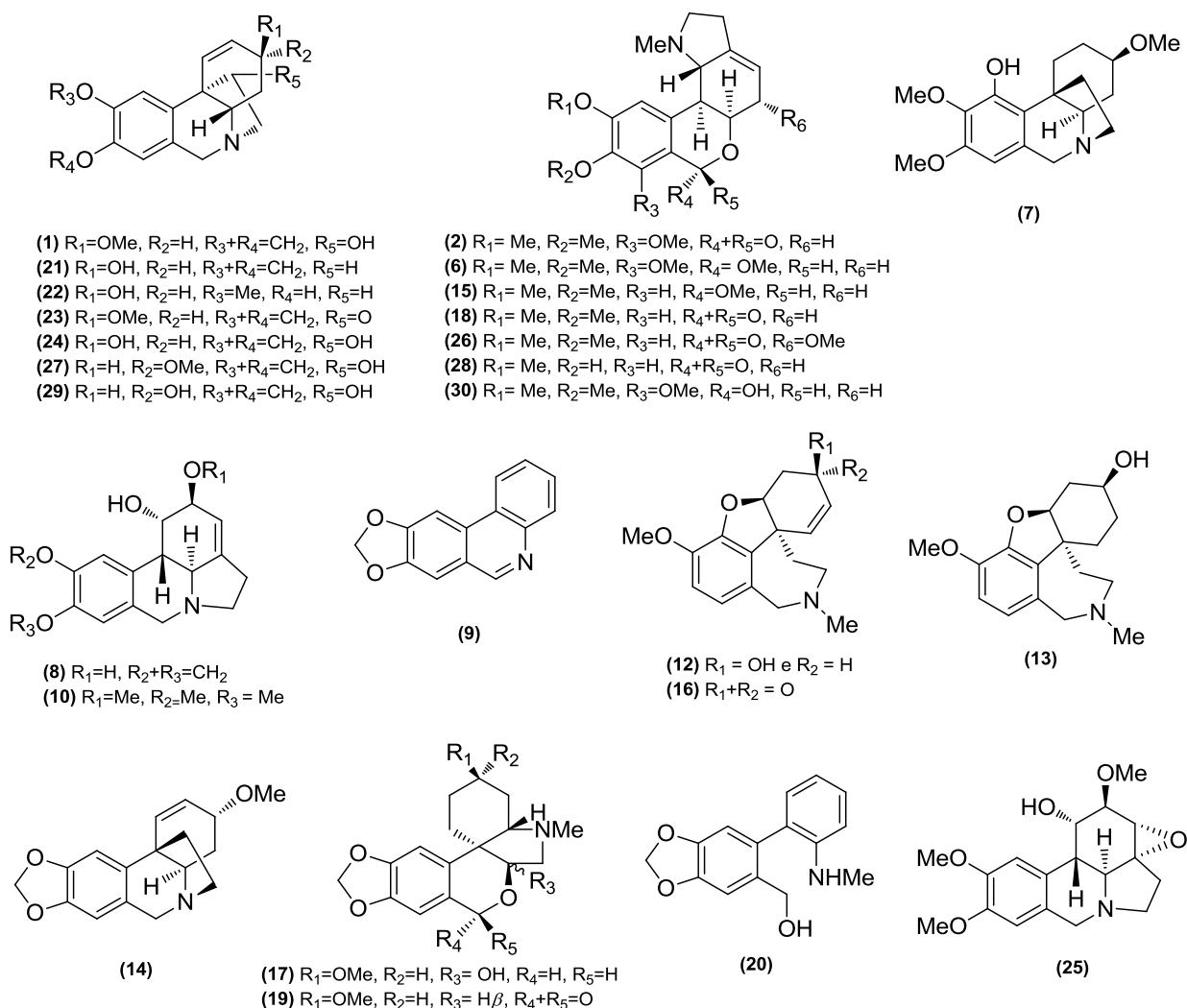


Figura 13: Estruturas dos alcaloides identificados por CG-EM em *Hippeastrum aulicum*

No presente trabalho, foram obtidos 11 compostos (Figura 14), todos pertencentes a classe dos alcaloides isoquinolínicos que, por análise e comparação dos dados de RMN com a literatura, foram identificados como: haemantamina (1), albomaculina (2), haemantidina (3), 6-epihaemantidina (4), *N*-óxido haemantamina (5), 7-metoxi-*O*-metilcorenina (6), aulicina (7), licorina (8), trisfaeridina (9), galantina (10) e norpluvina(11). Os alcaloides haemantamina, aulicina e licorina foram isolados em maior quantidade e o *N*-óxido haemantamina foi obtido pela primeira vez de fonte natural.

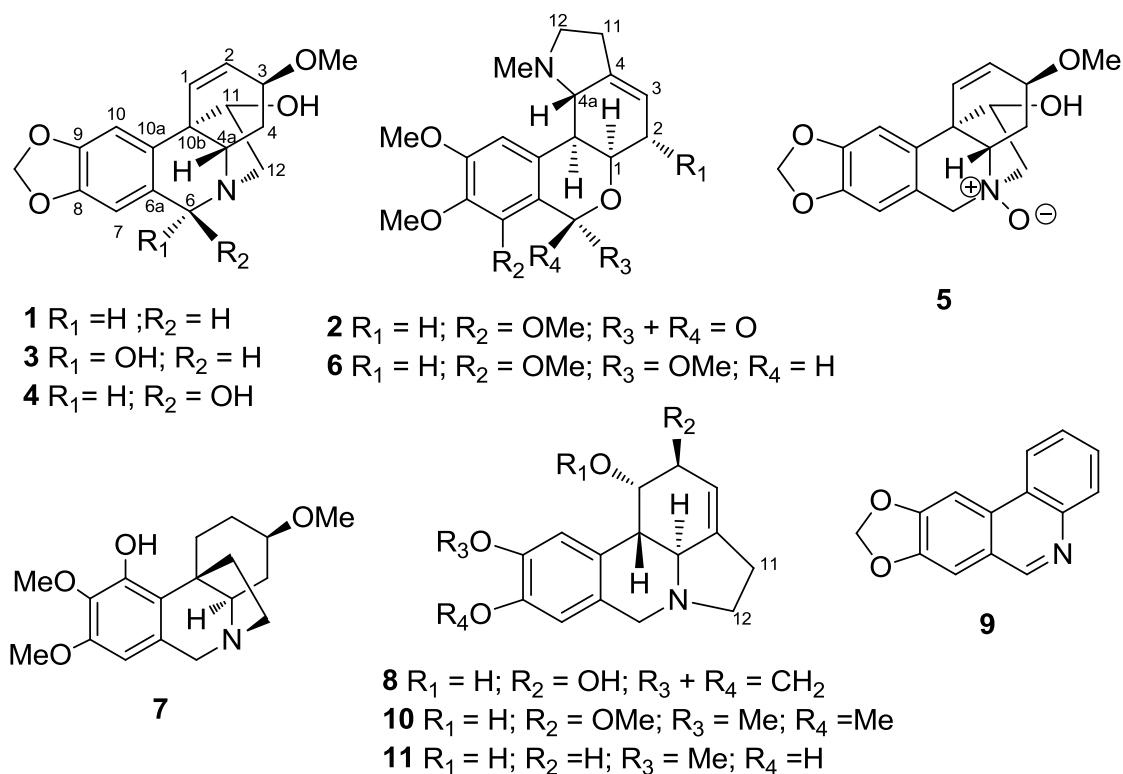


Figura 14: Estruturas dos alcaloides obtidos de *Hippeastrum aulicum*

4.1 – Compostos isolados

4.1.1 – Composto 1

O composto **1** foi isolado das frações hexano e acetato de etila de folhas e de bulbos, sendo obtidos cerca de 1,0 g do composto. Apresentou-se como um sólido branco sendo analisado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (1H) (Figura 15).

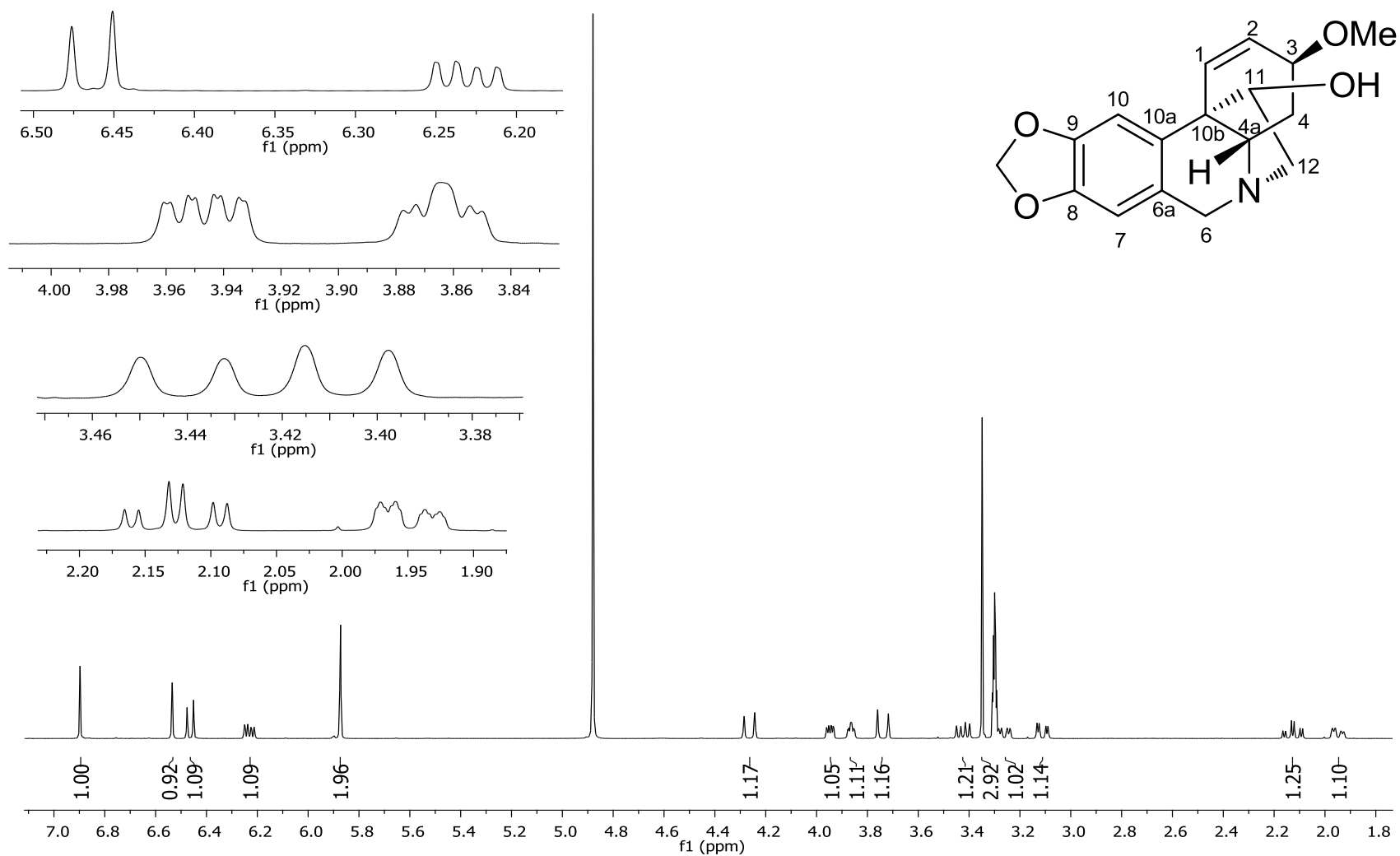


Figura 15: Espectro de RMN ^1H do composto 1 com expansões (CD_3OD , 400 MHz)

Características dos sinais no espectro de RMN ^1H incluem: (a) dois hidrogênios singletos em 6,89 e 6,53 ppm, correspondentes aos hidrogênios aromáticos *para* orientados, H-10 e H-7, respectivamente; (b) dois sinais de hidrogênios olefínicos vicinais em 6,46 e 6,23 ppm ($J = 10$ Hz); (c) um singlete, com deslocamento de 5,87 ppm, integrando para dois hidrogênios, sinal característico do grupo metilendioxifenila; (d) dois dubletos em sistema AB com deslocamentos 4,26 e 3,74 ppm correspondentes aos hidrogênios da posição 6; (e) um sinal singlete em 3,34 ppm, integrando para 3H, característico de metoxila alifática.

Os dados obtidos no RMN ^1H do composto **1**, indicam que a estrutura desse composto é um alcaloide com esqueleto do tipo crinano (5,10b-etanofenatridina, Figura 16), podendo ser do tipo haemantamina ou crinina, de acordo com a configuração da ponte. Para identificar o tipo correto, é necessária análise de dicroísmo circular para confirmar a configuração absoluta da ponte de dois carbonos (C-11 e C-12).

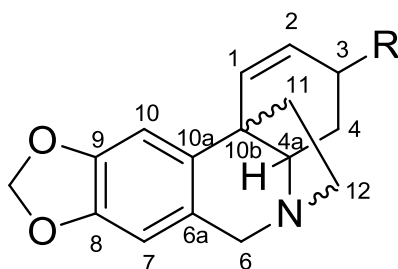


Figura 16: Esqueleto tipo 5,10b-etanofenatridina

A forma do espectro de dicroísmo circular (DC) de alcaloides de Amaryllidaceae depende da estereoquímica do carbono benzílico opticamente ativo em sistemas policíclicos rígidos (Figura 17a), como o C-10b de alcaloides do tipo crinano (WAGNER, PHAM e DÖPKE, 1996). A configuração do carbono cabeça de ponte é resultante do tipo de fusão dos anéis B e C. Os alcaloides da série 5,10b-etanofenatridina são formados a partir da fusão *trans* dos anéis B e C, podendo ocorrer de duas formas possíveis (Figura 17b).

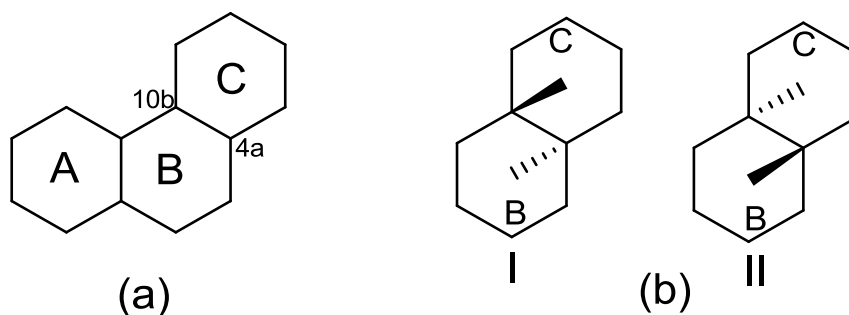


Figura 17: Ilustração dos tipos de junção de anéis

A fusão I leva a formação do tipo crinina e a fusão II leva a formação do tipo haemantamina (Figura 18), desta forma o hidrogênio 4a sempre apresenta configuração contrária à ponte.

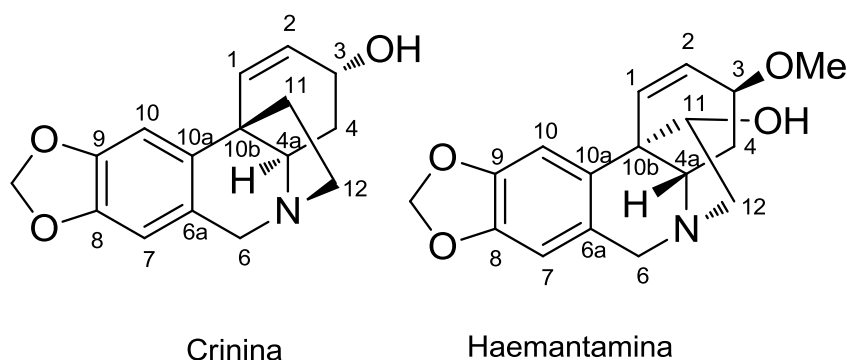


Figura 18: Estruturas dos alcaloides dos tipos crinina e haemantamina

Os espectros de DC dos alcaloides da série fenantridina, os quais apresentam transições de UV (ultravioleta) e DC dominadas pelo cromóforo metilenodioxifenila, são caracterizados por duas bandas de DC antipodais em cerca de 294 e 245 nm, ambas correspondentes aos valores máximos observados no UV (WAGNER, PHAM e DÖPKE, 1996). A forma do espectro de DC está relacionada à estereoquímica da junção dos anéis B e C e, no caso de enantiômeros, o que se observa é que um espectro é a imagem especular do outro, ocorrendo à inversão do efeito Cotton de positivo para negativo e vice-versa.

O composto 1 apresentou espectro de DC (Figura 19) com efeito Cotton positivo em 302 nm e negativo em 222 nm, características que estão de acordo com os encontrados para o tipo haemantamina na literatura (DEANGELIS e WILDMANN, 1969).

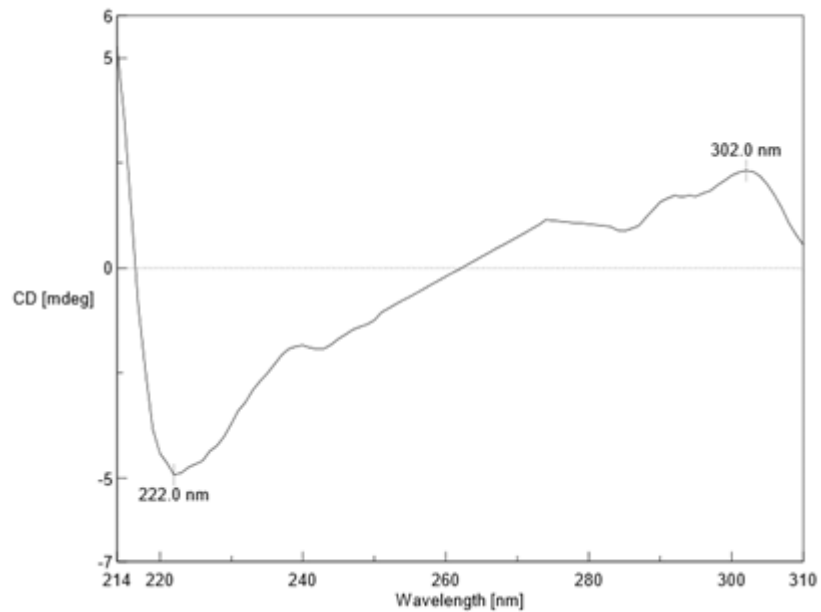


Figura 19: Espectro de dicroísmo circular do composto 1

Os dados de RMN ^1H foram então comparados com os dados do alcaloide haemantamina descrito na literatura (BASTIDA, VILADOMAT, LLABRES *et al.*, 1987), (PABUÇÇUOGLU, RICHOME, GÖZLER *et al.*, 1989). Com base nessa comparação (Tabela 7) e com os dados de DC, foi proposto que o composto **1** é haemantamina (Figura 20).

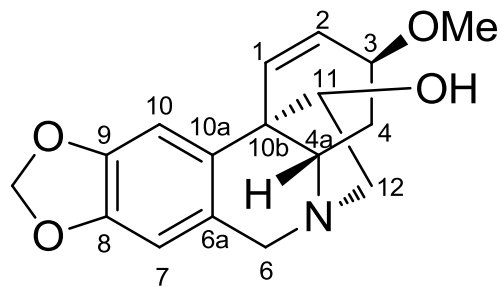


Figura 20: Estrutura química do alcaloide Haemantamina (**1**)

Tabela 7: Dados de RMN ^1H (CD_3OD , 400MHz) do composto **1** comparados com a literatura ($\text{CDCl}_3/1\%\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 360 MHz)(PABUÇÇUOGLU, RICHOME, GÖZLER *et al*, 1989)

Posição	δ_{H} (J em Hz) Composto 1	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	6,46 <i>d</i> (10,0)	6,36 <i>d</i> (10,0)
2	6,23 <i>dd</i> (10,0; 5,2)	6,25 <i>dd</i> (10,0; 5,0)
3	3,85 – 3,89 <i>m</i>	3,82 <i>m</i>
4a	3,26 <i>dd</i> (13,2; 4,8)	3,25 <i>dd</i> (13,6; 4,6)
4 α	2,13 <i>td</i> (13,6; 13,6; 3,6)	2,11 <i>ddd</i> (13,7; 13,6; 4,2)
4 β	1,95 <i>dd</i> (13,6; 4,4)	1,96 <i>ddd</i> (13,7; 4,6; <1)
6 α	3,74 <i>d</i> (16,8)	3,72 <i>d</i> (16,8)
6 β	4,26 <i>d</i> (16,8)	4,25 <i>d</i> (16,8)
7	6,53 <i>s</i>	6,41 <i>s</i>
10	6,89 <i>s</i>	6,74 <i>s</i>
11	3,95 <i>ddd</i> (7,2; 3,6; 0,8)	3,96 <i>dd</i> (6,7; 3,3)
12 $endo$	3,43 <i>dd</i> (14,0; 6,8)	3,30 <i>dd</i> (13,9; 6,7)
12 exo	3,11 <i>dd</i> (13,6; 3,6)	3,19 <i>dd</i> (13,9; 3,3)
OCH ₂ O	5,87 <i>br s</i>	5,81 (2 <i>d</i>) (1,3)
3-OMe	3,34 <i>s</i>	3,36 <i>s</i>

Na literatura (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006) é descrito que a configuração do substituinte na posição 3 para alcaloides do tipo haemantamina, que apresentam ligação dupla no carbono 1, pode ser encontrada de acordo com as constantes de acoplamento entre os hidrogênios da ligação dupla (H-1e H-2) e o hidrogênio H-3. No espectro de RMN ^1H usando CDCl_3 como solvente, a magnitude das constantes de acoplamento de aproximadamente 5,0 Hz entre os H-2 e H-3 indica uma relação *trans* entre o substituinte em C-3 e a ponte 5,10b-etano, o que ocorre nos alcaloides do tipo haemantamina e derivados.

O espectro de RMN do composto **1** foi realizado em CD_3OD , contudo, também foi observada constante de acoplamento em aproximadamente 5 Hz ($J = 5,2$ Hz) entre os hidrogênios H-2 e H-3, o que indica a relação *trans* no composto **1**. Além de observar o acoplamento entre H-2 e H-3, também observou-se que não há

acoplamento entre H-1 e H-3 o que leva a concluir definitivamente que o composto **1** é haemantamina.

Outro indicativo da configuração *trans* do substituinte na posição 3 em relação à ponte de dois carbonos é a magnitude das constantes de acoplamento do H-4 axial. De acordo com a fusão dos anéis B e C, em compostos com esqueleto do tipo crinano, o H-4a é axial e contrário à ponte. Portanto, sabendo-se que a ponte no composto **1** encontra-se alfa orientada, o H-4a (axial) encontra-se beta orientado e o hidrogênio H-4 α é axial. O H-4 α apresentou-se como um triplo dubleto ($J=13,6$; $13,6$ e $3,6$ Hz), as duas constantes de acoplamento de grande magnitude referem-se ao acoplamento com o hidrogênio geminal H-4 β e ao acoplamento *trans* diaxial com o H-4a. A terceira constante de acoplamento pequena indica que o H-3 e o H-4 α possuem relação *cis*, o H-3 está *alfa* orientado, enquanto o substituinte em 3 está *beta* orientado e, portanto, contrário à ponte.

A confirmação da estrutura de haemantamina para o composto **1** também se deu através de análise de CG-EM do alcaloide isolado. O cromatograma apresentou uma banda com tempo de retenção de 24,621 min e o espectro de massas (Figura 21) relativo a esta banda apresentou íon molecular m/z 301 $[M]^+$ e pico base em m/z 272. O íon molecular, o pico base e as demais fragmentações estão de acordo com os dados encontrados para haemantamina (de ANDRADE, 2014).

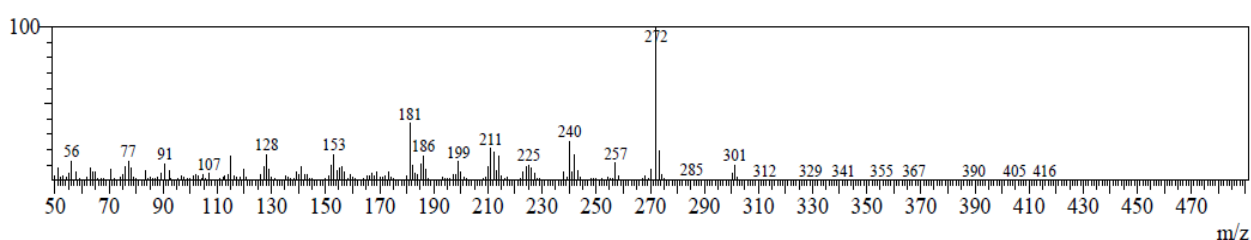


Figura 21: Espectro de massas do composto **1**

Haemantamina é um alcaloide do tipo crinano e possui algumas atividades biológicas já relatadas, como antimalárica, com poderosa atividade contra *Plasmodium falciparum* (SENER, ORHAN, SATAYAVIVAD, 2003); antirretroviral (SZLAVICK, GYURIS, MINAROVITS *et al.*, 2004) e indutora de apoptose em células tumorais (MCNULTY, NAIR, CODINA *et al.*, 2007). Além disso, é utilizada como precursor na síntese de alcaloides com esqueleto do tipo montanina (CEDRÓN,

ESTÉVEZ-BRAUN, RAVELO *et al*, 2009), apresentando-se como fonte para obtenção de alcaloides que são encontrados com menor frequência nas plantas.

4.1.2 – Composto 2

O composto **2** (9,4 mg) foi isolado das frações hexano das folhas e dos bulbos de *Hippeastrum aulicum* e analisado por técnicas de RMN mono e bidimensionais.

O espectro de RMN ^1H (Figura 22) do composto **2** apresentou características de compostos com esqueleto tipo homolicorina (BASTIDA, LAVILLA, VILADOMAT, 2006). Foram identificados três sinais de metoxilas aromáticas em 3,95; 3,92 e 3,83 ppm e apenas um sinal de hidrogênio aromático em 6,98 ppm.

Os alcaloides de Amaryllidaceae com grupos hemiacetal-lactona, como o tipo homolicorina, apresentam dois ou três substituintes oxigenados no anel aromático. Dentre esses, os compostos com três substituintes são mais raros de serem encontrados. O composto **2** apresentou sinais correspondentes a três metoxilas aromáticas, sendo que duas delas devem estar localizadas nas posições C-8 e C-9, característica dos compostos de esqueleto tipo homolicorina. Por conseguinte, a terceira metoxila deveria estar localizada na posição C-7 ou C-10. Nos trabalhos de JEFFS e HAWKSWORTH (1963) e de HAWKSWORTH e colaboradores (1965) foi proposto, através de reações com compostos de mesmo esqueleto e de análises de espectros de RMN, que a terceira metoxila em compostos do tipo homolicorina deve estar localizada na posição C-7 e portanto, o hidrogênio aromático que aparece no espectro de RMN ^1H do composto **2**, deve ser do H-10.

Não foi detectado sinal correspondente aos hidrogênios da posição 6, o que levou a confirmação de que o alcaloide é da série lactona. A atribuição dos hidrogênios da posição 12 ocorreu como o esperado, com o H-12 α mais desblindado do que o H-12 β , devido à relação *cis* com o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio (grupo NMe) (BASTIDA, LAVILLA, VILADOMAT, 2006).

O H-10b apresentou duas constantes de acoplamento, uma grande ($J=10,0$ Hz) com o H-4a, o que demonstra a relação *trans*-diaxial entre esses hidrogênios, e

uma pequena ($J=2,0$ Hz) com o H-1, confirmando que os anéis B e C sofreram junção *cis*.

O gráfico de correlação COSY (Figura 23) de H-1, H-3, H-12 α e H-12 β com o multiplete 2,43-2,63 ppm permitiu assinalar esse sinal para os dois hidrogênios da posição 2 e os dois hidrogênios da posição 11, o que foi confirmado pela integração do sinal que corresponde a 4 hidrogênios e também pelo mapa de contornos HSQC (Figura 24) que apresentou sinais indicativos de CH₂ nesse intervalo.

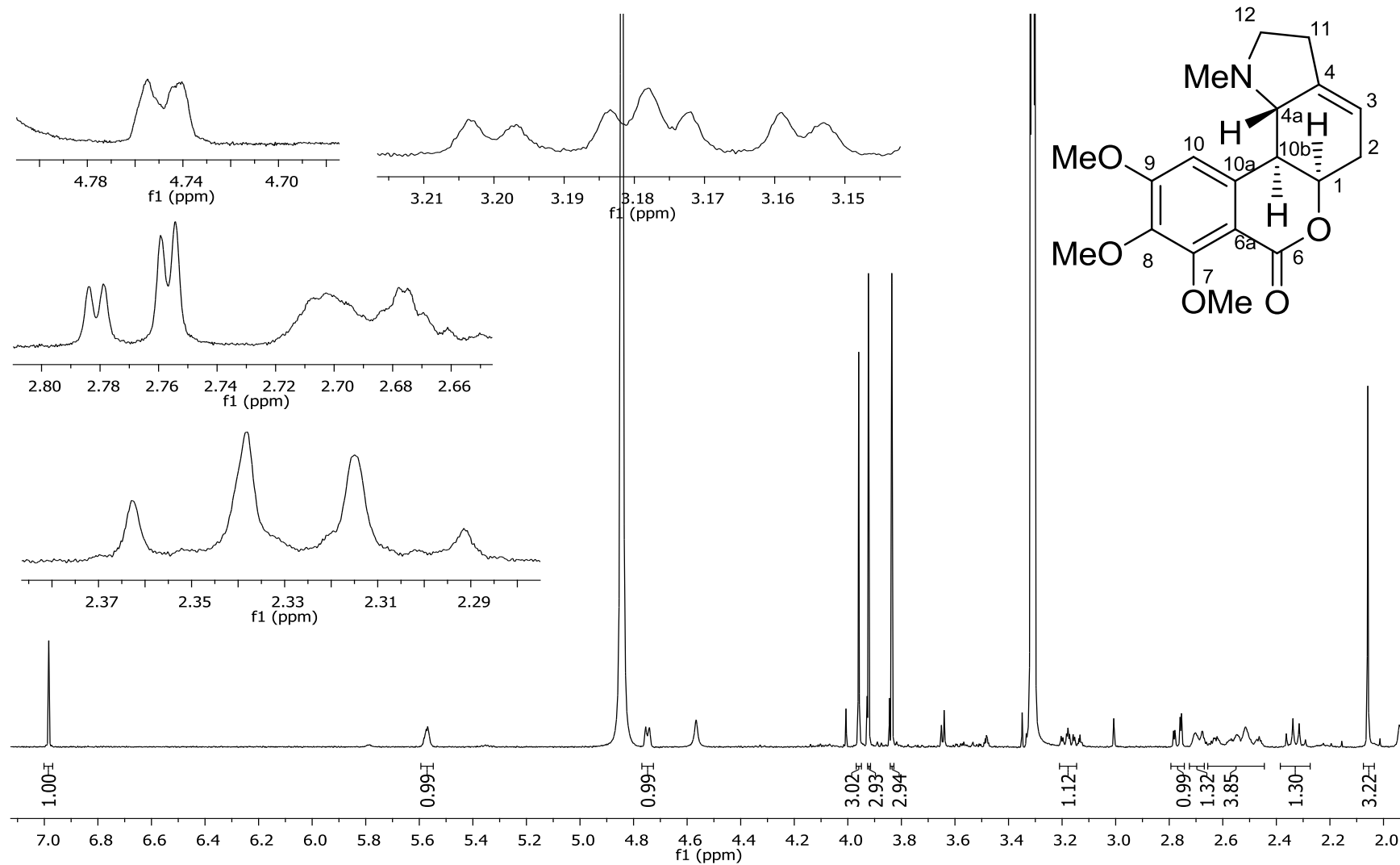


Figura 22: Espectro de RMN ^1H do composto **2** com expansões (CD_3OD , 400 MHz)

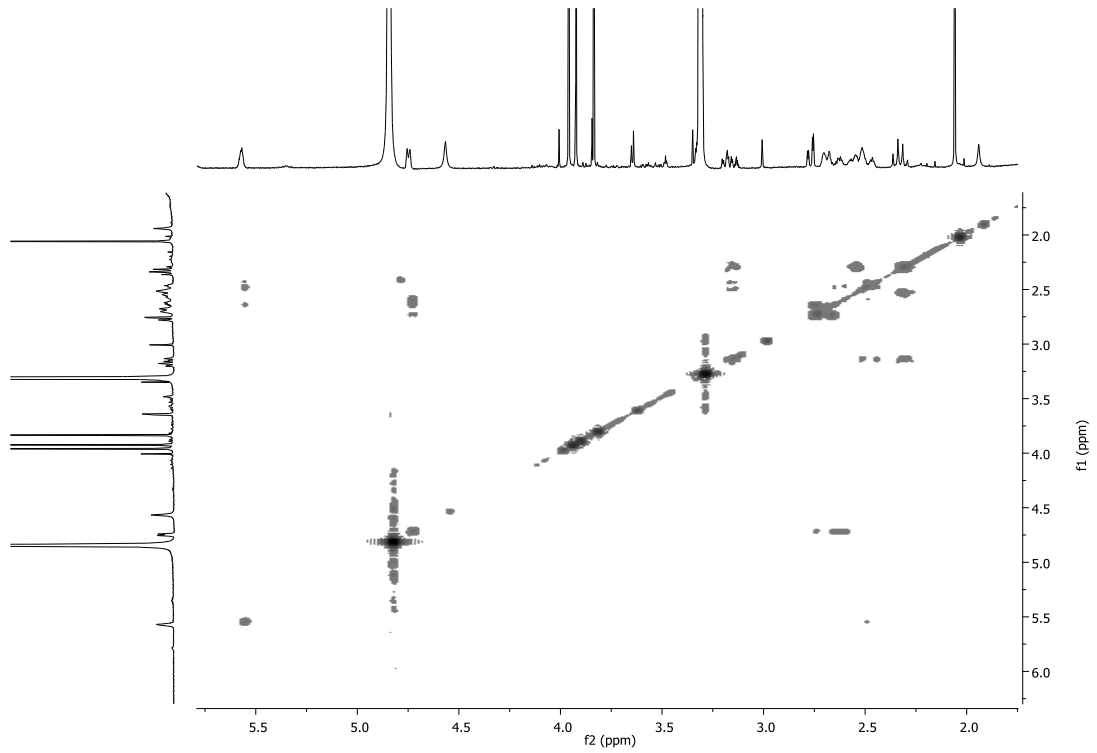


Figura 23: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto **2** (CD_3OD , 400 MHz)

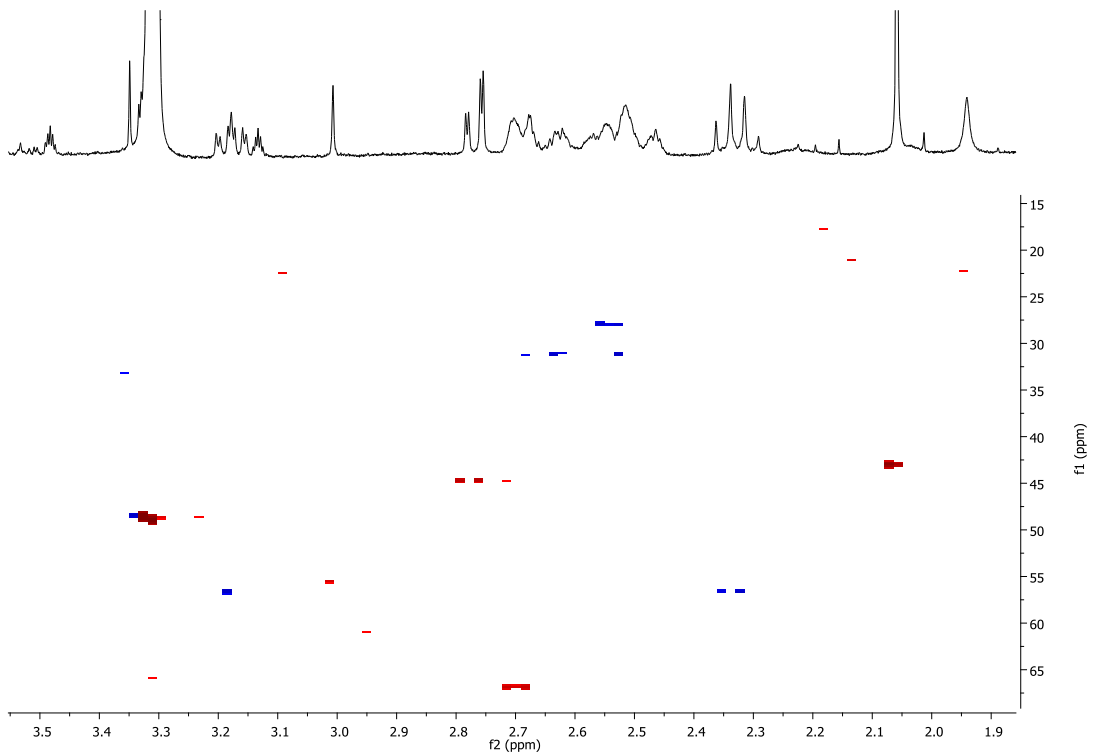


Figura 24: Ampliação do mapa de contornos HSQC do composto **2** (CD_3OD , 400 MHz)

As análises de RMN mono e bidimensionais (Tabela 8), comparadas com a literatura (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al*, 2014), (HAWKSWORTH, JEFFS, TIDD *et al*, 1965), levaram a identificação desse composto como albomaculina, um alcaloide do tipo homolicorina (Figura 25).

Tabela 8: Dados de RMN ^1H e COSY (CD_3OD , 400MHz) do composto **2** comparados com a literatura (CDCl_3 , 400 MHz) (ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al*, 2014)

Posição	δ_{H} (J em Hz) Composto 2	COSY	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	4,75 br <i>d</i> (6,0)	H-2 α , H-2 β	4,68 br <i>m</i>
2 α	2,43 – 2,63 br <i>m</i>	H-1	2,55 – 2,60 br <i>m</i>
2 β	2,43 – 2,63 br <i>m</i>	H-1	2,55 – 2,60 br <i>m</i>
3	5,59 – 5,55 br <i>m</i>	H-2 α , H-2 β	5,48 br <i>m</i>
4a	2,68 br <i>d</i> (10,0)	H-10b	2,72 <i>d</i> (10,0)
10	6,98 <i>s</i>	9-OMe	6,78 <i>s</i>
10b	2,76 <i>dd</i> (10,0; 2,0)	H-4a	2,63 <i>d</i> (10,0)
11 α	2,43 – 2,63 br <i>m</i>	H-12 α , H-12 β	2,45 – 2,53 br <i>m</i>
11 β	2,43 – 2,63 br <i>m</i>	H-12 α , H-12 β	2,45 – 2,53 br <i>m</i>
12 α	3,17 <i>ddd</i> (10,0; 7,6; 2,4)	H-11 α , H-11 β , H-12 β	3,13 <i>ddd</i> (9,6; 7,2; 3,6)
12 β	2,32 <i>q</i> (10,0)	H-11 α , H-11 β , H-12 α	2,23 <i>q</i> (9,6)
7-OMe	3,95 <i>s</i>		3,99 <i>s</i>
8-OMe	3,83 <i>s</i>		3,89 <i>s</i>
9-OMe	3,92 <i>s</i>	H-10	3,91 <i>s</i>
N-Me	2,05 <i>s</i>		2,05 <i>s</i>

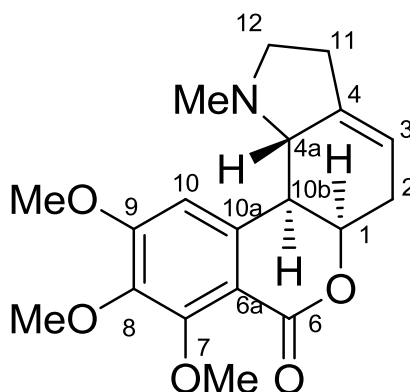


Figura 25: Estrutura química do alcaloide albomaculina (**2**)

O isolamento de albomaculina foi relatado, pela primeira vez, em 1956 a partir de *Haemanthus albomaculatus* (BRIGGS, HIGHET, P., HIGHET, R. *et al.*, 1956). Também há relatos de obtenção de albomaculina a partir de *Haemanthus albiflos* (CROUCH, POHL, MULHOLLAND *et al.*, 2005) e, em trabalho recente, esse alcaloide foi isolado a partir da mesma espécie estudada no presente trabalho (*Hippeastrum aulicum*) (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al.*, 2014).

4.1.3 – Compostos 3 e 4

Os compostos **3** e **4** (17,0 mg) foram obtidos da fração acetato de etila das folhas e dos bulbos em uma mistura, portanto estão num mesmo espectro de RMN ^1H (Figura 26). O espectro de RMN ^1H apresentou quatro sinais de hidrogênios aromáticos *para* orientados (6,95; 6,80; 6,78, 6,76 ppm), dois para cada isômero, atribuídos aos hidrogênios das posições 7 e 10; um multiplete integrando para quatro hidrogênios na região de olefinas, dois sinais característicos de metoxilas alifáticas (3,36 e 3,34 ppm) e sinais integrando para quatro hidrogênios em aproximadamente 5,90 ppm, característico do grupo metilenodioxifenila.

Os hidrogênios do grupo metilenodioxifenila foram atribuídos com vista aos dois dubletos com constantes de acoplamento pequenas, por volta de 1,3 Hz, característica desse grupo, além de ser observado no mapa de contornos HSQC (Figura 27) que os sinais correspondentes a esses hidrogênios estão ligados a carbonos com o mesmo deslocamento químico. Ainda pelo mapa de contornos HSQC, foram atribuídos os sinais dos hidrogênios das posições 4 e 12, uma vez que se apresentaram como hidrogênios de CH_2 .

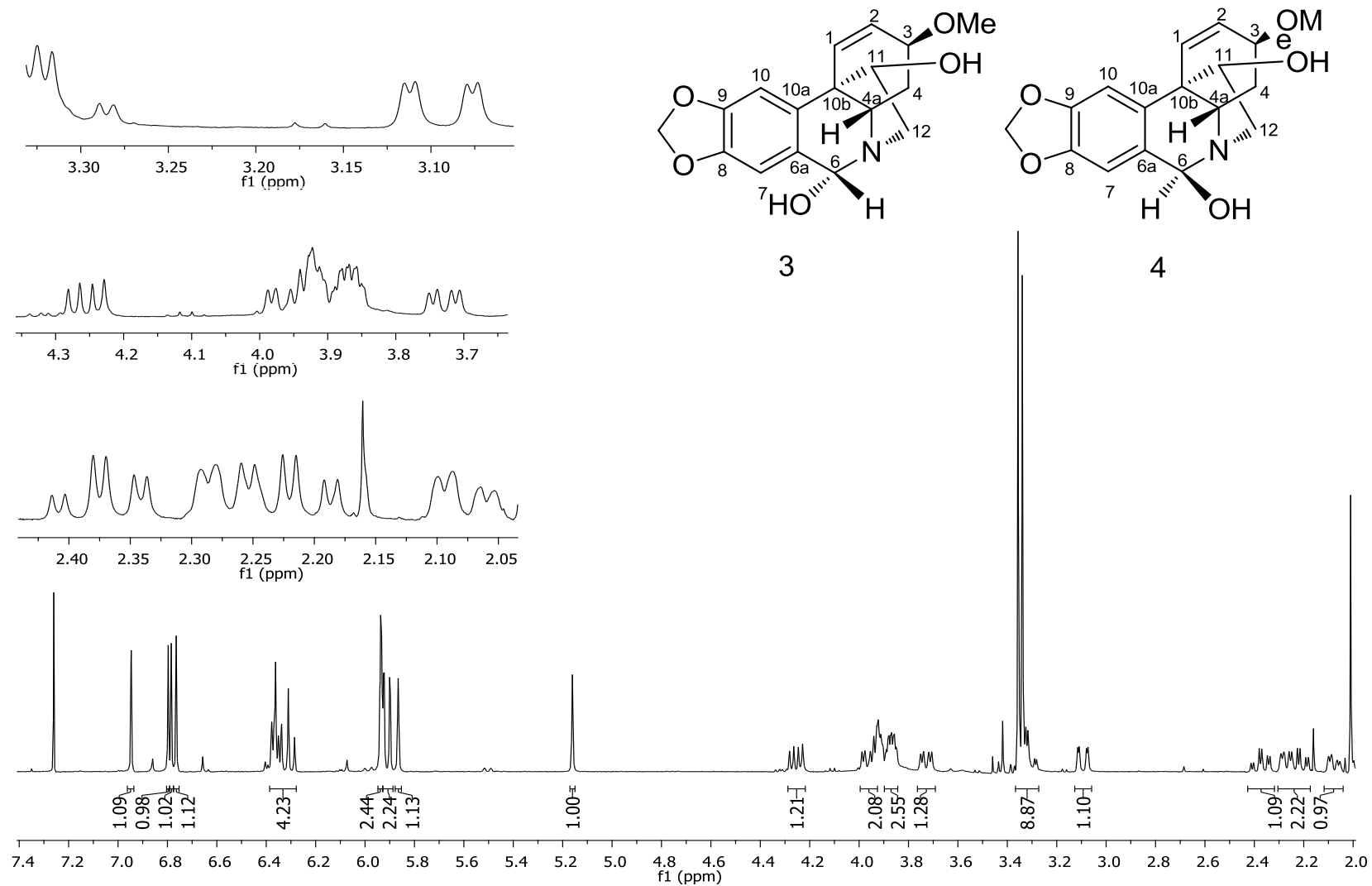


Figura 26: Espectro de RMN ^1H dos compostos **3** e **4** com expansões (CDCl_3 , 400 MHz)

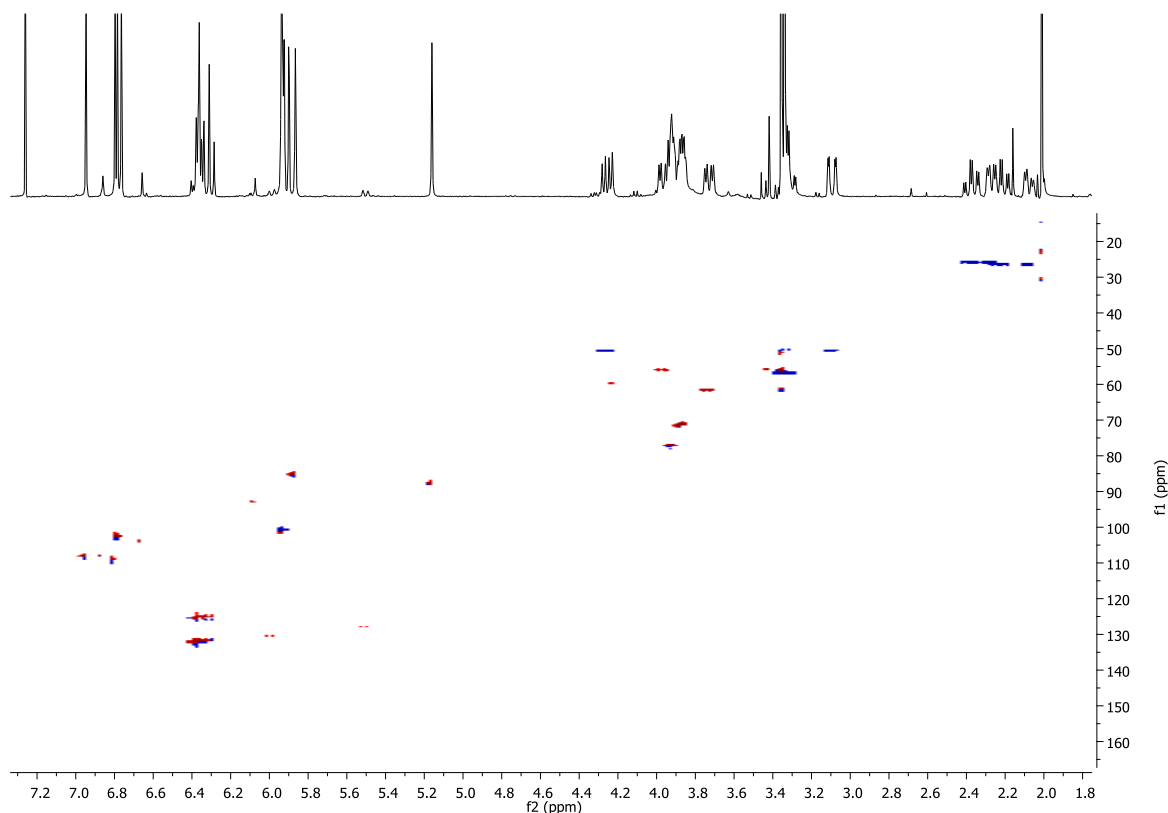


Figura 27: Mapa de contornos HSQC dos compostos **3** e **4** (CDCl₃, 400 MHz)

Com base nos sinais encontrados no espectro de RMN ¹H dos compostos **3** e **4**, observou-se que esses apresentam o esqueleto do tipo crinano e a ausência de dubletos em sistema AB com grande constante de acoplamento ($J \sim 16$ Hz) indica que a posição 6 deve estar substituída.

De acordo com a literatura (BASTIDA, LAVILLA, VILADOMAT, 2006), a mistura de isômeros é comum para alcaloides do tipo haemantamina que apresentam um grupo hidroxila na posição C-6, pois estes sempre aparecem como uma mistura de epímeros em solução.

Os hidrogênios da posição 3 foram assim assinalados pois apresentam correlação COSY (Figura 28) com os hidrogênios das olefinas (H-1 e H-2) dos epímeros e também com os sinais atribuídos aos hidrogênios da posição 4.

O espectro de COSY também demonstrou correlação entre os hidrogênios da posição 12 com o hidrogênio da posição 11 e dos hidrogênios H-4a e H-4 α do epímero haemantidina, além das demais correlações que levaram às atribuições dos sinais do espectro às suas devidas posições.

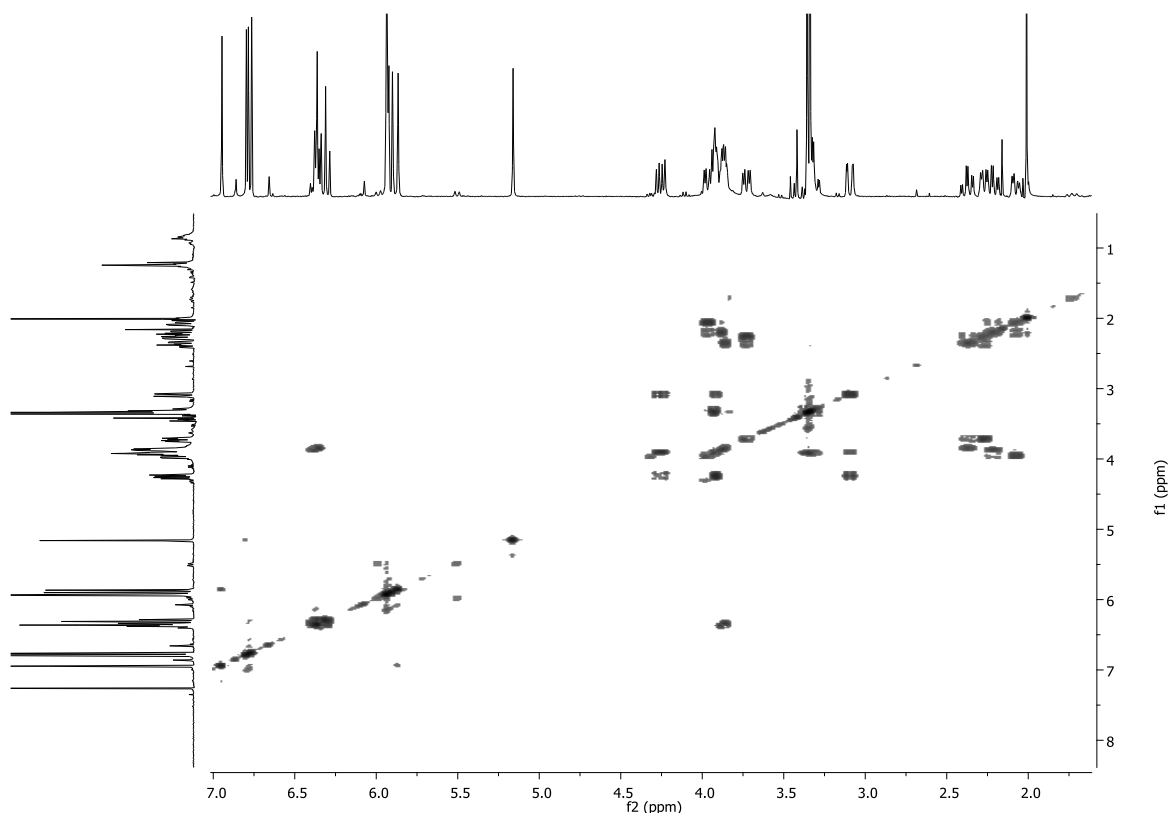


Figura 28: Espectro de COSY ^1H - ^1H dos compostos **3** e **4** (CDCl_3 , 400 MHz)

A relação *trans* do substituinte em C-3 com a ponte 5,10b-etano foi confirmada pelas constantes de acoplamento do H-4 α , que se encontra em posição axial. O H-4 α (do epímero haemantidina) apresentou-se como um duplo duplo dubleto no espectro de RMN ^1H (Figura 26), com duas constantes de acoplamento grandes (13,6 Hz) e uma pequena (4,4 Hz). Esses valores indicam que o H-4 α possui uma constante de acoplamento grande com o hidrogênio geminal H-4 β e a outra com o H-4a, devido à relação *trans*-diaxial que existe entre eles, uma vez que, pela junção *trans* dos anéis B e C em alcaloides do tipo haemantamina, o H-4a é axial e sempre contrário a ponte. Portanto, o hidrogênio da posição 3, acopla com o hidrogênio H-4 axial com uma constante pequena, o que indica que ele não possui relação *trans*-diaxial com esse hidrogênio, estando em posição equatorial, em relação *cis* com a ponte, enquanto o substituinte 3-OMe aparece em relação *trans* com a ponte.

Os dados de RMN ^1H dos compostos **3** e **4** foram comparados com a literatura (BASTIDA, LAVILLA, VILADOMAT, 2006), (PABUÇÇUOGLU, RICHOME, GÖZLER *et al*, 1989), (HOHMANN, FORGO, MAOLNÁR *et al*, 2002). Essa comparação (Tabela 9) levou a identificação desses compostos como os epímeros haemantidina (**3**) e 6-epihaemantidina (**4**) (Figura 29).

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) dos compostos **3** e **4** comparados com a literatura ($\text{CDCl}_3/1\%\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 360 MHz) (PABUÇÇUOGLU, RICHOME, GÖZLER *et al*, 1989)

Posição	δ_{H} (J em Hz) Compostos 3 / 4	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	6,28 – 6,38 <i>m</i>	6,33 <i>d</i> (10,1)
2	6,28 – 6,38 <i>m</i>	6,27 <i>dd</i> (10,1; 4,8)
3	3,84 – 3,89 <i>m</i>	3,85 <i>m</i>
4 α	2,38 <i>ddd</i> (13,6; 13,6; 4,4)/ 2,27 <i>br dd</i> (12,4; 4,8)	2,36 <i>ddd</i> (13,5; 13,5; 4,3)/2,21 <i>ddd</i> (13,7; 13,7; 4,3)
4 β	2,20 <i>dd</i> (13,6; 4,4)/2,07 <i>dd</i> (13,6; 4,8)	2,12 <i>ddd</i> (13,5; 4,3; 1,0)/2,0 <i>ddd</i> (13,7; 4,5; 1,0)
4a	3,73 <i>dd</i> (13,2; 4,8)/3,28 – 3,36 <i>m</i>	3,56 <i>dd</i> (13,5; 4,3)/3,20 <i>m</i>
6 α	- /5,16 <i>s</i>	- / 5,02 <i>s</i>
6 β	5,87 <i>s/-</i>	5,69 <i>s/-</i>
7	6,95 <i>s</i> /6,80 <i>s</i>	6,94 <i>s</i> /6,79 <i>s</i>
10	6,76 <i>s</i> /6,78 <i>s</i>	6,70 <i>s</i> /6,73 <i>s</i>
11 <i>endo</i>	3,93 – 3,99 <i>m</i>	3,92 <i>m</i>
12 <i>endo</i>	4,26 <i>dd</i> (14,0; 6,8)/ 3,28 – 3,36 <i>m</i>	4,20 <i>dd</i> (14,1; 6,9)/3,30 <i>m</i>
12 <i>exo</i>	3,09 <i>dd</i> (14,4; 2,4)/ 3,28 – 3,36 <i>m</i>	2,96 <i>dd</i> (14,1; 2,7)/3,20 <i>m</i>
OCH ₂ O	5,91 <i>2d</i> (1,6)/ 5,93 <i>2d</i> (1,3)	5,83 <i>2d</i> (1,3)/5,86 <i>2d</i> (1,3)
OMe	3,36 <i>s</i> /3,34 <i>s</i>	3,32 <i>s</i> /3,28 <i>s</i>

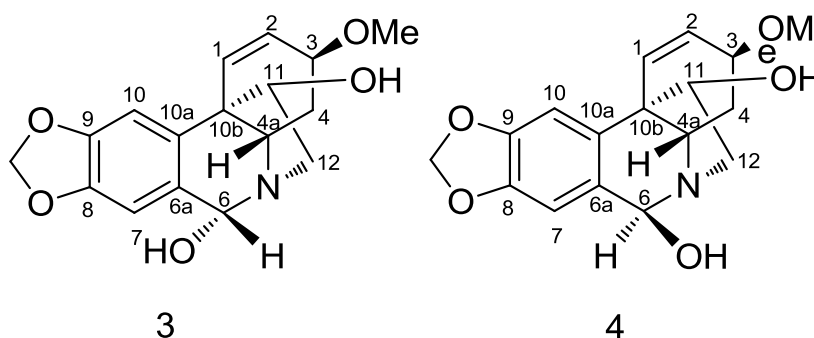


Figura 29: Estrutura dos alcaloides haemantidina (**3**) e 6-epihaemantidina (**4**)

Em estudos anteriores já foi relatada atividade antiprotozoária de haemantidina (epímeros) em testes contra *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (HERRERA, MACHOCHO, BRUN *et al*, 2001), atividade anti-inflamatória (CITOGLU, TANKER e GUMUSEL, 1998), além de atividade citotóxica contra várias linhagens celulares tumorais humanas (AUNTOUN, MENDOZA, RÍOS *et al*, 1993).

4.1.4 – Composto 5

O composto **5** (10,1 mg) foi obtido a partir da fração acetato de etila de folhas e foi analisado através de técnicas mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear (Tabela10). Através dos dados de RMN ^1H observou-se que o composto é um alcaloide com esqueleto do tipo crinano (5,10b-etanofenatridina). Para confirmar se o alcaloide era do tipo crinina ou haemantamina foi realizada análise por dicroísmo circular (Figura 30), que apresentou dois máximos de absorção em 245 e 291 nm e demonstrou que o composto **5** possui ponte em α e é do tipo haemantamina (DEANGELIS, WILDMANN, 1969).

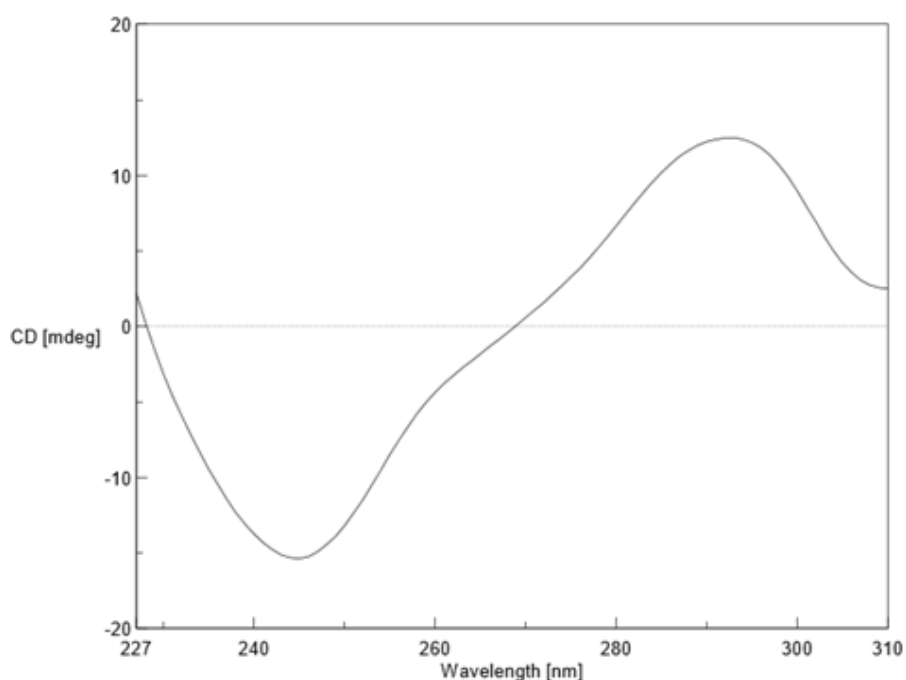


Figura 30: Dicroísmo circular do composto **5**

O composto **5** apresenta RMN ^1H (Figura 31) muito similar ao da haemantamina (**1**), onde observou-se: dois hidrogênios singletos em 6,98 e 6,68 ppm atribuídos aos hidrogênios aromáticos *para* orientados, H-10 e H-7, sendo o sinal mais desblindado relacionado ao H-10 devido a sua correlação NOESY com o H-1; um singlete largo integrando para dois hidrogênios na região de olefinas (6,36 ppm) assinalado para os hidrogênios H-1 e H-2; um sinal típico do grupo metilenodioxifenila em 5,97 ppm (integrando para 2H) e um sinal de metoxila alifática em 3,39 ppm.

A metoxila alifática foi assinalada na posição 3 que é mais comum para os alcaloides do tipo 5,10b-etanofenantridina. Essa atribuição foi confirmada devido a correlação, observada no mapa de contornos HMBC, entre o hidrogênio da metoxila da posição 3 e o carbono C-3.

A configuração da metoxila alifática em relação à ponte foi confirmada pelas constantes de acoplamento do hidrogênio H-4 α (axial) (13,2; 13,2 e 4,4 Hz). A presença de duas constantes grandes indica que um acoplamento ocorre com o hidrogênio geminal (H-4 β - equatorial) e o outro é característico de um acoplamento *trans* diaxial, que pode ocorrer com o H-3 ou com H-4a. De acordo com a junção dos anéis B e C, sabe-se que o H-4a é um hidrogênio axial. Portanto, a constante de acoplamento *trans* diaxial corresponde ao acoplamento dos hidrogênios H-4 α (axial) e o H-4a. A pequena constante de acoplamento entre o H-4 α (axial) e H-3 sugere que o H-3 esteja em posição equatorial e o substituinte 3-OMe em posição axial, ou seja, contrária a ponte. Desta forma, a ponte 5,10b-etano possui relação *trans* com o substituinte 3-OMe.

Todos os sinais de RMN do alcaloide **5** foram consistentes com a estrutura de haemantamina, com exceção das posições H-4a, H-6 e H-12. O H-4a apresentou deslocamento 0,5 ppm maior do que o encontrado na haemantamina. Enquanto os dois hidrogênios da posição 6 apareceram 0,9 e 0,5 ppm mais desblindados do que H-6 α e H-6 β , respectivamente. Finalmente, os H-12 $endo$ e H-12 exo foram 0,9 e 0,6 ppm mais desblindados do que os encontrados no espectro de haemantamina. Esse efeito de desblindagem é congruente com o alcaloide haemantamina na forma de sal ou de *N*-óxido.

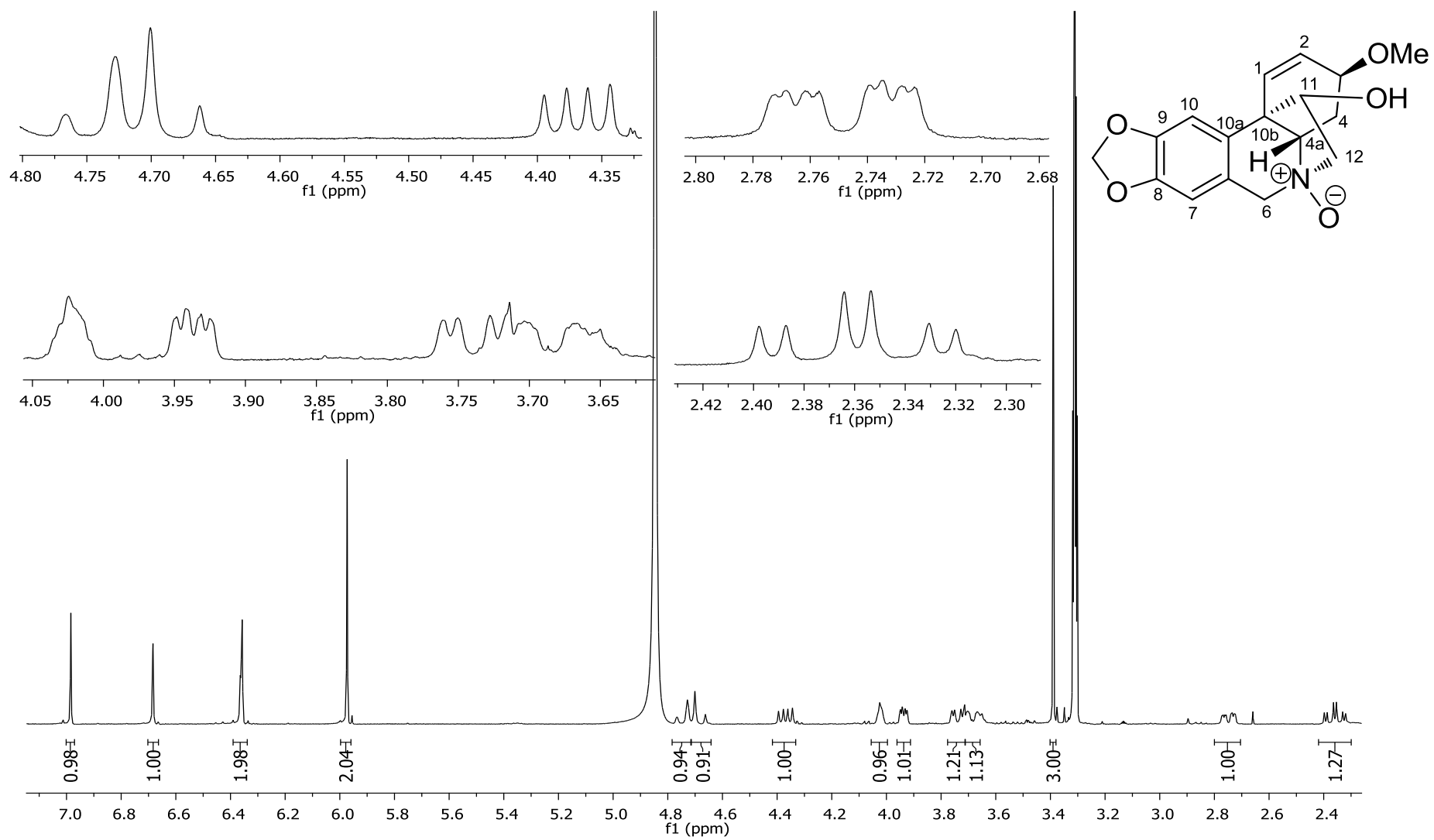


Figura 31: Espectro de RMN ^1H do composto **5** (CD_3OD , 400 MHz)

Tabela 10: Dados de RMN mono e bidimensionais do composto **5** (CD₃OD, 400 MHz)

Posição	δ_{H} (J in Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	6,36 br s		H-10	126,8 d	C-3, C-4a, C-10b
2	6,36 br s	H-3, H-4 β	H-3	131,5 d	C-3, C-10b
3	4,02 br s	H-2, H-4 α , H-4 β	H-2, 3-OCH ₃ , H-4 α , H-4 β	72,9 d	C-1, C-2
4 α	2,36 td (13,6; 13,2; 4,4)	H-3, H-4a, H-4 β	H-3, H-4 β , H-12 <i>exo</i>	24,7 t	C-4a
4 β	2,75 ddd (13,6; 4,0; 1,6)	H-2, H-3, H-4a, H-4 α	H-3, H-4a, H-4 α		C-2, C-3, C-4a, C-10b
4a	3,74 dd (13,2; 3,6)	H-4 α , H-4 β	H-4 β , H-6 β	75,2 d	C-11
6 α	4,68 d (15,4)	H-7	H-7, H-12 <i>endo</i>	75,4 t	C-4a, C-6a, C-7, C-10a
6 β	4,75 d (15,4)	H-7, H-12 <i>exo</i>	H-4a, H-7		C-6a, C-7, C-10a, C-12
6a				122,5 s	
7	6,68 s	H-6 α , H-6 β	H-6 α , H-6 β	107,3 d	C-6, C-9, C-10a
8				148,9 s	
9				149,6 s	
10	6,98 s		H-1	104,5 d	C-6a, C-8, C-10b
10a				133,5 s	
10b				53,7 s	
11 <i>endo</i>	3,94 br dd (7,2; 3,6)	H-12 <i>endo</i> , H-12 <i>exo</i>	H-12 <i>endo</i>	77,3 d	
12 <i>endo</i>	4,37 dd (13,6; 7,2)	H-11 <i>endo</i> , H-12 <i>exo</i>	H-6 α , H-11 <i>endo</i> , H-12 <i>exo</i>	76,9 t	C-4a, C-6, C-10b
12 <i>exo</i>	3,66 – 3,71 m	H-6 β , H- 11 <i>endo</i> , H-12 <i>endo</i>	H-4 α , H-12 <i>endo</i>		
3-OMe	3,39 s		H-3	57,0 q	C-3
OCH ₂ O	5,97 s			103,0 t	C-8, C-9

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram semelhantes aos valores encontrados para o *N*-óxido crinamina (Figura 32) (KOGURE, KATSUTA, KITAJIMA *et al.*, 2011), com exceção das constantes de acoplamento do hidrogênio 4α (axial). Nesse composto, o H- 4α (axial) apresentou três grandes constantes de acoplamento (12,5; 11,5; 11,5 Hz), indicando que o H-3 também é axial e, portanto, o substituinte 3-OMe está em orientação *cis* com a ponte. E no composto **5**, como já foi discutido, o grupo 3-OMe apresenta relação *trans* com a ponte.

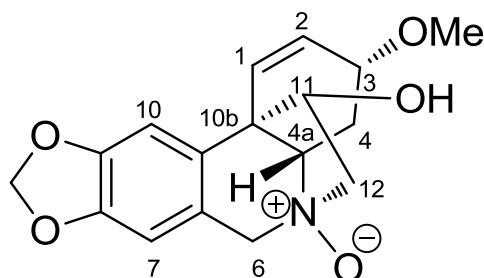


Figura 32: Estrutura química do *N*-óxido crinamina

A análise de espectrometria de massas de alta resolução do composto **5** (Figura 33), realizada em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ confirmou a presença de um átomo de oxigênio adicional na estrutura desse composto em comparação com a estrutura da haemantamina.

O íon molecular obtido foi m/z 318.13362, sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ (calculado: 318.1336), confirmou o composto **5** como *N*-óxido haemantamina (Figura 34). Portanto, um isômero do *N*-óxido crinamina obtido em trabalho anterior.

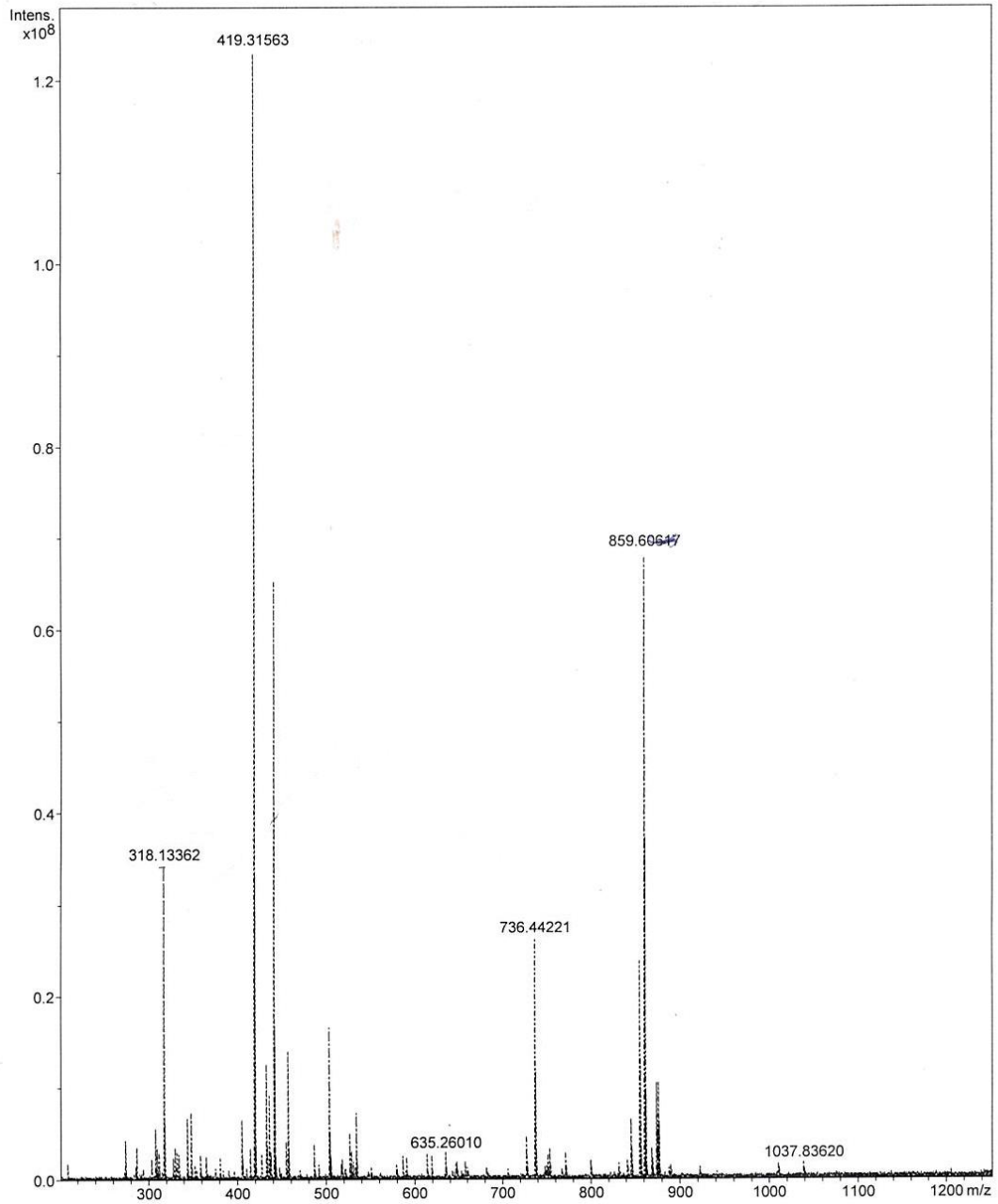


Figura 33: Espectro de massas de alta resolução do composto **5**

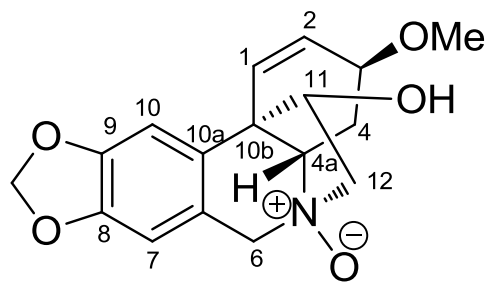


Figura 34: Estrutura química do *N*-óxido haemantamina (**5**)

O composto **5** também foi analisado por espectroscopia no infravermelho (IV) e o espectro de IV (Figura 35) apresentou bandas relacionadas a: deformação axial de O – H em 3361 cm^{-1} ; deformação axial de C – H em 2926 e 2855 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano de C-H de aromático em 750 cm^{-1} ; deformação axial das ligações C=C de aromáticos e olefinas $1650\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ e deformação axial assimétrica de C – O – C em 1247 cm^{-1} e simétrica em 1037 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007)

A ausência de grupo metoxila no anel aromático pode ser confirmada pela ausência de absorção no IV em 1613 cm^{-1} (FALES e WILDMAN, 1960).

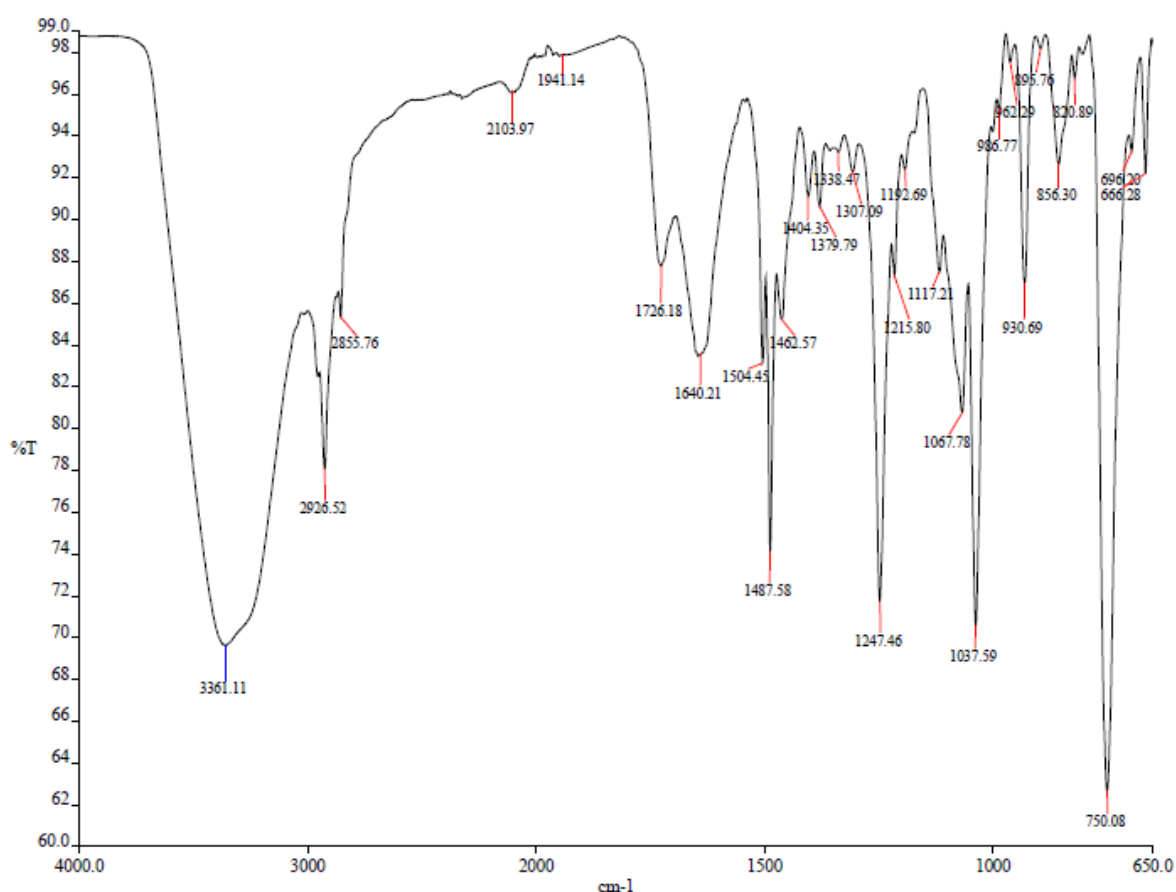


Figura 35: Espectro de IV do composto **5**

A análise do composto **5** por espectroscopia de UV-Visível apresentou dois máximos de absorbância em $237,498\text{ nm}$ ($\epsilon = 1692$) e $292,187\text{ nm}$ ($\epsilon = 1884$). Os espectros de UV de alcaloides de Amaryllidaceae, feitos em solvente neutro, como metanol ou etanol, fornecem informações a respeito do esqueleto-tipo. Alcaloides

com esqueleto-tipo crinano, geralmente apresentando um cromóforo metilenodioxi e uma ligação dupla isolada, apresentam máximos de absorção em 240 nm e 280-290 nm (GHOSAL, SAINI e RAZDAN, 1985). Esses máximos de absorbância foram encontrados para o composto **5**, o que reforça que a estrutura desse alcaloide é do tipo haemantamina.

N-óxido haemantamina (**5**) já foi obtido através de síntese pela oxidação de haemantamina e em seguida, foi avaliado como agente antimalárico contra *Plasmodium falciparum*, mostrando-se inativo (CÉDRON, GUTIERRÉZ, FLORES *et al.*, 2012). Contudo, o *N*-óxido haemantamina foi obtido, nesse trabalho, pela primeira vez a partir de fonte natural e a atribuição dos sinais foram apresentadas com base nos dados completos de RMN mono e bidimensionais (Figuras 31, 36-40).

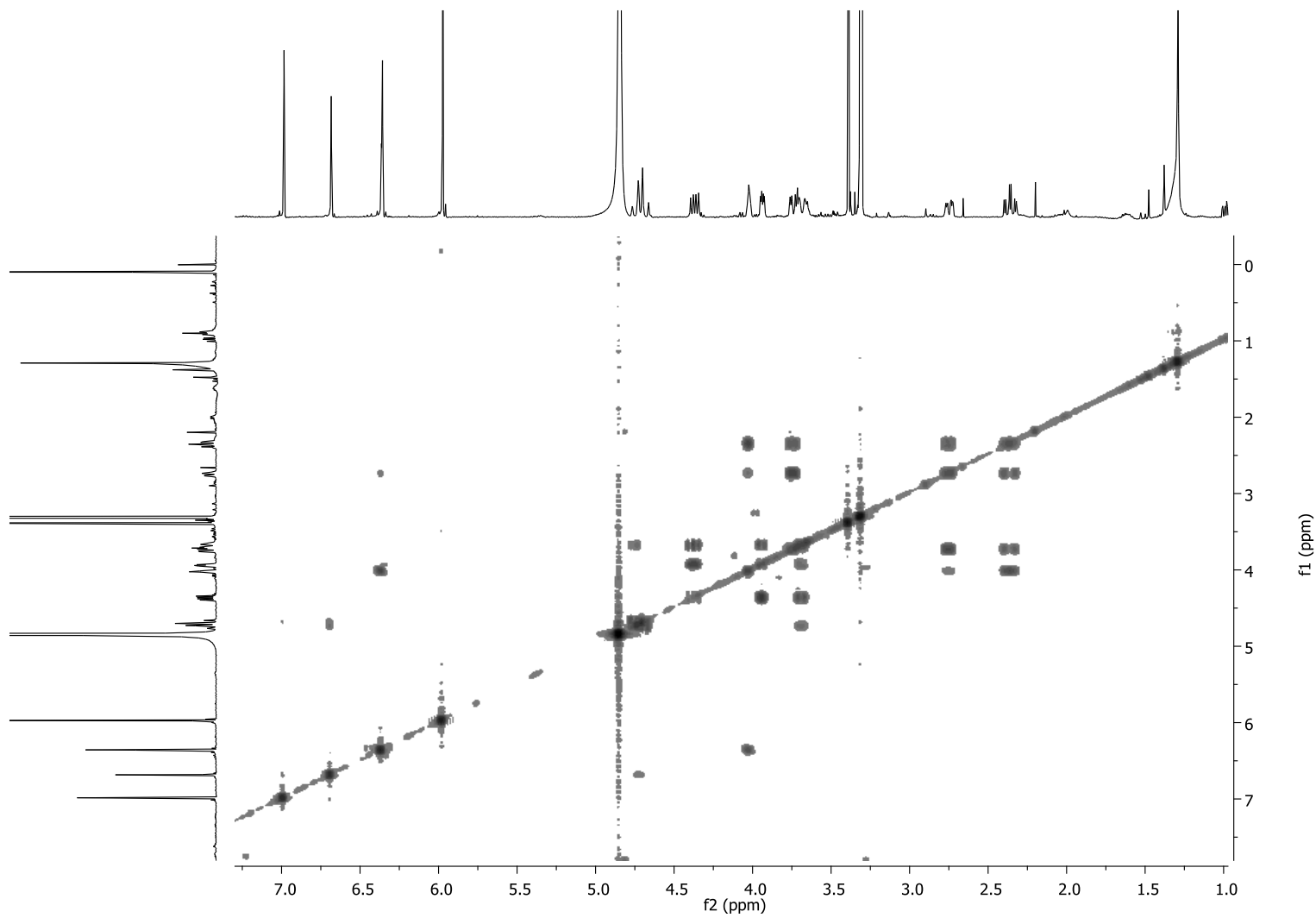


Figura 36: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto **5** (CD_3OD , 400 MHz)

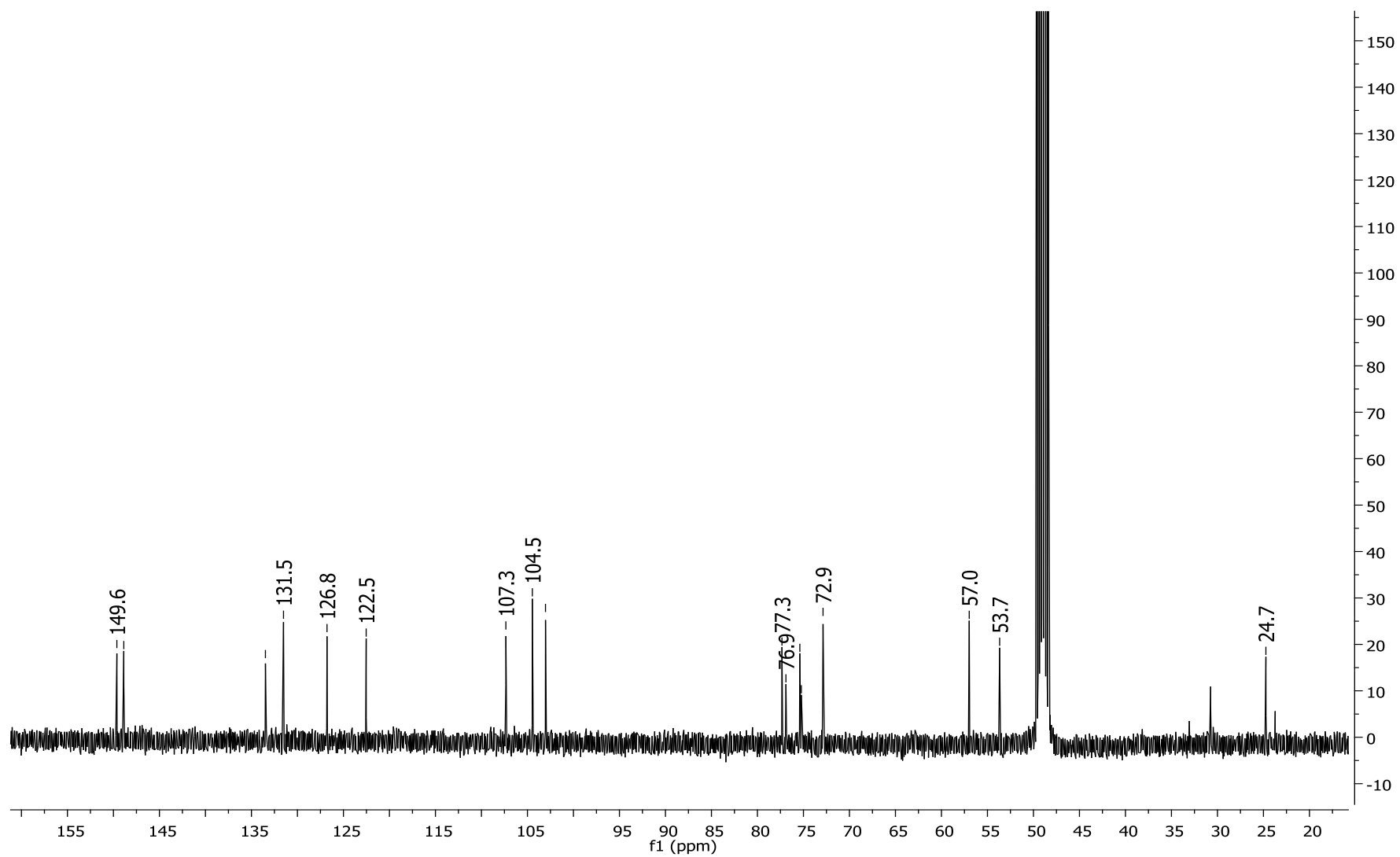


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C do composto 5 (CD_3OD , 100 MHz)

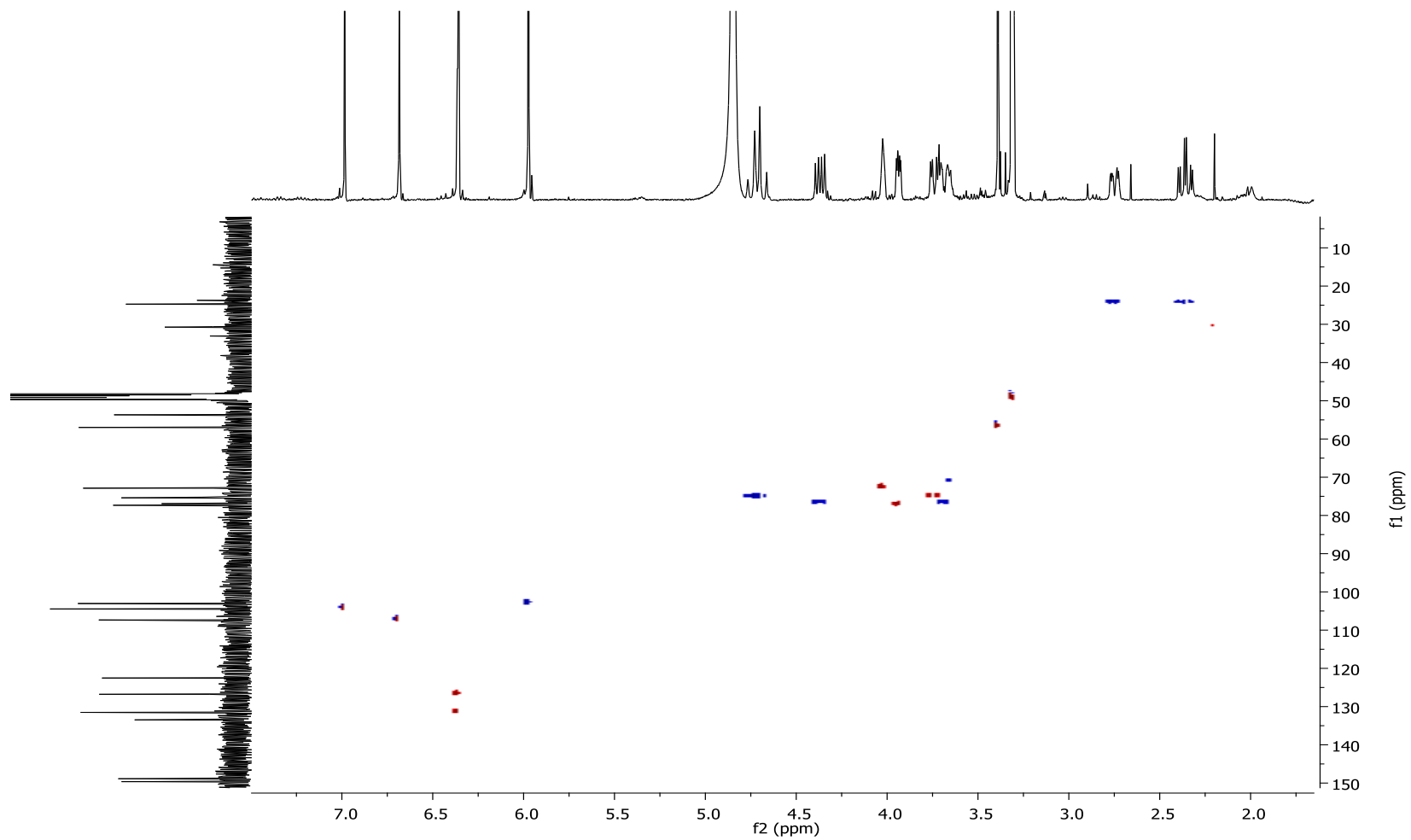


Figura 38: Mapa de contornos HSQC do composto **5** (CD_3OD , 400 MHz)

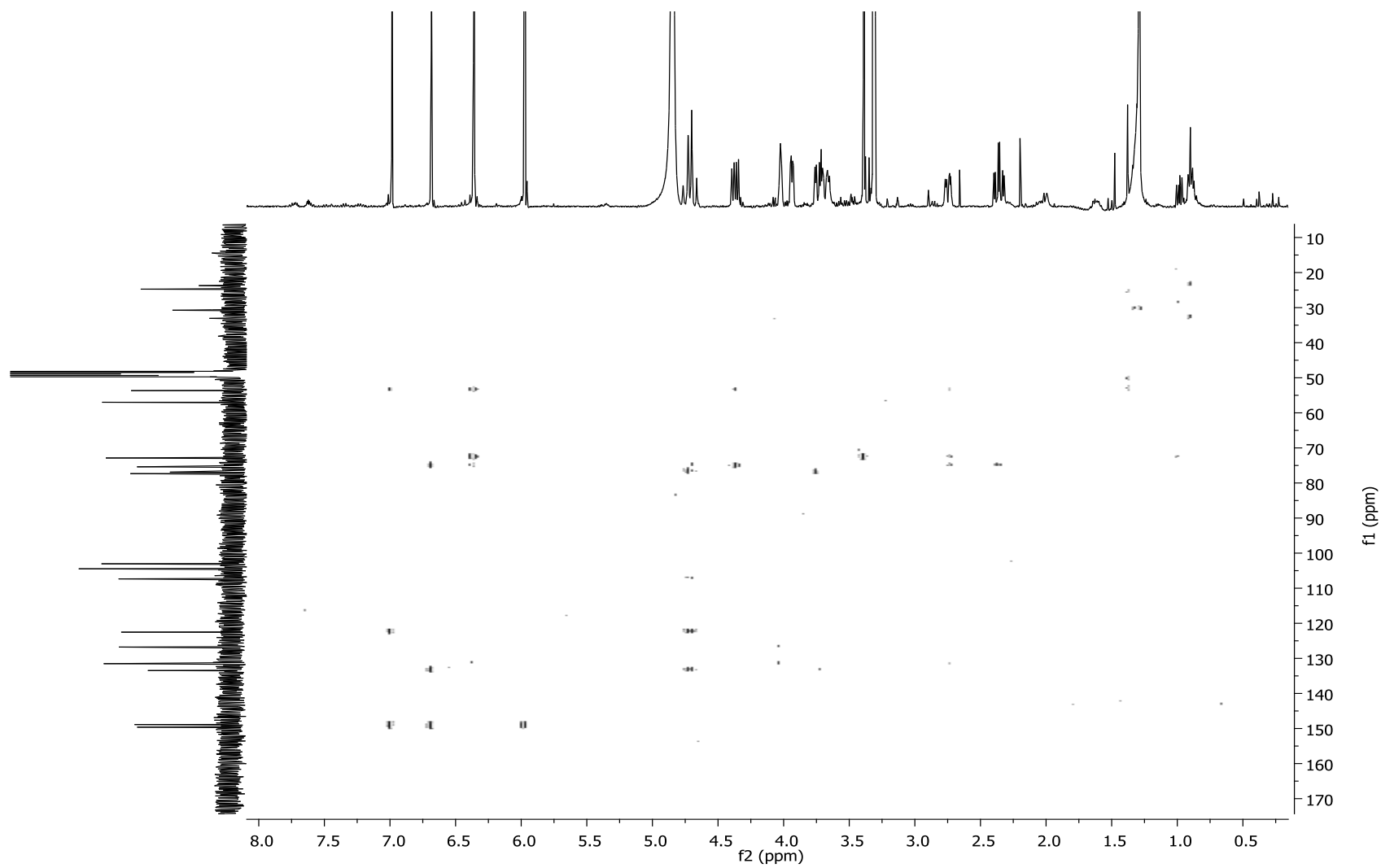


Figura 39: Mapa de contornos HMBC do composto 5 (CD₃OD)

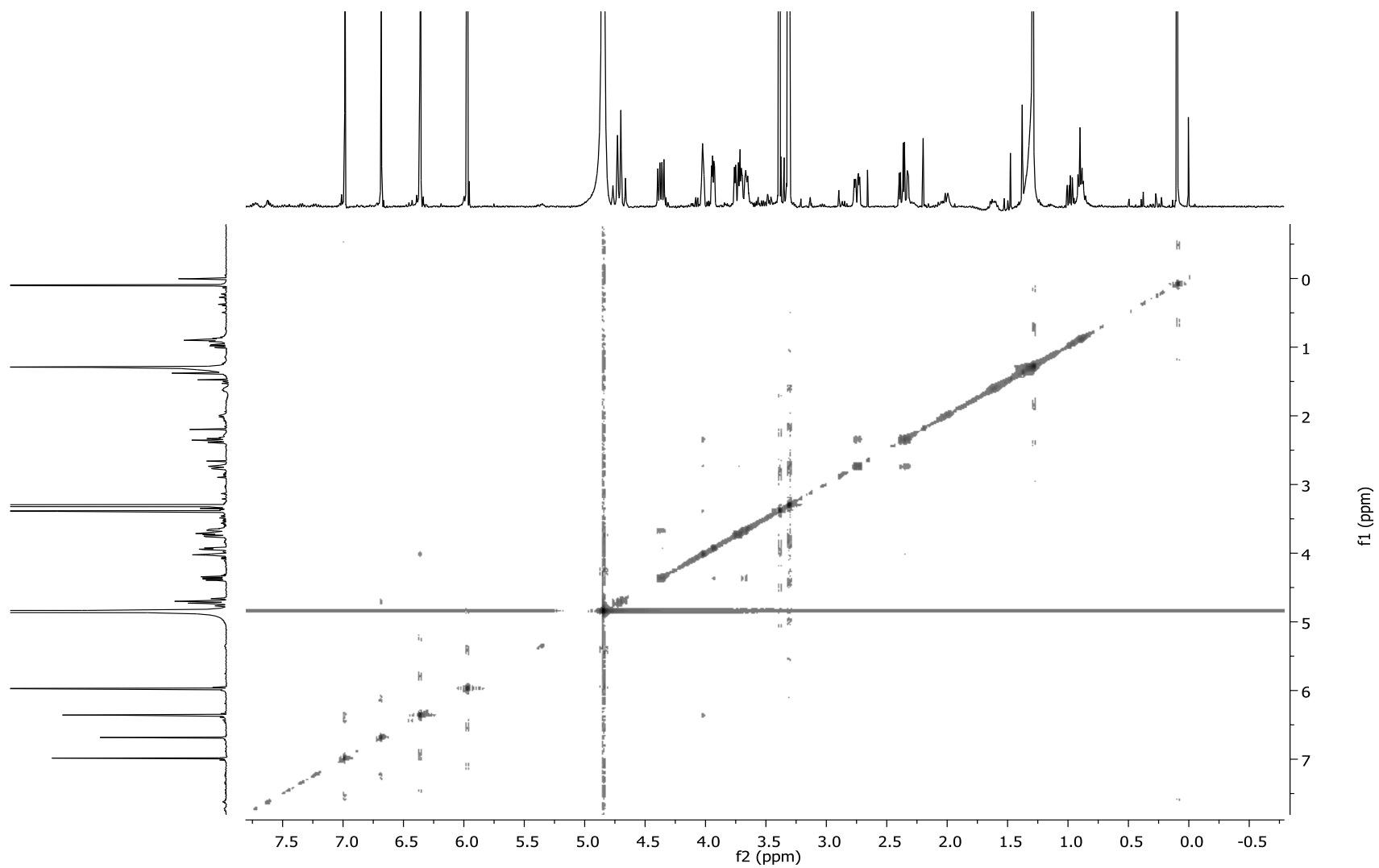


Figura 40: Espectro de NOESY do composto **5** (CD₃OD, 400 MHz)

4.1.5 – Composto 6

O composto **6** (20,2 mg) foi obtido a partir da fração acetato de etila de folhas e da fração hexano de bulbos e foi analisado por espectroscopia de RMN. No espectro de RMN ^1H (Figura 41) foi observado somente um singlete aromático em 6,84 ppm; três singletos, integrando para 3H, na região de metoxilas aromáticas (3,87; 3,85; 3,80 ppm); um singlete referente aos hidrogênios de uma grupo metoxila alifático (3,49 ppm); um singlete integrando para 3H em 2,02 ppm, característico do grupo N-Me e um singlete em 5,52 ppm, que é típico de compostos do tipo homolicorina que pertencem a série hemiacetal. Esse hidrogênio mais desblindado sugere que a metoxila não aromática esteja na posição C-6.

O composto **6** apresentou três metoxilas aromáticas, duas devem estar nas posições C-8 e C-9, característica comum aos alcaloides do tipo homolicorina e a terceira, foi atribuída a posição 7, pois, de acordo com a literatura (HAWKSWORTH, JEFFS, TIDD *et al*, 1965), caso ocorra a terceira metoxila aromática em alcaloides de esqueleto tipo homolicorina, essa deve encontrar-se na posição sete e o hidrogênio aromático na posição 10.

O espectro apresentou ainda, uma constante de acoplamento grande ($J = 9,6$ Hz) entre os hidrogênios H-4a e H-10b, o que confirma uma relação *trans*-diaxial entre eles. Uma pequena constante de acoplamento $J_{1,10b} = 2,0$ Hz confirma a junção *cis* dos anéis B/C.

Os dados de RMN ^1H do composto **6** foram comparados com a literatura (Tabela 11) e chegou-se a estrutura do 7-metoxi-O-metillicorenina (Figura 42), um alcaloide do tipo homolicorina.

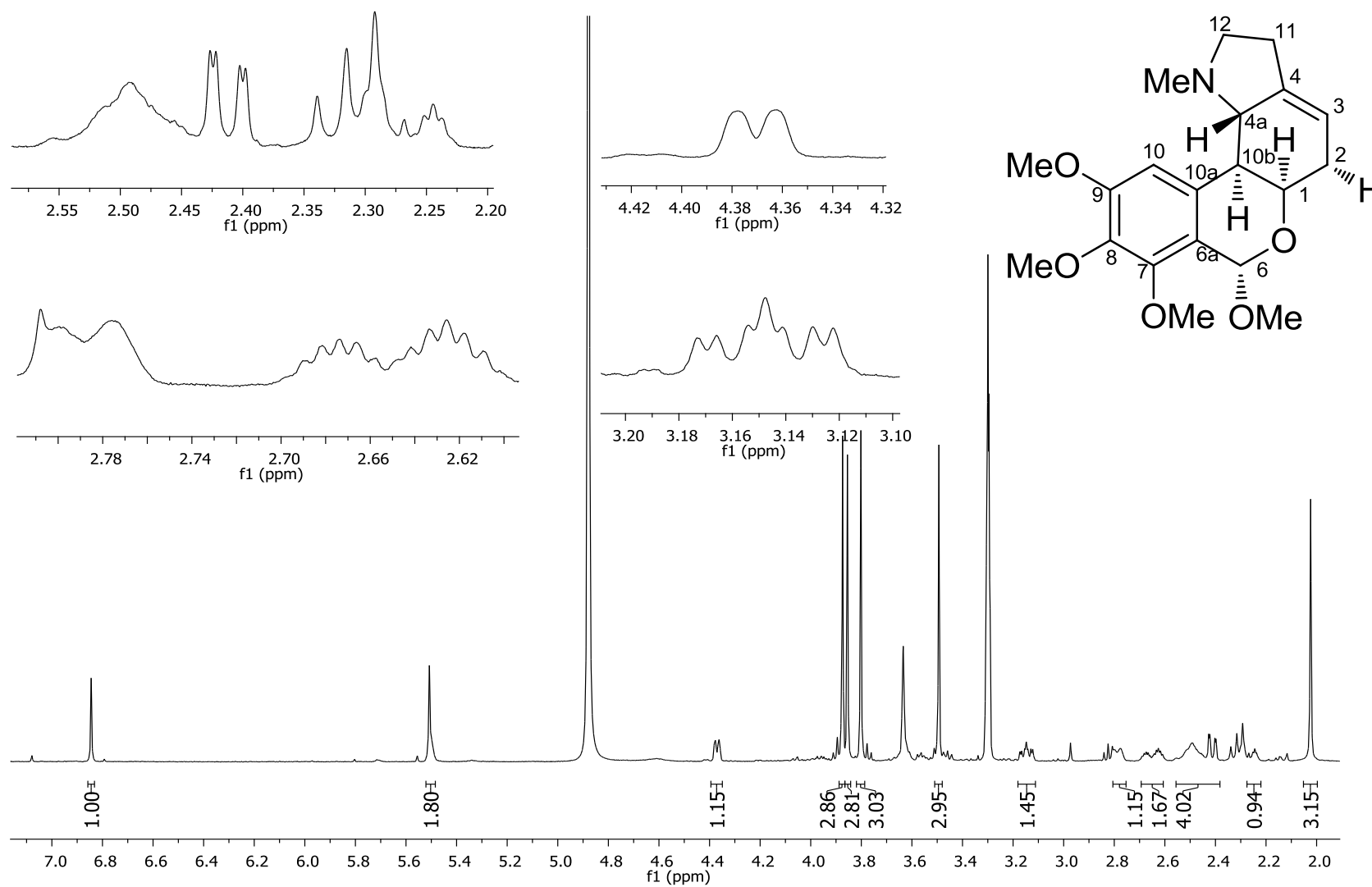


Figura 41: Espectro de RMN ^1H do composto **6** (CD_3OD , 400 MHz)

Tabela 11: Dados de RMN ^1H do composto **6** (CD_3OD , 400 MHz) em comparação com a literatura (CD_3OD , 500 MHz) (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA, 2014).

Posição	δ_{H} (J em Hz) Composto 6	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	4,37 <i>d</i> (5,6)	4,40 br <i>d</i> (6,5)
2 α	2,60 – 2,70 <i>m</i>	2,67 <i>ddt</i> (19,0; 6,5, 3,0)
2 β	2,22 – 2,27 <i>m</i>	2,29 <i>dt</i> (19,5; 3,0)
3	5,51 br <i>s</i>	5,55 br <i>s</i>
4a	2,79 br <i>d</i> (9,6)	2,92 br <i>d</i> (10,0)
6	5,51 br <i>s</i>	5,52 <i>s</i>
10	6,84 <i>s</i>	6,85 <i>s</i>
10b	2,41 <i>dd</i> (9,6; 2,0)	2,47 <i>dd</i> (10,0; 2,0)
11 α	2,44 – 2,55 <i>m</i>	2,49 – 2,58 <i>m</i>
11 β	2,44 – 2,55 <i>m</i>	2,49 – 2,58 <i>m</i>
12 α	3,15 <i>ddd</i> (10,0; 7,2; 2,8)	3,22 <i>ddd</i> (10,5; 7,5; 3,0)
12 β	2,44 – 2,55 <i>m</i>	2,42 <i>m</i>
6-OMe	3,49 <i>s</i>	3,51 <i>s</i>
7-OMe	3,87 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>
8-OMe	3,80 <i>s</i>	3,82 <i>s</i>
9-OMe	3,85 <i>s</i>	3,87 <i>s</i>
N-Me	2,02 <i>s</i>	2,11 <i>s</i>

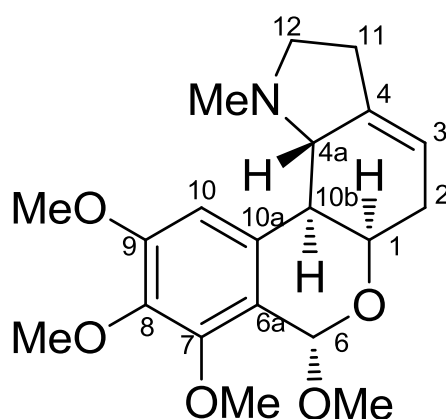


Figura 42: Estrutura química do 7-metoxi-O-metillicorenina (**6**)

O alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina (**6**) foi isolado pela primeira vez de *Zephyranthes cândida*, onde foi observado que a estrutura era bem semelhante a do alcaloide nerinina, com exceção da existência de uma metoxila na posição 6. Nesse trabalho (LUO, WANG, ZHANG *et al.*, 2012), o alcaloide foi denominado O-

metilnerinina e foi avaliada atividade citotóxica contra células cancerosas e saudáveis, onde se mostrou inativo contra as linhas tumorais testadas. Em 2014, também foi relatado o isolamento do composto **6** a partir de *Hippeastrum aulicum* (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al.*, 2014), onde foi denominado 7-metoxi-O-metillicorenina, denominação utilizada no presente trabalho.

4.1.6 – Composto 7

O composto **7** (63,2 mg) foi isolado da fração hexano de bulbos e analisado por RMN ^1H . O espectro de RMN ^1H (Figura 43) apresentou: somente um hidrogênio singleto na região de hidrogênios aromáticos (6,18 ppm), ausência de sinais na região de olefinas, dois sinais correspondentes a hidrogênios de metoxilas aromáticas e um sinal correspondente a hidrogênios de metoxila alifática.

O espectro de RMN ^1H levou a identificação do esqueleto desse composto como sendo do tipo crinano. A presença de apenas um sinal de hidrogênio aromático indica que o composto **7** possui o anel A pentasubstituído.

O H-4 β apresentou-se como um quadrupeto com constante de acoplamento grande ($J = 12,4$ Hz), indicativo de dois acoplamentos *trans*-diaxial com o H-3 e o H-4, juntamente com o acoplamento geminal com o H-4 α . O H-2 β também apresentou três constantes de acoplamento grandes ($J = 13,2, 13,2$ e $11,6$ Hz), duas *trans*-diaxial com H-1 α e H-3 e uma geminal com H-2 α , além de uma constante de acoplamento pequena, em torno de 4 Hz, indicando o acoplamento com o H-1 β . Esses desdobramentos para H-2 β e H-4 β estão de acordo com uma relação *cis* entre o grupo 3-OMe e a ponte 5,10b-etano

Os dados de RMN ^1H obtidos para o composto **7** foram congruentes com os dados do alcaloide aulicina encontrados na literatura (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al.*, 2014), como pode ser visto na tabela 12.

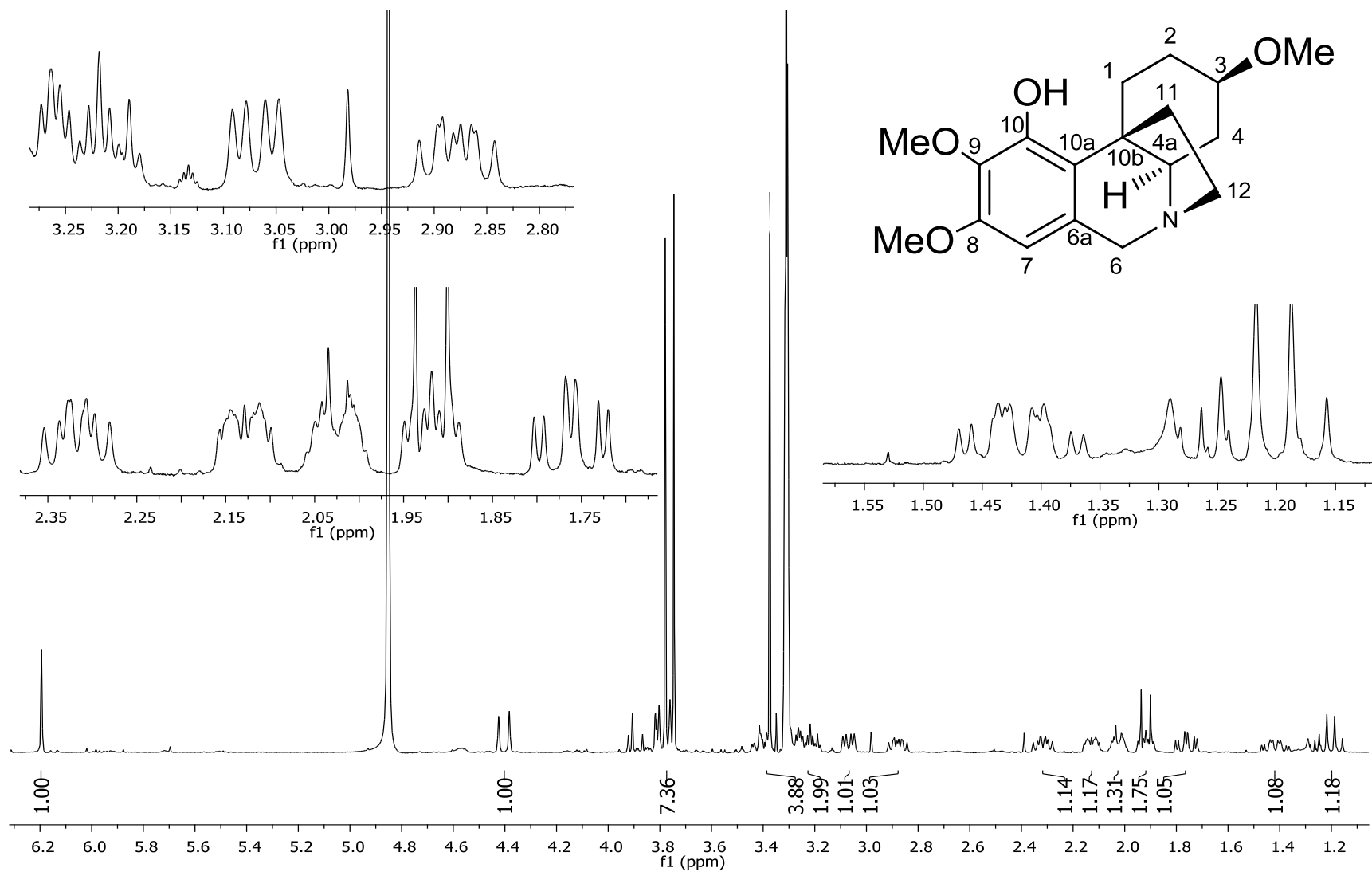


Figura 43: Espectro de RMN ^1H do composto **7** (CD_3OD , 400 MHz)

Tabela 12: Dados de RMN ^1H do composto **7** (CD_3OD , 400 MHz) em comparação com a literatura (CDCl_3 , 400 MHz) (de ANDRADE, GUO, FONT-BARDIA *et al.*, 2014).

Posição	δ_{H} (J em Hz) composto 7	δ_{H} (J em Hz) literatura
1 α	1,76 <i>td</i> (14,0; 4,4)	1,77 <i>td</i> (14,0; 4,0)
1 β	3,17 – 3,28 <i>m</i>	3,10 – 3,20 <i>m</i>
2 α	1,98 – 2,06 <i>m</i>	2,04 <i>m</i>
2 β	1,42 <i>tdd</i> (13,2; 11,6; 4,0)	1,44 <i>tdd</i> (13,5; 11,5; 4,0)
3	3,17 – 3,28 <i>m</i>	3,10 – 3,20 <i>m</i>
4 α	2,13 <i>br d</i> (13,2)	2,13 <i>br d</i> (12,4)
4 β	1,20 <i>q</i> (12,0)	1,21 <i>q</i> (12,4)
4a	3,07 <i>dd</i> (12,4; 5,6)	2,93 <i>dd</i> (12,4; 5,2)
6 α	4,40 <i>d</i> (16,6)	4,38 <i>d</i> (16,8)
6 β	3,78 <i>d</i> (16,6)	3,71 <i>d</i> (16,8)
7	6,19 <i>s</i>	6,10 <i>s</i>
11 $endo$	1,92 <i>ddd</i> (12,4; 8,8; 3,6)	1,90 <i>ddd</i> (12,0; 8,8; 3,2)
11 exo	2,31 <i>ddd</i> (12,0; 10,8; 6,8)	2,23 <i>ddd</i> (12,4; 10,4; 6,4)
12 $endo$	2,88 <i>ddd</i> (12,8; 8,8; 6,8)	2,78 <i>ddd</i> (12,8; 8,8; 6,4)
12 exo	3,40 <i>ddd</i> (12,8; 10,0; 3,2)	3,36 <i>ddd</i> (12,8; 10,0; 3,2)
3-OMe	3,37 <i>s</i>	3,38 <i>s</i>
8-OMe	3,74 <i>s</i>	3,80 <i>s</i>
9-OMe	3,78 <i>s</i>	3,87 <i>s</i>

A identificação da configuração da ponte, em α ou β , foi realizada através de dicroísmo circular (Figura 44), que apresentou efeito Cotton positivo em 251 nm e negativo em 279 nm, valores indicativos da ponte na posição β , sendo o alcaloide do tipo crinina. Com base nos dados de RMN ^1H e de DC, o composto **7** foi identificado como o alcaloide aulicina (Figura 45).

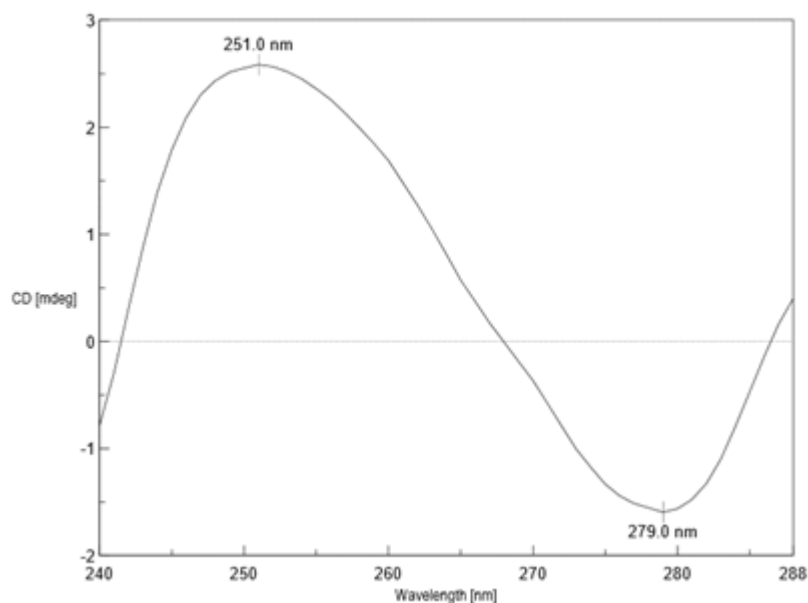


Figura 44: Espectro de dicroísmo circular do composto 7

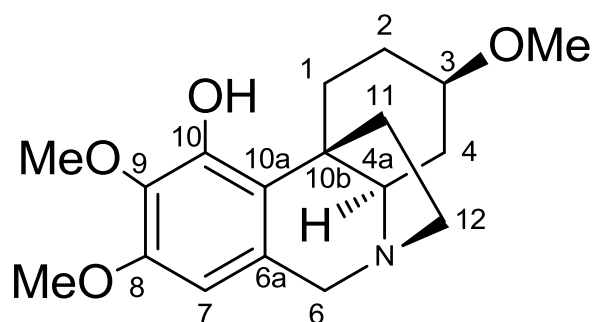


Figura 45: Estrutura química do alcaloide aulicina (7)

Um alcaloide com essa mesma estrutura química, sob o nome hipeastidina, foi completamente caracterizado por técnicas de RMN por KULHÁNKOVÁ e colaboradores (2013). Contudo, nesse trabalho (KULHÁNKOVÁ, CAHLÍKOVÁ, NOVÁK *et al*, 2013), a estereoquímica da ponte não pôde ser confirmada devido à falta de análise por dicroísmo circular e cristalografia de Raios-X. Além disso, os hidrogênios das posições 3 e 4 aparecem como multipletos, o que dificulta a atribuição da relação *cis* ou *trans* entre a ponte e o substituinte 3-OMe.

Em 2014, de ANDRADE e colaboradores, trabalhando com a espécie *Hippeastrum aulicum*, isolaram um composto com dados de RMN semelhantes aos de hippeastidina, com diferença nas multiplicidades do H-3 e H-4, responsáveis pela identificação da relação *cis* ou *trans* entre ponte e o substituinte em C-3. Além de todos os dados de RMN, também foram realizadas análises de dicroísmo circular e cristalografia de Raios-X, o que confirmou que o alcaloide isolado por de Andrade possuía a ponte em posição β e foi denominado aulicina (**7**).

O composto **7** foi identificado como aulicina, uma vez que seus dados de RMN e DC foram congruentes com os encontrados por de Andrade e colaboradores (2014).

4.1.7 – Composto 8

O composto **8** (160,7 mg) foi isolado a partir da fração acetato de etila de bulbos e foi analisado por RMN ^1H . O espectro de RMN ^1H (Figura 46) apresentou: (a) dois hidrogênios singletos relativos a hidrogênios aromáticos *para* orientados em 6,87 e 6,62 ppm atribuídos aos H-10 e H-7, respectivamente; (b) um sinal em 5,89 ppm integrando para 2H, típico do grupo metilenodioxifenila; (c) um sinal referente a hidrogênio de olefina; (d) dois dubletos em sistema AB com constante de acoplamento de grande magnitude ($J = 14,0$ Hz) correspondentes aos hidrogênios da posição C-6 e ausência de sinais de metoxilas. As características desse espectro indicam que esse composto é um alcaloide de esqueleto do tipo licorina.

Os hidrogênios H-1 e H-2 aparecem mais desblindados, evidência de átomo eletronegativo ligado aos carbonos C-1 e C-2. Na ausência de metoxilas, foram atribuídos grupos hidroxila para essas posições, grupos comuns em alcaloides do tipo licorina.

Os sinais observados para os hidrogênios β das posições 6 e 12 aparecem mais desblindados do que os seus homólogos α devido a relação *cis* com o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio do grupo NMe (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006).

A grande constante de acoplamento observada entre H-4a e H-10b ($J = 10,8$ Hz), é indicativa de acoplamento *trans*-diaxial, o que confirma a junção *trans* dos anéis B/C.

Os dados de RMN ^1H do composto **8** foram comparados com a literatura (Tabela 13) (LIKHITWITAYAWUID, ANGERHOFER, CHAI *et al.*, 1993), (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006), e concluiu-se que se tratava do alcaloide licorina (**8**) (Figura 47).

Alguns sinais demonstraram uma pequena diferença no deslocamento químico, o que pode ter sido causado pela diferença de solventes utilizados na análise.

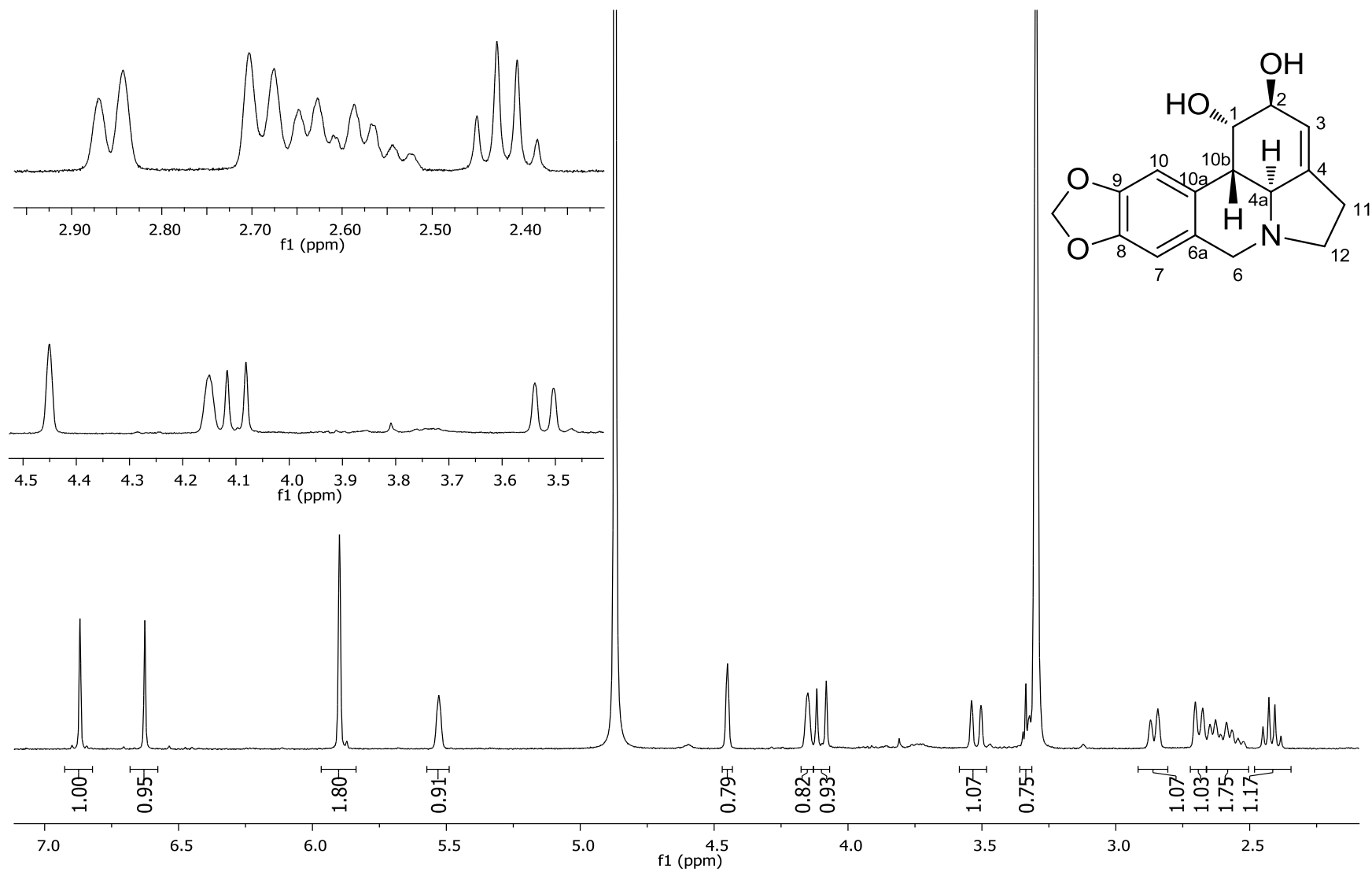


Figura 46: Espectro de RMN ^1H do composto **8** (CD_3OD , 400 MHz)

Tabela 13: Dados de RMN ^1H do composto **8** (CD_3OD , 400 MHz) em comparação com a literatura (DMSO-d_6 , 300 MHz) (LIKHITWITAYAWUID, ANGERHOFER, CHAI *et al.*, 1993)

Posição	δ_{H} (J em Hz) Composto 8	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	4,45 s	4,27 br s
2	4,15 s	3,97 br s
3	5,52 s	5,37 br s
4a	2,86 <i>d</i> (10,8)	2,60 <i>d</i> (10,6)
6 α	3,52 <i>d</i> (14,0)	3,32 <i>d</i> (14,4)
6 β	4,10 <i>d</i> (14,0)	4,02 <i>d</i> (14,4)
7	6,62 s	6,68 s
10	6,87 s	6,81 s
10b	2,68 <i>d</i> (11,2)	2,50 <i>m</i>
11 α	2,50 – 2,65 <i>m</i>	2,44 <i>m</i>
11 β	2,50 – 2,65 <i>m</i>	2,44 <i>m</i>
12 α	2,41 <i>q</i> (8,8)	2,19 <i>ddd</i> (14,4; 8,6;1,5)
12 β	3,32 – 3,36 <i>m</i>	3,19 <i>dd</i> (14,4; 7,5)
OCH ₂ O	5,89 s	5,94 s e 5,96 s

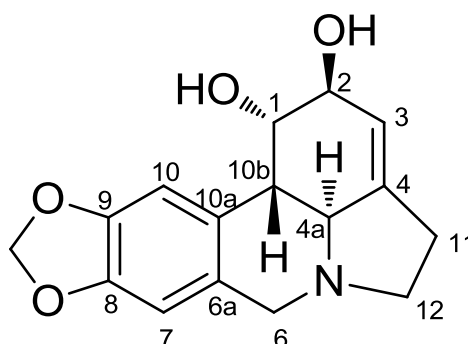


Figura 47: Estrutura química do alcaloide licorina (**8**)

Licorina (**8**) é o alcaloide de Amaryllidaceae mais abundante e possui diversas atividades biológicas já relatadas (MCNULTY, NAIR, SINGH *et al.*, 2009), entre elas: atividade antiviral contra vírus da gripe (HE, QI, TIAN *et al.*, 2012), antifúngica contra *Candida albicans* (EVIDENTE, ANDOLFI, ABOU-DONIA *et al.*, 2004), antimalárica (SENER, ORHAN e SATAYAVIVAD, 2003) e anticâncer (LUO, WANG, ZHANG *et al.*, 2012). Além dessas atividades, licorina também é usada em semissíntese como precursor de alcaloides com atividades contra *Trypanosoma brucei brucei* (TORIIZUKA, KINOSHITA, KOGURE *et al.*, 2008), contra *Plasmodium falciparum*

(causador da malária) (TORIIZUKA, KINOSHITA, KOGURE *et al.*, 2008), (CÉDRON, GUTIÉRREZ, FLORES *et al.*, 2010) e *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI, JUNIOR, de ANDRADE *et al.*, 2012).

4.1.8 – Composto 9

O composto **9** (1,5 mg) foi obtido a partir da fração acetato de etila dos bulbos. O espectro de RMN ^1H do composto **9** apresentou seus sinais na parte mais desblindada do espectro. O sinal mais desblindado no espectro de RMN ^1H (Figura 48) foi observado em 9,55 ppm e atribuído ao H-6, devido a proximidade com o átomo de nitrogênio. Um singleto integrando para 2H em 6,42 ppm foi atribuído ao grupo metilendioxifenila. Também foram observados: dois sinais de hidrogênios aromáticos *para* orientados em 8,44 e 7,83 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-7, respectivamente.

Dois duplo duplo dubletos, em 8,01 e 7,97 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-2, respectivamente, devido à presença de duas constantes de acoplamento características de acoplamento *orto* ($J = 7,6$ Hz), o que indica que esses hidrogênios apresentam dois hidrogênios vicinais.

Os outros dois sinais restantes foram assinalados para os hidrogênios H-1 e H-4, que aparecem como dois dubletos, com uma constante de acoplamento *orto* ($J = 8,0$ Hz) e uma constante de acoplamento menor ($J = 2,0$ Hz) relativa ao acoplamento *meta*.

Todos os sinais obtidos no espectro de RMN ^1H foram comparados com os dados da literatura (Tabela 14) (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006), (SUAU, GOMEZ e RICO, 1990), levando a identificação do composto **9** como sendo o alcaloide trisfaeridina (**9**) (Figura 49).

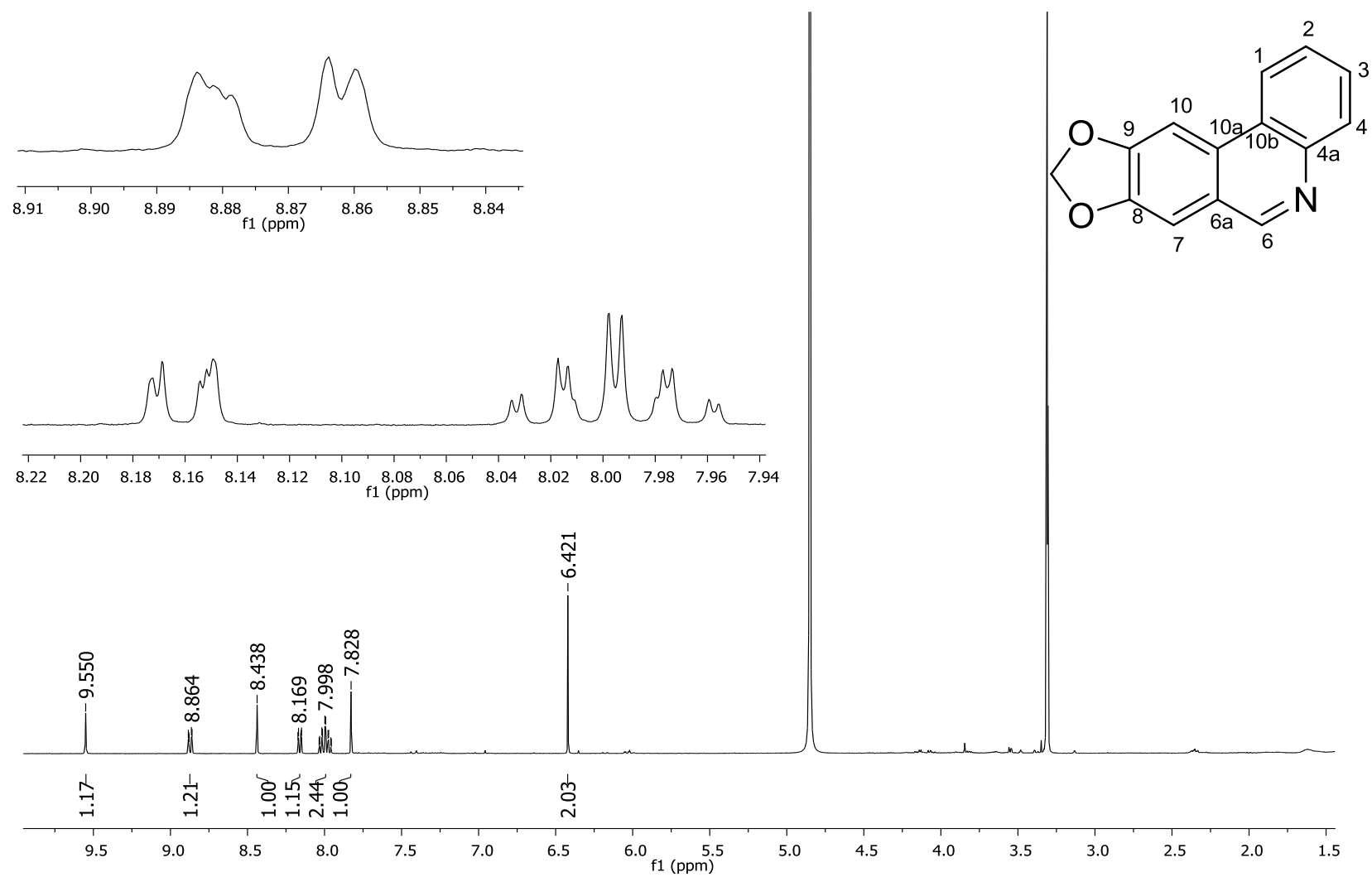


Figura 48: Espectro de RMN ^1H do composto **9** (CD_3OD , 400 MHz)

4.1.9 – Composto 10

O composto **10** (3,6 mg) foi obtido de uma fração acetato de etila dos bulbos e por meio de análise por RMN ^1H (Figura 50), identificou-se que o composto **10** é um alcaloide com esqueleto do tipo licorina.

O espectro de RMN ^1H apresentou dois sinais na região de aromáticos (6,98 e 6,75 ppm) atribuídos aos hidrogênios *para* orientados H-10 e H-7, respectivamente; um sinal na região de hidrogênios olefínicos (5,62 ppm, H-3), dois sinais característicos de grupos metoxila aromáticos e um de grupo metoxila alifático.

Os hidrogênios da posição C-6 foram atribuídos aos dois dubletos em sistema AB com grande constante de acoplamento ($J = 14,0$ Hz), os quais foram confirmados pela correlação COSY (Figura 51) existente entre eles e pelo mapa de contornos HSQC (Figura 52) que demonstrou que esses hidrogênios estão ligados ao mesmo carbono. Ainda pelo espectro de COSY assinalaram-se os hidrogênios das posições H-4a e H-10b.

Os hidrogênios em posição β dos carbonos 6 e 12 apresentaram-se mais desblindados do que os de posição α . Tal efeito é devido à relação *cis* com o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006).

Através do mapa de contornos HSQC identificou-se os hidrogênios referentes ao multiplete (2,56-2,66 ppm, 2H), como os hidrogênios da posição C-11, uma vez que estão ligados ao mesmo carbono. Tal ferramenta também foi utilizada para confirmar que um duplo dubleto largo em 3,35 ppm (quase sobreposto ao sinal do solvente) correspondia ao H-12 β .

Os hidrogênios H-4a e H-10b acoplam com uma constante de aproximadamente 11 Hz, indicando uma relação *trans*-diaxial entre eles e confirmando assim, que a junção dos anéis B e C é *trans*.

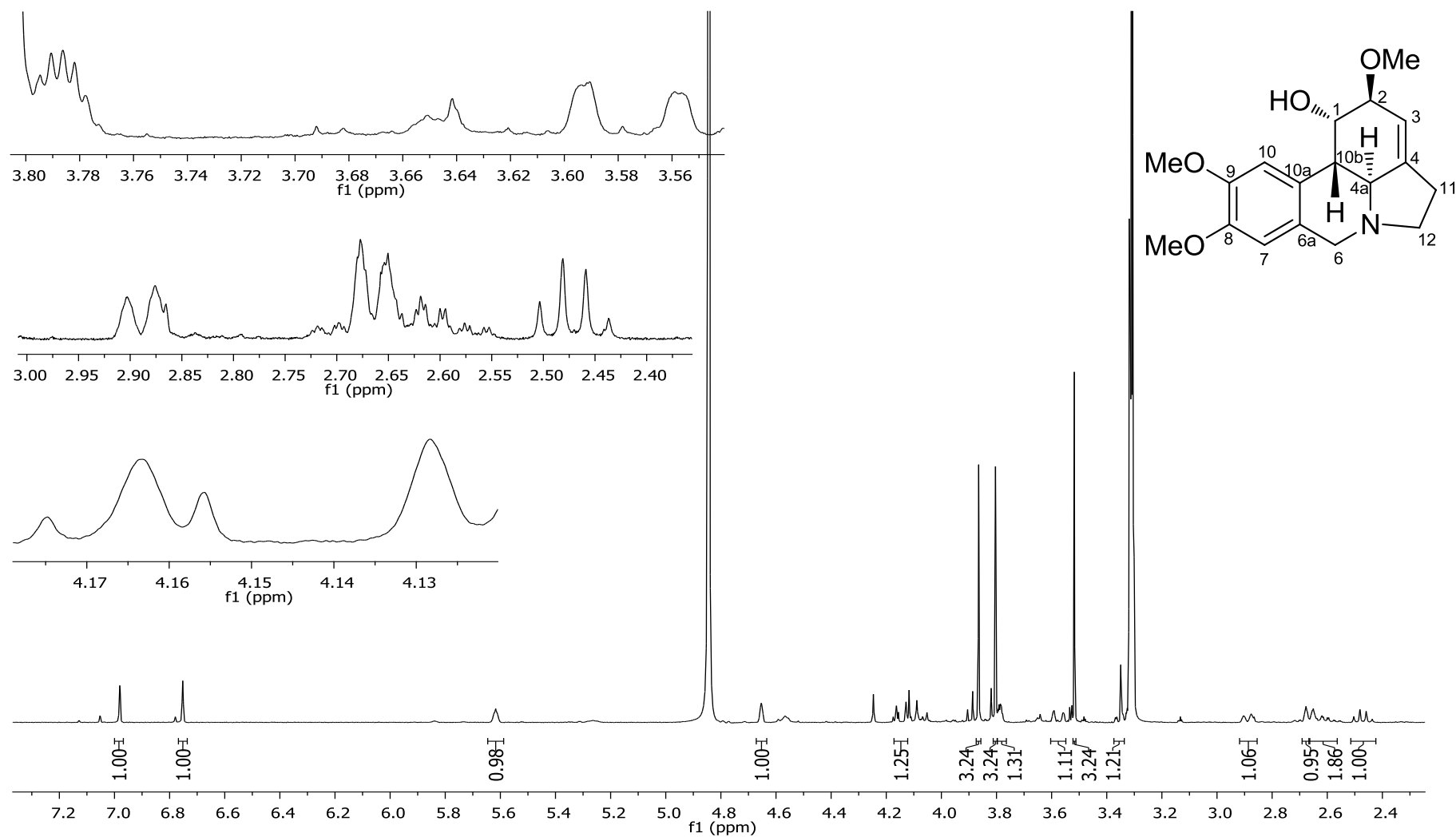


Figura 50: Espectro de RMN ^1H do composto **10** (CD_3OD , 400 MHz)

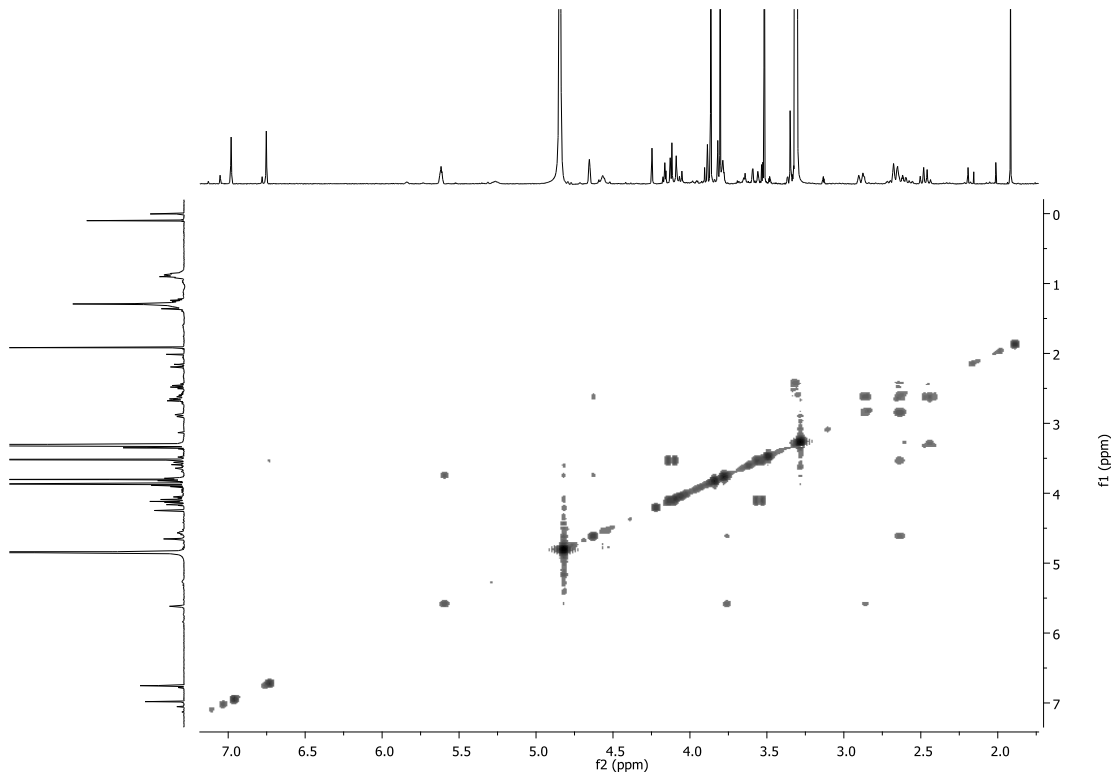


Figura 51: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto **10** (CD_3OD , 400 MHz)

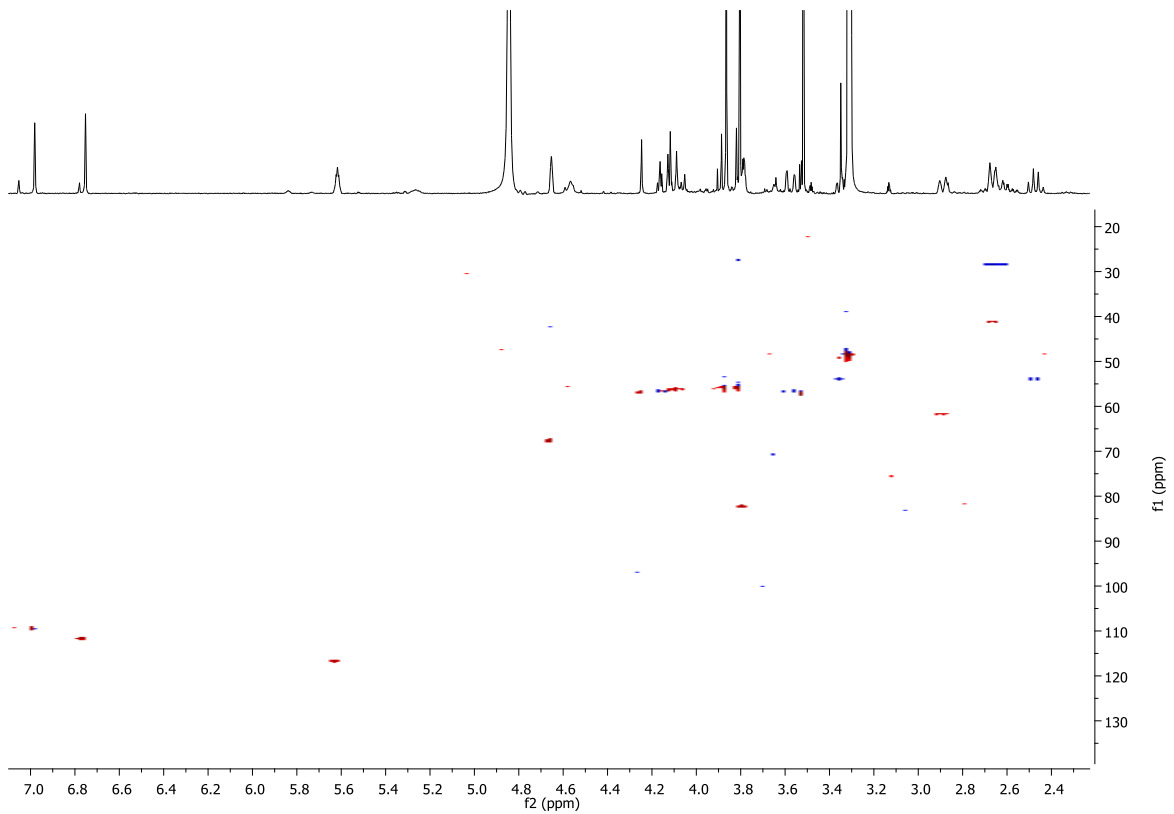


Figura 52: Mapa de contornos HSQC do composto **10** (CD_3OD , 400 MHz)

Os dados de RMN ^1H foram comparados com os encontrados na literatura para o alcaloide galantina (BASTIDA, CODINA, VILADOMAT *et al.*, 1990), o que pode ser observado na tabela 15. Todas as características dos espectros de RMN mono e bidimensionais levaram a identificação do composto **10** como sendo galantina (Figura 53).

Tabela 15: Dados de RMN ^1H e de COSY do composto **10** (CD_3OD , 400 MHz) comparados com a literatura (CDCl_3 , 200 MHz) (BASTIDA, CODINA, VILADOMAT *et al.*, 1990)

Posição	δ_{H} (J em Hz) Composto 10	COSY	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	4,65 br s	H-2, H-10b,	4,55 s
2	3,77 – 3,80 m	H-1, H-3	3,72 m
3	5,62 br s	H-2, H-4a	5,55 br s
4a	2,89 d (10,8)	H-3, H-10b	2,65 s
6 α	3,57 br d (14,0)	H-6 β	3,40 br d (14,0)
6 β	4,14 br d (14,0)	H-6 α	4,05 d (14,0)
7	6,75 s		6,52 s
10	6,98 s		6,78 s
10b	2,68 br s	H-1, H-4a	2,65 s
11 α	2,56 – 2,66 m	H-12 α , H-12 β	2,45 – 2,60 m
11 β	2,56 – 2,66 m	H-12 α , H-12 β	2,45 – 2,60 m
12 α	2,47 q (8,8)	H-11 α , H-11 β , H-12 β	2,25 dd (16,4, 8,2)
12 β	3,35 br dd (8,8; 2,0)	H-11 α , H-11 β , H-12 α	3,25 ddd (16,4, 10,0, 6,0)
9-OMe	3,86 s		3,78 s
8-OMe	3,80 s		3,74 s
2-OMe	3,52 s		3,40 s

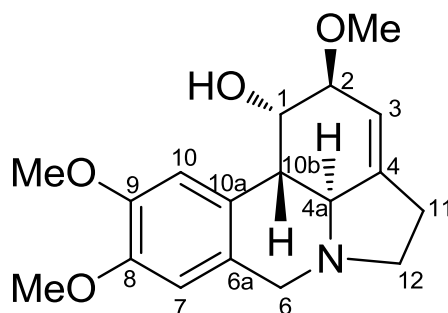


Figura 53: Estrutura química do alcaloide galantina (**10**)

Galantina (**10**), um alcaloide do tipo licorina, possui conhecidas atividades biológicas já relatadas na literatura, tais como: atividade inibitória da enzima AChE (JENSEN, CHRISTENSEN, JÄGER *et al.*, 2011), atividade de inibição da biossíntese do ácido ascórbico (EVIDENTE, CICALA, RANDAZZO *et al.*, 1983) e atividade antitumoral (BASTIDA, BERKOV, TORRAS *et al.*, 2011).

4.1.10 – Composto 11:

O composto **11** (1,5 mg) foi obtido a partir da fração acetato de etila de bulbos e foi analisado por técnicas mono e bidimensionais de RMN. O espectro de RMN ^1H (Figura 54) apresentou dois singletos correspondentes aos hidrogênios aromáticos *para* orientados em 6,95 e 6,59 ppm; apenas um sinal na região de hidrogênios olefínicos (5,44 ppm); dois dubletos, em um sistema AB, com grandes constantes de acoplamento (14,0 Hz), característicos de hidrogênios ligados ao carbono 6; um sinal referente a metoxila aromática (3,87; 3H; s); ausência de sinal de metoxila alifática e de metila ligada à nitrogênio (NMe). As características do RMN ^1H do composto **11** indicam que esse composto possui esqueleto do tipo licorina (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006).

Em alcaloides do tipo licorina é comum a existência de substituintes nas posições 1 e 2, porém, foi observado no espectro de correlação COSY (Figura 55) do composto **11** que a posição 2 não está substituída, e os dois hidrogênios dessa posição aparecem na região mais blindada do espectro.

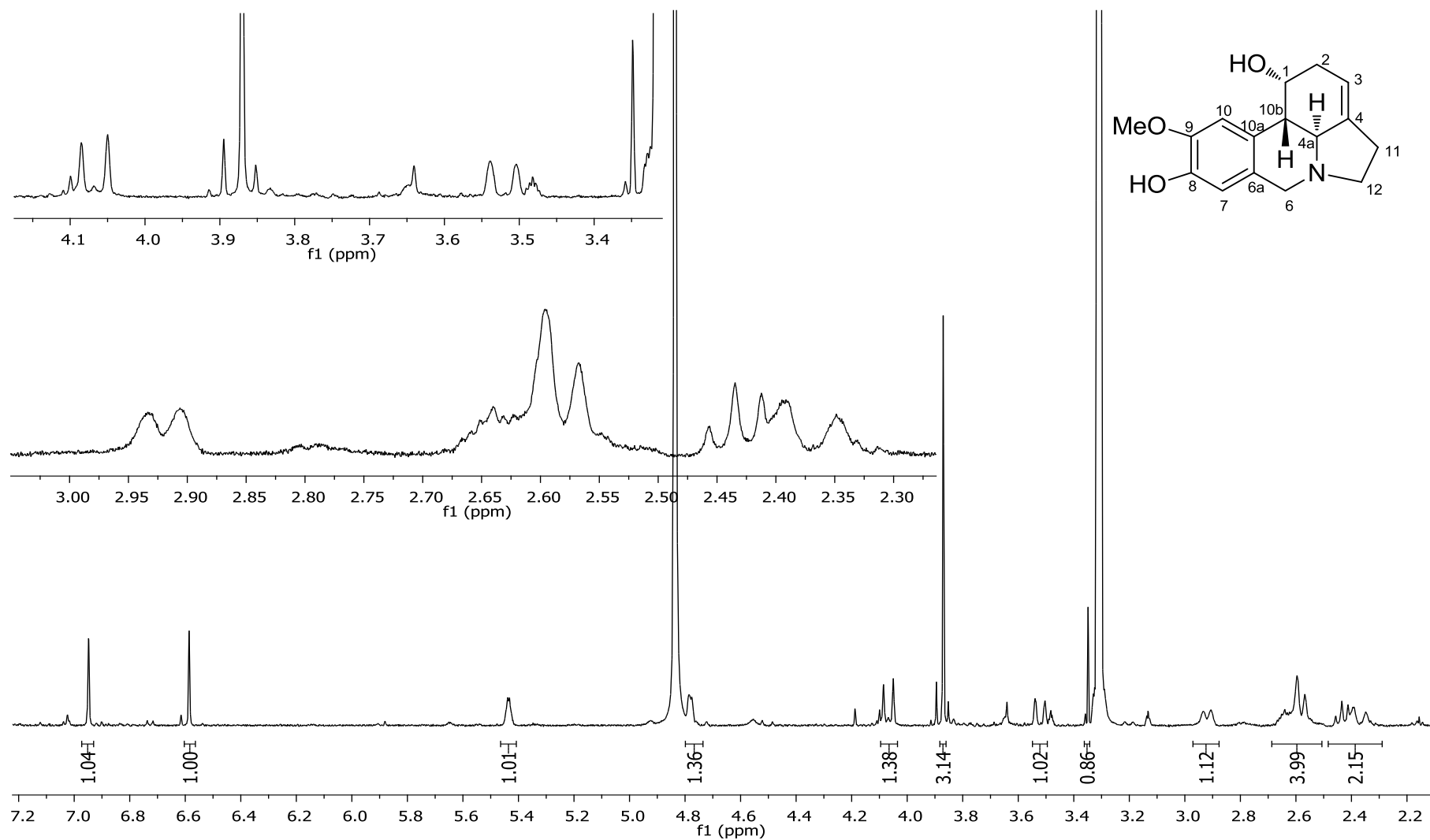


Figura 54: Espectro de RMN ^1H do composto **11** (CD_3OD , 400 MHz)

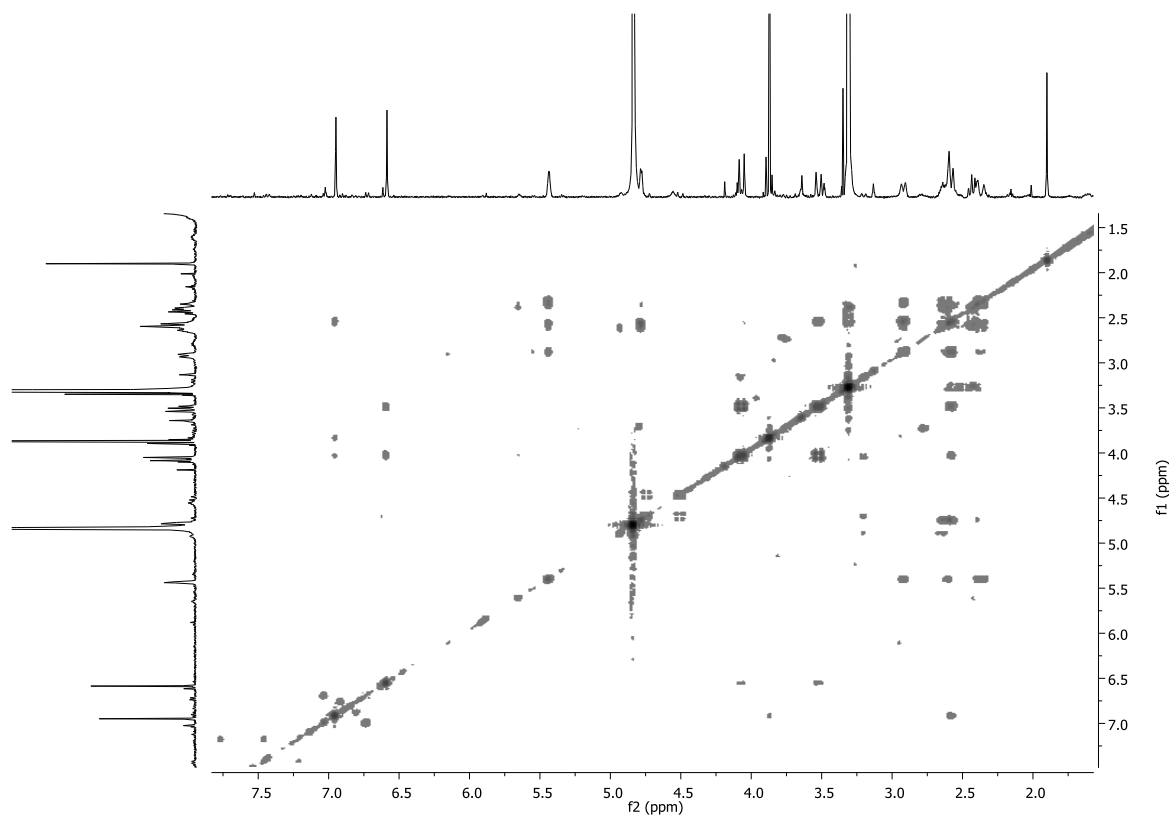


Figura 55: Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto **11** (CD_3OD , 400 MHz)

Os dados de RMN mono e bidimensionais (Figuras 54-56) obtidos para o composto **11** indicam que esse composto possui um esqueleto do tipo licorina, sem substituinte na posição 2 e com apenas uma metoxila aromática. Essas características estão de acordo com os alcaloides da série norpluvina. Os dados de RMN ^1H obtidos foram semelhantes aos encontrados na literatura (KREH, MATUSCH e WITTE, 1995) para o alcaloide 9-*O*-demetilpluvina (Figura 57).

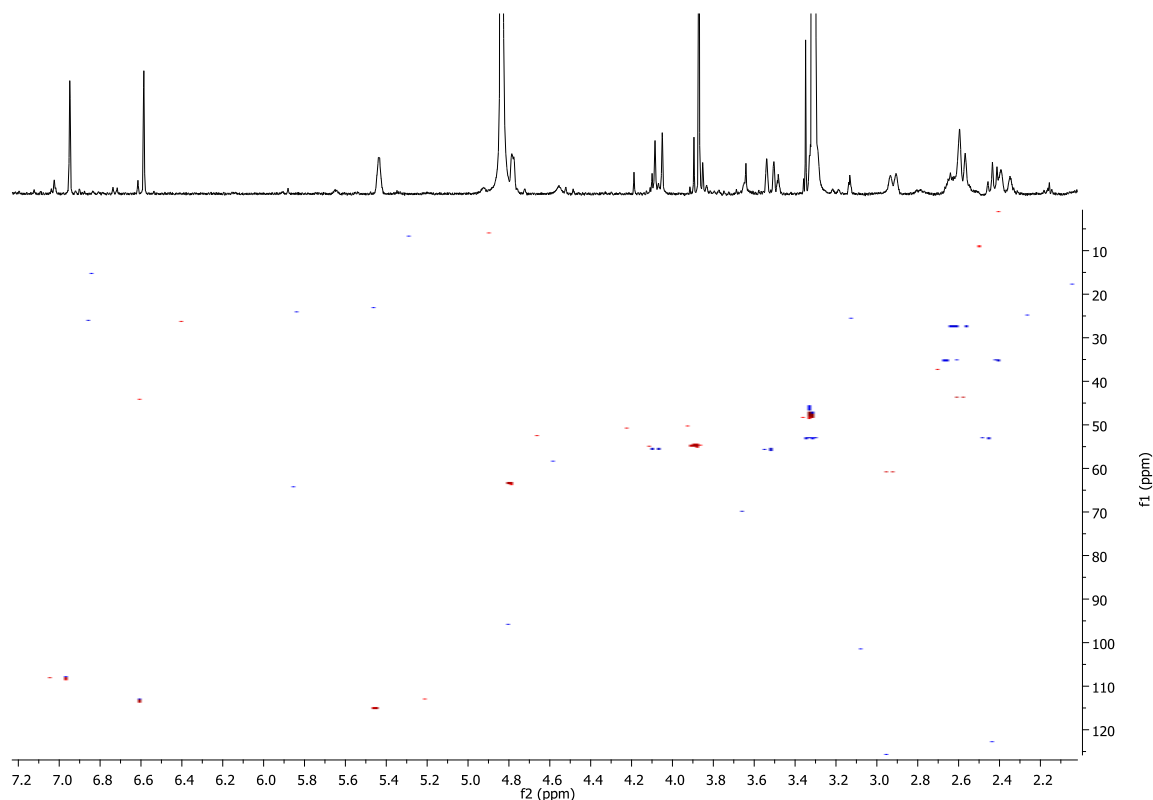


Figura 56: Mapa de contornos HSQC do composto **11** (CD₃OD, 400 MHz)

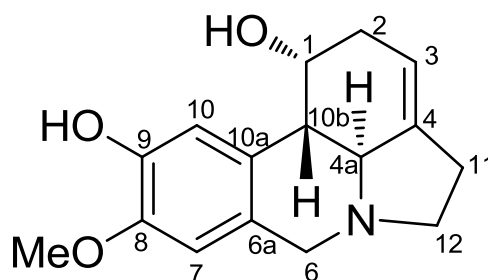


Figura 57: Estrutura química do 9-O-demetilpluvina

A fim de confirmar a posição da metoxila aromática no composto **11** foi realizada análise do espectro de NOESY (Figura 58), que demonstrou correlação entre o hidrogênio da posição 10 e os hidrogênios da metoxila aromática, o que indica que na estrutura do composto **11** a metoxila encontra-se na posição 9, sendo um isômero do 9-O-demetilpluvina. O composto em questão foi então identificado como norpluvina (Figura 59) e os dados de RMN ¹H foram congruentes com os

encontrados na literatura (LAMORAL-THEYS, ANDOLFI, VAN GOIETSENOVEN et al, 2009) para esse alcaloide (Tabela 16)

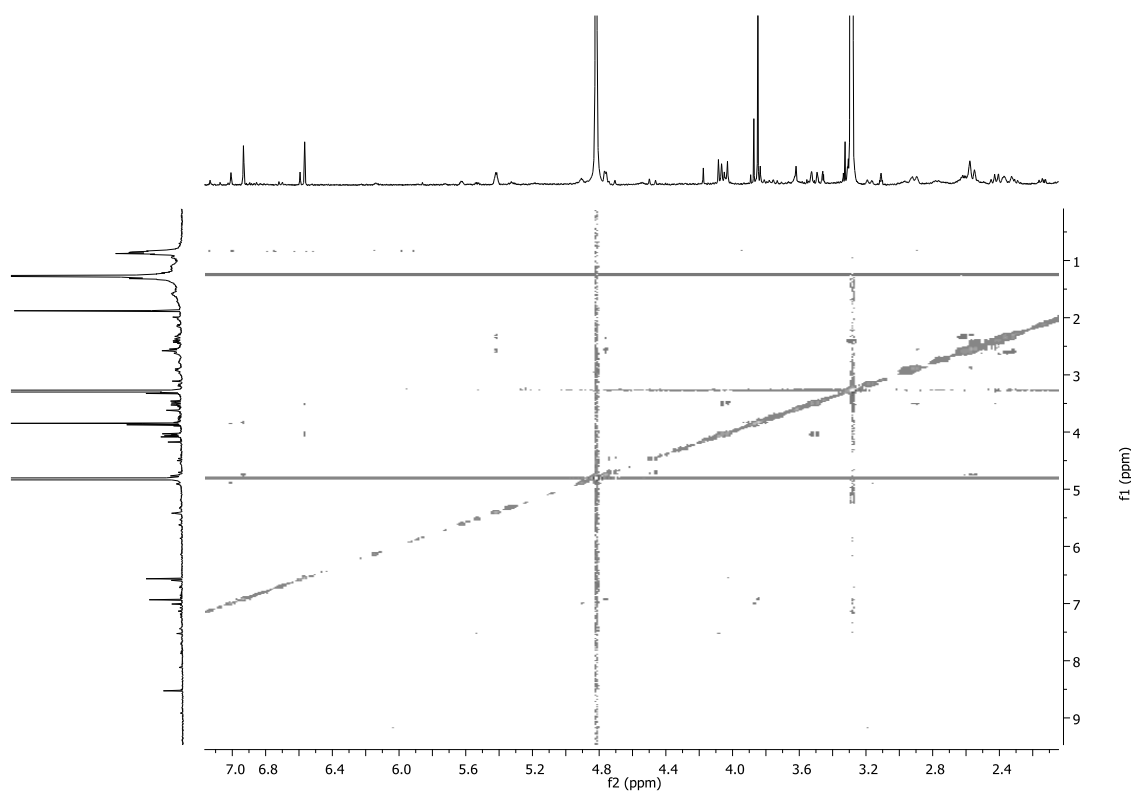


Figura 58: Espectro de NOESY do composto **11**

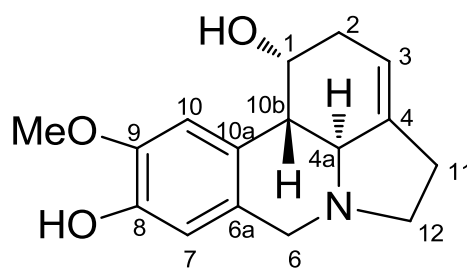


Figura 59: Estrutura química do alcaloide norpluvina (**11**)

Tabela 16: Dados de RMN ^1H do composto **11** (CD_3OD , 400 MHz) comparados com a literatura (CDCl_3 , 400 MHz) (LAMORAL-THEYS, ANDOLFI, VAN GOIETSENOVEN et al, 2009)

Posição	δ_{H} (J em Hz) Composto 11	δ_{H} (J em Hz) literatura
1	4,76 – 4,80 <i>m</i>	4,26 dd (5,9; 1,0)
2 α	2,51 – 2,67 <i>m</i>	2,62 <i>m</i>
2 β	2,31 – 2,47 <i>m</i>	2,33 <i>m</i>
3	5,44 br <i>d</i> (2,8)	5,39 <i>d</i> (2,2)
4a	2,92 <i>d</i> (10,8)	2,76 <i>d</i> (9,9)
6 α	3,52 <i>d</i> (14,0)	3,50 <i>d</i> (14,5)
6 β	4,07 <i>d</i> (14,0)	4,13 <i>d</i> (14,5)
7	6,59 <i>s</i>	6,64 <i>s</i>
10	6,95 <i>s</i>	6,74 <i>s</i>
10b	2,51 – 2,67 <i>m</i>	2,66 <i>d</i> (9,9)
11 α	2,51 – 2,67 <i>m</i>	2,59 <i>m</i>
11 β	2,51 – 2,67 <i>m</i>	2,59 <i>m</i>
12 α	2,31 – 2,47 <i>m</i>	2,37 <i>m</i>
12 β	3,32 – 3,34 <i>m</i>	3,34 <i>m</i>

O H-1 apresenta-se um pouco mais desblindado devido à proximidade com a hidroxila alifática. Os hidrogênios H-4a e H-10b apresentam constante de acoplamento de grande magnitude, indicando uma relação *trans*-diaxial entre eles, o que confirma junção *trans* dos anéis B e C, característica comum em alcaloides com esqueleto do tipo licorina.

4.2 – Avaliação da atividade antiparasitária dos alcaloides isolados

As doenças parasitárias tropicais, transmitidas por vetores, como a malária, leishmaniose, doença do sono e doença de Chagas, atingem milhares de pessoas, nas regiões equatoriais, a cada ano (KAYA, SARIKAYA, ONUR *et al.*, 2011) e alguns alcaloides de Amaryllidaceae já possuem relatos de atividades contra os parasitas causadores dessas doenças (KAYA, SARIKAYA, ONUR *et al.*, 2011), (OSORIO, BERKOV, BRUN *et al.*, 2010), (SENER, ORHAN e SATAYAVIVAD, 2003), (MACHOCHO, BASTIDA, CODINA *et al.*, 2004).

Os alcaloides haemantamina (1), albomaculina (2), 7-metoxi-O-metillicorenina (6), aulicina (7) e licorina (8), isolados no presente trabalho, foram submetidos a ensaios biológicos para avaliar atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (agente causador da doença de Chagas) e *Leishmania infantum* (agente causador da leishmaniose visceral) (Tabela 17). Benzonidazol e Miltefosina foram os fármacos usados como padrão, o primeiro com atividade tripanocida e o segundo com atividade leishmanicida e a citotoxicidade foi testada em células de mamíferos. Os valores de IC₅₀ contra os parasitas e os índices de seletividade (IS) estão apresentados na tabela 17.

O alcaloide albomaculina (2) foi inativo em todos os testes e 7-metoxi-O-metillicorenina (6) foi o único alcaloide a ter atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* apresentando IC₅₀ (89,55 µM) quase cinco vezes maior que o padrão, benzonidazol (IC₅₀ = 440,7µM). A relação entre a citotoxicidade e a atividade parasitária, dada pelo índice de seletividade (SI), indicou que o composto 6, além de ser mais ativo contra a forma tripomastigota, também é mais seletivo que o benzonidazol. Dessa forma, apresenta-se como agente promissor contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*.

Os compostos 1, 7 e 8 não apresentaram atividade antiparasitária contra a forma extracelular de *T. cruzi*, contudo valores de IC₅₀ demonstraram que esses compostos possuem atividade antiparasitária quando testados contra a forma amastigota de *T. cruzi*, sendo que os compostos 1 e 8 mostraram valores mais expressivos de IC₅₀, 2,4 e 7,7 µM, respectivamente. A atividade da haemantamina (1) contra o agente causador da doença de Chagas ocorreu como esperado, uma

vez que tal atividade já foi anteriormente descrita (KAYA, SARIKAYA, ONUR *et al.*, 2011).

Os testes de atividade antileishmania foram avaliados contra as formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum*. Os compostos **1** e **8** apresentaram atividade contra as duas formas do parasita quando baixas concentrações dos alcaloides foram utilizadas. Além disso, foi observada seletividade quase três vezes maior do alcaloide haemantamina (**1**) contra a forma promastigota de *L. infantum* quando comparado com o padrão miltefosina. Esses valores sugerem que esse alcaloide é um bom candidato para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas.

Aulicina (**7**) demonstrou atividade contra a forma extracelular de *L. infantum* com valor de IC_{50} mais baixo do que o encontrado para o padrão, miltefosina. Contudo, apresenta maior toxicidade contra as células NCTC, portanto a seletividade desse alcaloide é menor. O alcaloide **6** só foi ativo para a forma intracelular do parasita, com $IC_{50} = 86,12 \mu\text{M}$ e com toxicidade acima de $200 \mu\text{M}$.

Tabela 17: Atividades antiparasitárias e citotóxica dos alcaloides isolados, **1**, **2**, **6**, **7** e **8**, realizadas pelo método MTT.

Compostos	IC ₅₀ (µM) CI 95%								
	<i>T. cruzi</i> tripomastigotas	<i>T. cruzi</i> amastigotas	<i>L. infantum</i> promastigotas	<i>L. infantum</i> amastigotas	NCTC	IS	IS*	IS**	IS***
Haemantamina (1)	NA	2,4 (1,9-3,1)	0,6 (0,1-2,7)	1,78 (0,54-5,9)	24,75 (15,12-40,52)	ND	10,3	41,2	13,9
Albomaculina (2)	NA	NA	NA	NA	>200	ND	ND	ND	ND
7-metoxi-O- metilicorenina (6)	89,55 (68,8-116,6)	NA	NA	86,12 (64,12-115,7)	>200	>2,2	ND	ND	>2,3
Aulicina (7)	NA	55,5 (39,2-78,4)	11,5 (10,0-13,3)	NA	95,26 (75,62-120,0)	ND	1,71	8,28	ND
Licorina (8)	NA	7,7 (6,0-10,0)	9,4 (4,6-19,0)	4,88 (4,64-5,1)	46,74 (31,61-69,12)	ND	6,0	4,9	9,6
Benzonidazol	440,7 (406,1-478,3)		ND	ND	469,9 (414,9-532,1)	1,0		ND	ND
Miltefosina	ND	ND	16,7 (13,0-21,5)	16,4 (15,4-17,4)	241,4 (206,9-281,6)	ND	ND	14,4	14,7

IC₅₀: 50% concentração de inibição; CC₅₀: 50% concentração citotóxica (NCTC células de mamíferos); CI95%: 95% Intervalo de confiança; IS: índice de seletividade dos tripomastigotas (CC₅₀ células de mamíferos /IC₅₀ tripomastigotas); IS*: índice de seletividade dos amastigotas *T. cruzi* (CC₅₀ células de mamíferos/IC₅₀ amastigotas *T. cruzi*) IS**: índice de seletividade dos promastigotas (CC₅₀ células de mamíferos/IC₅₀ promastigotas); IS***: índice de seletividade dos amastigotas (CC₅₀ células de mamíferos/IC₅₀ amastigotas); NA: Não ativo; ND: Não determinado. *p < 0.05

5 – CONCLUSÃO

A família Amaryllidaceae possui um grupo de alcaloides que tem demonstrado possuir várias atividades biológicas e o estudo de suas espécies é de grande importância na busca de novos alcaloides a serem utilizados como agentes terapêuticos.

Nesse trabalho, *Hippeastrum aulicum*, uma espécie brasileira da família Amaryllidaceae teve seu conteúdo alcaloídico estudado e, por análise de CG-EM, foram identificados 26 alcaloides nas frações hexano e acetato de etila de folhas e bulbos dessa espécie.

O estudo dos alcaloides de folhas e bulbos de *Hippeastrum aulicum* levou ao isolamento de 11 alcaloides, são eles: haemantamina, albomaculina, haemantidina, 6-epihaemantidina, *N*-óxido haemantamina, 7-metoxi-*O*-metillicorenina, aulicina, licorina, trisfaeridina, galantina e norpluvina. Pela primeira vez foi relatada a obtenção do *N*-óxido haemantamina a partir de fonte natural.

Cinco dos alcaloides isolados foram testados contra as formas amastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* e contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania infantum*. O alcaloide 7-metoxi-*O*-metillicorenina apresentou atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* mais efetiva do que o padrão benzonidazol utilizado. Haemantamina e licorina apresentaram atividade contra as duas formas de *L. infantum* e contra a forma amastigota de *T. cruzi*. Albomaculina não apresentou atividade contra nenhuma das formas testadas, enquanto aulicina mostrou-se menos ativo do que os padrões utilizados.

Haemantamina mostrou atividade contra a forma promastigota de *Leishmania infantum*, com valores de IC₅₀ bem menores do que o padrão Miltefosina e ainda, boa seletividade, apresentando-se como possível candidato a ser estudado para a criação de novos fármacos. Portanto, a espécie *Hippeastrum aulicum* apresenta-se como importante fonte de pesquisa de alcaloides com potenciais atividades antiparasitárias.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. A produção de Amarílis no mercado brasileiro de flores. *Bioikos*, **20**, 71-74, 2006.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Imperial Novo Milênio, 2008. 67 p.

AUNTOUN, M. K.; MENDOZA, N. T.; RÍOS, Y. R.; PROCTOR, G. R.; WICKRAMARATNE, D. B. M.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. *J. Nat. Prod.*, **56**, 1423-1425, 1993.

BANWELL, M. G.; LUPTON, D. W.; MA, X.; RENNER, J.; SYDNES, M. O. Synthesis of quinolones, 2-quinolones, phenanthridines, and 6(5*H*)-phenanthridones via palladium[0]-mediated Ullmann cross-coupling of 1-bromo-2-nitroarenes with β -halo-enals, -enones, or -esters. *Org. Lett.*, **6**, 2741-2744, 2004.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, **32**, 679-688, 2009.

BASTIDA, J.; BERKOV, S.; TORRAS, L.; PIGNI, N. B.; de ANDRADE, J. P.; MARTINEZ, V.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: MUÑOZ-TORRERO, D. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, Kerala, Transworld Research Network, 2011, p.65-100.

BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; RUBIRALTA, M.; QUIRION, J-C.; HUSSON, H-P.; MA, G-E. *Narcissus* alkaloids, XIII. Complete assignment of the NMR spectra of papyramine and 6- *epi*-papyramine by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.*, **53**, 1456-1462, 1990.

BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: MUÑOZ-TORRERO, D. **The Alkaloids**. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Scientific Publishing, Volume 63, 2006, p. 87-179.

BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; LLABRES, J. M.; CODINA, C.; FELIZ, M.; RUBIRALTA, M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry*, **26**, 1519-1524, 1987.

BERKOV, S.; ROMANI, S.; HERRERA, M.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; MOMEKOV, G.; IONKOVA, I.; BASTIDA, J. Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytother. Res.*, **25**, 1686-1692, 2011.

BRAGA, F.C.; CASTILHO, R.O. Potencialidades do cerrado como fonte de substâncias bioativas e de espécies medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos. In: de SOUZA, G. H. B.; de MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**, 1 ed. Ouro Preto, Editora UFOP, 2011, p. 295-318.

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8ª ed.rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448 p.

BRIGGS, C. K.; HIGHET, P. F.; HIGHET, R. J.; WILDMAN, W. C. Alkaloids of the Amaryllidaceae VII. Alkaloids containing the hemiacetal or lactone group. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2899-2904, 1956.

BRINE, N. D.; CAMPBELL, W. E.; BASTIDA, J.; HERRERA, M. R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; SMITH, P. J. A dinitrogenous alkaloid from *Cyrtanthus obliquus*. *Phytochemistry*, **61**, 443-447, 2002.

CANDIDO, R. S.; FOURNY, A. C. S.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V.; LOPES, R. C. *Hippeastrum* species in areas of resting in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. *Acta Bot. Bras.*, **27**, 661-668, 2013.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acessado em dezembro de 2015.

CEDRÓN, J. C.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GUTIÉRREZ, D.; FLORES, N.; BUCIO, M. A.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; JOSEPH-NATHAN, P. Bioactive

Montanine Derivates from Halide-induced Rearrangements of Haemanthamine-type Alkaloids. Absolute Configuration by VCD. *Org. Lett.*, **11**, 1491-1494, 2009.

CEDRÓN, J. C.; GUTIÉRREZ, D.; FLORES, N.; RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivates. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 5464-5472, 2012.

CEDRÓN, J. C.; GUTIÉRREZ, D.; FLORES, N.; RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 4694-4701, 2010.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L.; FAY, M. F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, **161**, 132-136, 2009.

CITOGLU, G.; TANKER, M.; GÜMÜSEL, B. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytother. Res.*, **12**, 205-206, 1998.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3670–3695, 2013.

CROUCH, N. R.; POHL, T. T.; MULHOLLAND, D. A.; NDLOVU, E. Alkaloids from three ethnomedicinal *Haemanthus* species: *H. albiflos*, *H. deformis* and *H. pauculifolius* (Amaryllidaceae). *S. Afr. J. Bot.*, **71**, 49-52, 2005.

da SILVA, A. F. S., ***Hippeastrum vittatum* (L'her) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: Análise química e avaliação biológica dos alcaloides isolados.** Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. 182p.

da SILVA, A. F. S.; de ANDRADE, J. P.; BEVILAQUA, L. R. M.; de SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol., Biochem. Behav.*, **85**, 148-154, 2006.

de ANDRADE, J. P. **Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus Broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum***

(Amaryllidaceae). Tese de doutorado. Departamento de produtos naturais, biologia vegetal e edafologia da Universidade de Barcelona, Barcelona, 2014. 189 p.

de ANDRADE, J. P.; BERKOV, S.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; ZUANAZZI, J. A. S.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*, **16**, 7097-7104, 2011.

de ANDRADE, J. P.; GUO, Y.; FONT-BARDIA, M.; CALVET, T.; DUTILH, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; NAIR, J. J.; ZUANAZZI, J. A. S.; BASTIDA, J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptrotum*. *Phytochemistry*, **103**, 188-195, 2014.

DEANGELIS, G. G.; WILDMAN, W. C. Circular Dichroism Studies – I A quadrant rule for the optically active aromatic chromophore in rigid polycyclic systems. *Tetrahedron*, **25**, 5099-5112, 1969.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach, 2^a edição. England: John Wiley & Sons LTD, 2002. 507p.

DUTILH, J. H. A. **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987. 142 p.

DUTILH, J. H. A. Ornamental Bulbous Plants of Brasil. *Acta Hort. (ISHS)*, **683**, 37-42, 2005.

DUTILH, J. H. A.; OLIVEIRA, R. S. **Amaryllidaceae** in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4355>>. Acesso em: 23 Jun. 2015

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

EVIDENTE, A.; CICALA, M. R.; RANDAZZO, G.; RICCIO, R.; CALABRESE, G.; LISO, R.; ARRIGONI, O. Lycorine structure-activity relationships. *Phytochemistry*, **22**, 2193-2196, 1983.

FALES, H. M.; WILDMAN, W. C. The structures of haemanthamine and crinamine. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 197-205, 1960.

FENG, T.; WANG, Y-Y.; SU, J.; LI, Y.; CAI, X-H.; LUO, X-D. Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata*. *Helv. Chim. Acta*, **94**, 178-183, 2011.

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

GIORDANI, R. B.; JUNIOR, C. O. R.; de ANDRADE, J. P.; BASTIDA, J.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCA, T.; de ALMEIDA, M. V. Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. *Chem. Biol, Drug. Des.*, **80**, 129-133, 2012.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S.; DUTILH, J. H. A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Quim. Nova*, **31**, 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; RESEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; de CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Nat. Prod.*, **73**, 2019-2023, 2010.

HAWKSWORTH, W. A.; JEFFS, P. W.; TIDD, B. K.; TOUBE, T. P. The alkaloids of the Amaryllidaceae. Part XII. The aromatic oxygenation patterns and stereochemistry of some trioxyaryl alkaloids of the hemiacetal and lactone series. *J. Chem. Soc.*, 1991-2001, 1965.

HE, J.; QI, W-B.; TIAN, J.; JIAO, P-R.; LIU, G-Q.; ZHANG, C-H.; LIAO, M. Amaryllidaceae alkaloids exhibit anti-influenza activity in MDCK cells, an investigation of Amaryllidaceae alkaloids and MDCK cells insight. *J. Anim. Vet. Adv.*, **11**, 2485-2492, 2012.

HE, M.; QU, C.; GAO, O.; HU, X.; HONG, X. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv.*, **5**, 16562-16574, 2015.

HERRERA, M. R.; MACHOCHO, A. K.; BRUN, R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J. Crinine and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes critina*, *Planta Med.*, **67**, 191-193, 2001.

HOFMANN JUNIOR, A. E.; SEBEN, C.; MONTANHA, J. A.; DUTILH, J.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **14**, 7-14, 2004.

HOHMANN, J.; FORGO, P.; MOLNÁR, J.; WOLFARD, K.; MOLNÁR, A.; THALHAMMER, T.; MÁTHÉ, I.; SHARPLES, D. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis xfestalis*. *Planta Med.*, **68**, 454-457, 2002.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M.-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 181-199, 2006.

JEFFS, P. W.; HAWKSWORTH, W. A. Aromatic oxygenation patterns of some trioxyl-aryl Amaryllidaceae alkaloids belonging to the hemi-acetal and lactone group. *Tetrahedron Lett.*, **4**, 217-223, 1963.

JENSEN, B. S.; CHRISTENSEN, S. B.; JÄGER, A. K.; RONSTED, N. Amaryllidaceae alkaloids from the Australasian tribe Calostemmateae with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Biochem. Syst. Ecol.*, **39**, 153-155, 2011.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 1126-1142, 2011.

KAYA, G. I.; SARIKAYA, B.; ONUR, M. A.; SOMER, N. U.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; LAUINGER, I. L.; KAISER, M.; TASDEMIR, D. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochem. Lett.*, **4**, 301-305, 2011.

KOGURE, N.; KATSUTA, N.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H. Two new alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 1545-1548, 2011.

KREH, M.; MATUSCH, R.; WITTE, L. Acetylated alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry*, **40**, 1303-1306, 1995.

KULHÁNKOVÁ, A.; CAHLÍKOVÁ, L.; NOVÁK, Z.; MACÁKOVÁ, K.; KUNES, J.; OPLETAL, L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase- inhibitory activity. *Chem. Biodivers.*, **10**, 1120-1127, 2013.

LAMORAL-THEYS, D.; ANDOLFI, A.; VAN GOIETSENOVEN, G.; CIMMINO, A.; LE CALVÉ, B.; WAUTHOZ, N.; MÉGALIZZI, V.; GRAS, T.; BRUYÈRE, C.; DUBOIS, J.; MATHIEU, V.; KORNIENKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A. Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J. Med. Chem.*, **52**, 6244-6256, 2009.

LANE, J. E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C. C.; BOGITSH, B.J.; JONES, M.M.; SINGH, P.K.; CARTER, C.E. *In vitro* trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-*N*-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**, 263–266, 1996.

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*. *J. Nat. Prod.*, **56**, 1331-1338, 1993.

LUO, Z.; WANG, F.; ZHANG, J.; LI, X.; ZHANG, M.; HAO, X.; XUE, Y.; LI, Y.; HORGAN, D.; YAO, G.; ZHANG, Y. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. *J. Nat. Prod.*, **75**, 2113-2120, 2012.

MACHOCHO, A. K., BASTIDA, J., CODINA, C., VILADOMAT, F., BRUN, R., CHHABRA, S. C. Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry*, **65**, 3143 – 3149, 2004.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GERAMISOFF, J.; GRIFFIN, C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, **68**, 1068-1074, 2007.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; SINGH, M.; CRANKSHAW, D. J.; HOLLOWAY, A. C.; BASTIDA, J. Selective cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 3233-3237, 2009.

NEVES, D. P.; de MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11^a Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 494 p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75**, 311-335, 2012.

OLIVEIRA, A.; MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A.G.; LAGO, J. H. G.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Exp. Parasitol.* **2012**, *132*, 383–387.

OSORIO, E. J.; BERKOV, S.; BRUN, R.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; CABEZAS, F., BASTIDA, J. *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochem. Lett.*, **3**, 161-163, 2010.

PABUÇÇUOĞLU, V.; RICHOMME, P.; GÖZLER, T.; KIVÇAK, B.; FREYER, A. J.; SHAMMA, M. Four new crinine-type alkaloids from *Sternbergia* species. *J. Nat. Prod.*, **52**, 785-791, 1989.

PAGLIOSA, L. B.; MONTEIRO, S. C.; SILVA, K. B.; de ANDRADE, J. P.; DUTILH, J.; BASTIDA, J.; CAMMAROTA, M.; ZUANAZZI, J. A. S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, **17**, 698-701, 2010.

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*. *J. Nat. Prod.*, **49**, 995-1002, 1986.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Quím. Nova*, **25**, 45-61, 2002.

PINTO, A.C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a Química de produtos naturais. *Quim. Nova*, **18**, 608-615, 1995.

PORTELA-CUBILLO, F.; SCOTT, J. S.; WALTON, J. C.; Microwave-assisted synthesis of *N*-heterocycles using alkenone-, alkynone- and aryl-carbonyl *O*-phenyl oximes: formal synthesis of neocryptolepine. *J. Org. Chem.*, **73**, 5558-5565, 2008.

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* de bloqueadores de canal de cálcio, furazolidona e buparvaquona: reposicionamento, associações de fármacos e formulações lipossomais.** Tese de doutorado. Coordenadoria de Controle de doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2012. 272 p.

REYES-CHILPA, R.; BERKOV, S.; HERNANDEZ-ORTEGA, S.; JANKOWSKI, C. K.; ARSENEAU, S.; CLOTET-CODINA, I.; ESTE, J. A.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyrantes concolor*. *Molecules*, **16**, 9520-9533, 2011.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, **12**, 514-535, 2005.

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

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7ª Ed. Rio de Janeiro. LTC, 2007. 490p.

STAUBER, L. A.; FRANCHINO, E. M.; GRUN, J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J. Protozool.*, **5**, 269-273, 1958.

SUAU, R.; GOMEZ, A.I.; RICO, R. Ismine and related alkaloids from *Lapiedra Martinezii*. *Phytochemistry*, **29**, 1710-1712, 1990.

SZLAVIK, L.; GYURIS, A.; MINAROVITS, J.; FORGO, P.; MOLNAR, J.; HAHMANN, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.*, **70**, 871-873, 2004.

TADA, H.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*, **93**, 157–165, 1986.

TEMPONE, A.G.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.*, **77**, 572–585, 2011.

TORIIZUKA, Y., KINOSHITA, E.; KOGURE, N.; KITAJIMA, M.; ISHIYAMA, A.; OTOGURO, K.; YAMADA, H.; OMURA, S.; TAKAYAMA, H. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 10182-10189, 2008.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quim. Nova*, **29**, 326-337, 2006.

WAGNER, J.; PHAM, H. L.; DÖPKE, W. Alkaloids from *Hippeastrum Equestre* Herb, -5. Circular Dichroism Studies. *Tetrahedron*, **52**, 6591-6600, 1996.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2010. Disponível em: www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/. Acessado em 24/06/2015.