

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

**Alcaloides dos Bulbos das Espécies *Griffinia gardneriana*
(Herb.) Ravenna e *Habranthus itaobinus* Ravenna
(Amaryllidaceae): Perfil Químico e Propriedades
Citotóxicas e Genotóxicas**

Alkaloids from the Bulbs of Griffinia gardneriana (Herb.) Ravenna and
Habranthus itaobinus Ravenna (Amaryllidaceae): Chemical Profile and
Cytotoxic and Genotoxic Properties.

Eduardo Roberto Cole

Tese de Doutorado em Química

**Vitória
2018**

Eduardo Roberto Cole

**Alcaloides dos Bulbos das Espécies *Griffinia gardneriana*
(Herb.) Ravenna e *Habranthus itaobinus* Ravenna
(Amaryllidaceae): Perfil Químico e Propriedades
Citotóxicas e Genotóxicas**

Tese 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 Doutor em Química.

Área de Concentração: Química.

Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Lacerda Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges.

**VITÓRIA
2018**

R689a Cole, Eduardo Roberto, 1976-
Alcaloides dos bulbos das espécies *Griffinia gardneriana* (herb.)
Ravenna e *Habranthus itaobinus* Ravenna (Amaryllidaceae): Perfil químico
e propriedades citotóxicas e genotóxicas / Eduardo Roberto Cole. - 2018.
180 f.: il.

Orientador: Valdemar Lacerda Jr.
Co-Orientador: Warley de Souza Borges.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências Exatas.

1. Amaryllidaceae. 2. Alcaloides. 3. *Griffinia gardneriana*. 4. *Habranthus itaobinus*. 5. Câncer. I. Lacerda Jr., Valdemar. II. Borges, Warley de Souza. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. IV. Título.

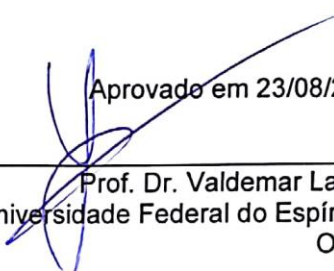
CDU: 54

Alcaloides dos Bulbos das Espécies *Griffinia gardneriana* (Herb.)
Ravenna e *Habranthus itaobinus* Ravenna (Amaryllidaceae): Perfil
Químico e Propriedades Citotóxicas e Genotóxicas

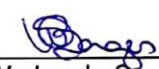
Eduardo Roberto Cole

Tese 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 Doutor em Química.

Aprovado em 23/08/2018 por:



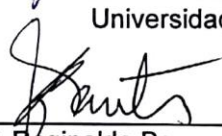
Prof. Dr. Valdemar Lacerda Jr.
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



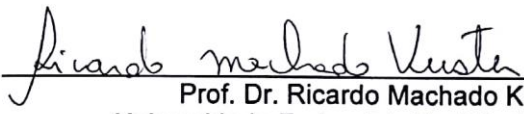
Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



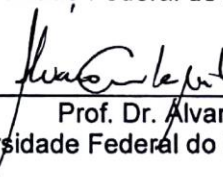
Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer
Universidade Vila Velha



Prof. Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Universidade Federal do Espírito Santo



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

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, agosto de 2018

*A Deus,
Minha família,
Meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo, por intermédio do Centro de Ciências Exatas, mais especificamente pelo Programa de Pós-graduação em Química, pela oportunidade de retornar à minha segunda casa e realizar o doutoramento.

Ao meu orientador, professor Dr. Valdemar Lacerda Júnior, por toda a confiança na minha capacidade de trabalho e pela autonomia confiada a mim, além é claro das valiosas críticas, sugestões e ensinamentos.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Warley de Souza Borges, pela oportunidade e confiança na realização desse trabalho e todo o apoio e preocupação demonstrados ao longo desta jornada, sempre me estimulando a buscar o melhor resultado possível.

A professora Dr.^a Denise Coutinho Endringer, pela participação na banca de qualificação, com suas valiosas contribuições, e pelo apoio no desenvolvimento dos ensaios biológicos, com seu apurado senso crítico e grandes ideias.

Ao meu grande amigo, e orientador do Mestrado, professor Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos, por toda a ajuda dada ao longo destes anos, mas em especial por permitir a realização dos experimentos em seu laboratório.

Ao professor Dr. Anderson Alves-Araújo pelo auxílio na identificação e herborização das espécies vegetais.

Ao professor Dr. Jaume Bastida pelas análises de CG-EM e DC realizadas e disponibilização da biblioteca de alcaloides de Amaryllidaceae.

Aos professores Dr. Álvaro Cunha Neto e Dr. Ricardo Machado Kuster pelas contribuições dadas na qualificação.

À pós-doutoranda Elisângela Flávia Pimentel Schmitt, pelo imenso auxílio nos ensaios biológicos.

Ao doutorando João Francisco Allochio Filho, pelo apoio nos estudos de *docking* molecular.

Aos amigos conquistados nesta jornada, Marcos, Karla, Jean, Andressa, David, Carol, Letícia, Vanessa, Amanda, Maria Helena, Maria, Natalie, Raphael e Carliani, por todos os bons momentos e grandes oportunidades de aprendizagem.

Ao Laboratório Central Analítica I do campus de Alegre da UFES, pela realização das análises de CG-EM.

Ao Laboratório de RMN do NCQP-UFES e à Júlia pela ajuda, amizade e realização das análises.

Ao LabPetro através do NCQP pelas facilidades obtidas para a realização dos experimentos.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPES, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto.

Enfim, agradeço aos responsáveis por estar aqui e por quem tudo sempre valerá a pena: Deus e minha família! Vocês são a razão pelo qual eu me dedico tanto à tudo!

CURRICULUM VITAE

Formação acadêmica

Doutorando em Química – 2014 a 2018. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória - ES.

Mestre em Química – Área de Concentração: Química. Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais, 2008. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória - ES.

Bacharel em Farmácia, 1999. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória - ES.

Atividades acadêmicas

Artigos publicados

COLE, E. R.; SANTOS, R. B. dos; LACERDA JÚNIOR, V.; MARTINS, J. D. L.; GRECO, S. J.; CUNHA NETO, A. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 821-828, 2014.

GASPARINI, L. S.; MACEDO, N. D.; PIMENTEL, E. F.; FRONZA, M.; L. JUNIOR, V.; BORGES, W. S.; COLE, E. R.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; LENZ, D. *In vitro* cell viability by CellProfiler® software as equivalent to MTT assay. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, p. 365-369, 2017.

Artigos under review

COLE, E. R.; BORGES, W. S.; De ANDRADE, J. P.; ALLOCHIO FILHO, J. F.; ARMENGOL, J. B.; ENDRINGER, D. C.; SCHMITT, E. F. P.; ARAÚJO, A. A.; Lacerda Jr., V. Cytotoxic and genotoxic activity of alkaloids from the bulbs of *Griffinia gardneriana* and *Habranthus itaobinus* (Amaryllidaceae). **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. Under review.

Apresentações de Trabalho

COLE, E. R.; ANDRADE, J. P.; ENDRINGER, D. C.; ARAUJO, A. G. A.; ARMENGOL, J. B.; BORGES, W. S.; LACERDA JR., V. **Estudo do perfil químico dos bulbos de *Habranthus itaobinus* Ravenna (Amaryllidaceae) e avaliação da atividade citotóxica.** In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia – SP.

GONRING, K. L.; COLE, E. R.; ANDRADE, J. P.; ENDRINGER, D. C.; ARAUJO, A. G. A.; ARMENGOL, J. B.; LACERDA JR., V.; BORGES, W. S. **Estudo químico-biológico dos bulbos de *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna (Amaryllidaceae).** In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia - SP.

FLOREZ, D. H.; COLE, E. R.; ARMENGOL, J. B.; BORGES, W. S.; ANDRADE, J. P.; LACERDA JR., V. **Estudo químico em alcaloides de *Worsleya procera* Amaryllidaceae).** In: 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia – GO.

COLE, E. R.; ANDRADE, J. P.; ENDRINGER, D. C.; ARAUJO, A. G. A.; ARMENGOL, J. B.; BORGES, W. S.; LACERDA JR., V. **Study on the chemical profile of alkaloids from the bulbs of *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna and *Habranthus itaobinus* Ravenna (Amaryllidaceae) species and assessment of their cytotoxic properties.** In: 6th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and XXXII RESEM, 2017, Vitória – ES.

“A natureza não faz nada em vão”.
(Aristóteles)

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Substâncias bioativas isoladas no início do século XIX.....	4
Figura 2. Exemplos da exuberância da família Amaryllidaceae: <i>Narcissus pseudonarcissus</i> , <i>Leucojum aestivum</i> e <i>Galanthus elwesii</i> “Polar Bear”, na sequência.....	8
Figura 3. <i>Lycoris radiata</i> e o alcaloide licorina.....	10
Figura 4. Formação do intermediário norbeladina por fusão dos aminoácidos <i>L</i> -Phe e <i>L</i> -Tyr.....	11
Figura 5. Acoplamentos fenol oxidativos em alcaloides de Amaryllidaceae.....	12
Figura 6. Esqueletos típicos de alcaloides de Amaryllidaceae.....	13
Figura 7. Alcaloides de Amaryllidaceae dotados de ação citotóxica.....	15
Figura 8. <i>Griffinia intermedia</i> e <i>Griffinia gardneriana</i> , na sequência, exemplos de espécies dos subgêneros <i>Griffinia</i> e <i>Hyline</i> , respectivamente.....	16
Figura 9. <i>Griffinia gardneriana</i> , bulbo e flor.....	17
Figura 10. <i>Habranthus itaobinus</i> , bulbo e flor.....	18
Figura 11. Vias de indução de apoptose: intrínseca e extrínseca.....	22
Figura 12. Flores de <i>Griffinia gardneriana</i> e <i>Habranthus itaobinus</i> , na sequência.....	30
Figura 13. Fracionamento cromatográfico da fração GGHex.....	34
Figura 14. Fracionamento cromatográfico da subfração GGHex-4.....	34
Figura 15. Fracionamento cromatográfico da subfração GGHex-4A.....	35
Figura 16. Fracionamento cromatográfico da subfração GGHex-4A3.....	36
Figura 17. Fracionamento cromatográfico da fração GGAc.....	36
Figura 18. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2.....	37
Figura 19. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2B.....	37
Figura 20. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2C.....	38
Figura 21. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2D.....	38
Figura 22. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2D1.....	39
Figura 23. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3.....	39
Figura 24. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3B.....	40

Figura 25.	Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3C.....	41
Figura 26.	Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3C2.....	41
Figura 27.	Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-4.....	42
Figura 28.	Fracionamento cromatográfico da fração GGFAA.....	43
Figura 29.	Fracionamento cromatográfico da subfração GGFAA-3.....	43
Figura 30.	Fracionamento cromatográfico da subfração GGFAA-3C.....	44
Figura 31.	Fracionamento cromatográfico da subfração GGFAA-3E.....	44
Figura 32.	Fracionamento cromatográfico da fração HIHex.....	45
Figura 33.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-1.....	46
Figura 34.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-2.....	46
Figura 35.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-4.....	47
Figura 36.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-5.....	48
Figura 37.	Fracionamento cromatográfico da fração HIAC.....	48
Figura 38.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-1.....	49
Figura 39.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-2.....	49
Figura 40.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-4.....	50
Figura 41.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-4D.....	51
Figura 42.	Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-6.....	51
Figura 43.	Reação de redução do ensaio do MTT.....	53
Figura 44.	Alguns dos possíveis destinos de culturas celulares com citocinese bloqueada após exposição a agentes citotóxicos/genotóxicos: NPB, MN e NBUD.....	55
Figura 45.	Cromatograma da fração <i>n</i> -hexano de <i>G. gardneriana</i>	59
Figura 46.	Cromatograma da fração acetato de etila de <i>G. gardneriana</i>	59
Figura 47.	Cromatograma da fração <i>n</i> -hexano de <i>H. itaobinus</i>	60
Figura 48.	Cromatograma da fração acetato de etila de <i>H. itaobinus</i>	60
Figura 49.	Espectro de massas do alcaloide licorina.....	61
Figura 50.	Padrão de fragmentação de alcaloides com esqueleto do tipo licorina.....	62
Figura 51.	Espectro de massas do alcaloide tazetina.....	62
Figura 52.	Padrão de fragmentação de alcaloides com esqueleto do tipo tazetina.....	63
Figura 53.	Espectro de massas do alcaloide ismina.....	63

Figura 54.	Espectro de massas do alcaloide trisfaeridina.....	64
Figura 55.	Espectro de massas do alcaloide galantindol.....	64
Figura 56.	Alcaloides de Amaryllidaceae isolados das espécies <i>G. gardneriana</i> e <i>H. itaobinus</i>	65
Figura 57.	Processo de junção dos anéis B e C dos alcaloides de Amaryllidaceae: (a) fusão <i>cis</i> dos anéis B e C (b) fusão <i>trans</i> dos anéis B e C.....	75
Figura 58.	Resultado do teste de Dicroísmo Circular do composto 11-hidroxivitatina	76
Figura 59.	Ligante cristalográfico tetrapeptídeo utilizado nos estudos de modelagem molecular com a caspase-3.....	85
Figura 60.	Resultados de <i>docking</i> entre os ligantes e 1PAU. (A) aglomerado formado pelos alcaloides tazetina (verde), 11-hidroxivitatina (vermelho) e pretazetina (azul); (B) representação 3D do complexo pretazetina-1PAU; (C) interações intermoleculares entre pretazetina e 1PAU com resíduos de aminoácidos em 3D; (D) diagrama de interações intermoleculares 2D entre a pretazetina e 1PAU. Os átomos de hidrogênio foram omitidos nessas representações para uma melhor visualização.....	87
Figura 61.	Resultados de <i>docking</i> entre os ligantes e 1PAU. (A) estrutura da licorina otimizada; (B) representação 3D do complexo licorina-1PAU; (C) interações intermoleculares entre licorina e 1PAU com resíduos de aminoácidos em 3D; (D) diagrama de interações intermoleculares 2D entre a licorina e 1PAU. Os átomos de hidrogênio foram omitidos nessas representações para uma melhor visualização.....	88
Figura 62.	Mapa de superfícies de avaliação do caráter hidrofóbico (A) e de interações de hidrogênio (B) do complexo pretazetina-1PAU.....	89
Figura 63.	Mapa de superfícies de avaliação do caráter hidrofóbico (A) e de interações de hidrogênio (B) do complexo licorina-1PAU.....	89

Figura 64. Resultados do ensaio da caspase-3 com os alcaloides licorina e pretazetina.....	91
---	----

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Dados de CG-EM das frações Hex, AcOEt e AcOEt/MeOH (3:1) de <i>G. gardneriana</i> e <i>H. itaobinus</i>	58
Tabela 2. Alcaloides isolados de <i>Griffinia gardneriana</i> e <i>Habranthus itaobinus</i>	65
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto licorina (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	67
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (400 MHz, CDCl_3).....	68
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY e gHSQC do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz).....	70
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz).....	71
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H do composto sanguinina (CDCl_3 , 400 MHz) em comparação com a literatura.....	73
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H do composto 11-hidroxivitatina (CDCl_3 , 400 MHz) em comparação com a literatura.....	74
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz).....	77
Tabela 10. Avaliação da citotoxicidade, através do método do MTT, das frações enriquecidas de <i>Griffinia gardneriana</i> e <i>Habranthus itaobinus</i> frente a 3 linhagens celulares diferentes. Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes.....	78
Tabela 11. Ensaio do MTT (48h) – Testes preliminares para determinação de curva de ação e células susceptíveis aos alcaloides isolados. Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três experimentos independentes.....	79

Tabela 12.	Ensaio do MTT (72h) – Teste com os alcaloides licorina e pretazetina ativos para morte celular, selecionados no ensaio preliminar do MTT (48h). Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três experimentos independentes, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2).....	79
Tabela 13.	Determinação de genotoxicidade em células de ovário de hamster (CHO-1-15) expostas aos alcaloides licorina e pretazetina. Os resultados são expressos como a média (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) de três experimentos independentes.....	84
Tabela 14.	Resultados da modelagem molecular utilizando o <i>software</i> AutoDock Vina para a interação proteína-ligante realizada no sítio ativo da caspase-3.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt – acetato de etila

BAK – antagonista-assassino de BCL-2

BAX – proteína X associada a BCL-2

BCL-2 – célula B de linfoma 2

BH3 – homólogo 3 de BCL-2

BID – agonista de morte que interage com o domínio BH3

BIM – mediador de morte celular que interage com BCL-2

CC – cromatografia em coluna aberta

CCD – cromatografia em camada delgada

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CD₃OD – metanol deuterado

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH₂Cl₂ – diclorometano

CHCl₃ – clorofórmio

Cl₅₀ – concentração inibitória média

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLV – cromatografia líquida a vácuo

gCOSY – espectroscopia de correlação homonuclear com gradiente de campo

Cyt B – citocalasina B

d – dubleto

DC – dicroísmo circular

dd – duplo dubleto

ddd – duplo duplo dubleto

dddd – duplo duplo duplo dubleto

ddt – duplo duplo tripleto

DMEM – meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMEM/F12 – meio de Eagle Modificado por Dulbecco e mistura de nutriente F-12 de HAM

DMSO – dimetilsulfóxido

dt – duplo tripleto

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
FADD – domínio de morte associado ao Fas
FDA – Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos
FM – fase móvel
 H_2SO_4 – ácido sulfúrico
HCl – ácido clorídrico
Hex – *n*-hexano
HRP – peroxidase de rábano
gHMBC – espectroscopia de correlação heteronuclear a múltiplas ligações com gradiente de campo
gHSQC – espectroscopia de correlação heteronuclear de quantum simples com gradiente de campo
Hz – hertz
J – constante de acoplamento
JNK – proteína quinase jun N-terminal
l – largo
m – multiplete
Me – metil
 Me_2CO – acetona
MeOH – metanol
MHz – megahertz
MN – micronúcleo
MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
NBUDs – brotamentos nucleares
NCI – Instituto Nacional do Câncer
NCQP – Núcleo de Competências em Química do Petróleo
ND – não determinado
 NH_4OH – hidróxido de amônio
gNOESY – espectroscopia do efeito nuclear de Overhauser com gradiente de campo
NPBs – pontes nucleoplasmáticas
OAc – acetoxila
OH – hidroxila
OMe – metoxila

OMS – Organização Mundial da Saúde
OVL – sobreposto
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
pH – potencial hidrogeniônico
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
ppm – parte por milhão
q – quadrupeto
RMN 1D – ressonância magnética nuclear unidimensional
RMN 2D – ressonância magnética nuclear bidimensional
RMN de ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s – singleto
SUS – Sistema Único de Saúde
t – tripleto
td – triplo dubleto
TFA – ácido trifluoroacético
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
UV – ultravioleta
 δ – deslocamento químico

RESUMO

A família Amaryllidaceae é amplamente distribuída pelo globo terrestre, sendo considerada uma das 20 famílias mais importantes entre as que apresentam alcaloides em sua composição, exibindo atividades antiviral, antimalárica, anticâncer e anticolinesterásica, dentre outras. Este trabalho objetiva realizar o estudo químico de alcaloides dos bulbos das espécies *Griffinia gardneriana* e *Habranthus itaobinus*, pertencentes à família Amaryllidaceae, avaliar suas propriedades citotóxicas e genotóxicas e o papel da caspase-3 como mediador molecular da apoptose induzida por estes compostos. As frações enriquecidas em alcaloides obtidas dos bulbos de *G. gardneriana* e *H. itaobinus* foram inicialmente submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e em seguida fracionadas através de diferentes técnicas cromatográficas, como cromatografia por exclusão molecular, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa, sendo o isolamento e identificação dos alcaloides feito por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear mono e bidimensional, além de dicróismo circular. Foram então desenvolvidos estudos para avaliar a citotoxicidade das frações enriquecidas, pelo método do MTT, utilizando as linhagens celulares OVCAR-3, J774 e L929, sendo determinada também a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* dos alcaloides isolados (através do ensaio do MTT e do teste do micronúcleo) e a ativação da apoptose pela via da caspase, utilizando linhagens celulares tumorais (HepG2, MCF-7, A549) e normais (L929, CHO-1-15). Estudos de *docking* molecular foram realizados para avaliar as energias livres de ligação entre os alcaloides isolados com a proteína caspase-3, descrita na literatura como o provável sítio de ação destes compostos, sendo também calculada a constante de inibição téorica, K_i . O resultado da CG-EM das frações enriquecidas evidenciou a presença de apenas um alcaloide em *G. gardneriana* e cinco em *H. itaobinus*. Foram isolados sete alcaloides, pertencentes a diferentes esqueletos-tipo, todos já devidamente caracterizados na literatura, sendo alguns comuns às duas espécies (trisfaeridina e pretazetina), enquanto outros presentes apenas em *G. gardneriana* (licorina e sanguinina) ou em *H. itaobinus* (tazetina, 11-hidroxivitatina e 2- α -7-dimetoxihomolicorina). Todas as frações enriquecidas apresentaram ação citotóxica nos métodos testados, e no tocante aos alcaloides isolados, 11-hidroxivitatina e 2- α -7-dimetoxihomocolorina não se mostraram citotóxicos, enquanto tazetina, trisfaeridina e sanguinina apresentaram atividade apenas contra a linhagem fibroblástica. Licorina e pretazetina foram 10 a 30 vezes mais citotóxicas que os demais alcaloides, mostrando-se ativas também para as linhagens cancerosas, exibindo ação tempo- e concentração-dependente, além de serem genotóxicas e capazes de promover apoptose pela via da caspase-3. Tal resultado corrobora os dados obtidos nos estudos de *docking* em que esses dois compostos se apresentaram entre aqueles com os maiores valores de afinidade de ligação.

Palavras-chave: Amaryllidaceae. Alcaloides. *Docking*. *Griffinia gardneriana*. *Habranthus itaobinus*. Câncer.

ABSTRACT

The Amaryllidaceae family is widely distributed throughout the world, being considered one of the 20 most important families among which they present alkaloids in their composition, exhibiting antiviral, antimalarial, anticancer and anticholinesterase activities, among others. This work aims to perform a chemical study on alkaloids of *Griffinia gardneriana* and *Habranthus itaobinus* bulbs, belonging to this family, to evaluate its cytotoxic and genotoxic properties and the role of caspase-3 as a molecular mediator of apoptosis induced by these compounds. Fractions enriched in alkaloids obtained from *G. gardneriana* and *H. itaobinus* bulbs were initially subjected to gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and then fractionated by different chromatographic techniques, such as molecular exclusion chromatography, column chromatography and preparative thin layer chromatography. The isolation and identification of the alkaloids was done by means of high performance liquid chromatography and mono- and bidimensional nuclear magnetic resonance, in addition to circular dichroism. Studies were carried out to evaluate the cytotoxicity of the enriched fractions by the MTT method using the OVCAR-3, J774 and L929 cell lines. In addition, the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of the alkaloids isolated (through the MTT assay and micronucleus test) using tumoral (HepG2, MCF-7, A549) and normal (L929, CHO-1-15) cell lines. In parallel, a study was developed to evaluate the correlation of the results obtained in the cytotoxicity assays by MTT and cytometry by image analysis. Molecular docking studies were performed to evaluate the free binding energies between the alkaloids isolated with the caspase-3 protein, described in the literature as the probable site of action of these compounds, also being calculated the theoretical inhibition constant, K_i . The GC-MS result of the enriched fractions evidenced the presence of only one alkaloid in *G. gardneriana* and five in *H. itaobinus*. Seven alkaloids of Amaryllidaceae, belonging to different type skeletons, all of them already well characterized in the literature, are some common ones to the two species (trisphaeridine and pretazettine), whereas others present only in *G. gardneriana* (lycorine and sanguinine) or in *H. itaobinus* (tazettine, 11-hydroxyvitattine and 2- α -7-dimethoxyhomolycorine). All enriched fractions showed cytotoxic action in the tested methods, but for the alkaloids isolated 11-hydroxyvitattine and 2- α -7-dimethoxyhomocolycorine were not cytotoxic, whereas tazettine, trisphaeridine and sanguinine presented activity only against the fibroblastic lineage. Lycorine and pretazettine were 10 to 30 times more cytotoxic than the other alkaloids, being active also for the cancerous lines, exhibiting time-dependent and concentration action, besides being genotoxic and able to promote the apoptosis via caspase-3. This result corroborates the data obtained in the docking studies in which these two compounds were among those with the highest binding affinity values.

Keyword: Amaryllidaceae. Alkaloids. Docking. *Griffinia gardneriana*. *Habranthus itaobinus*. Cancer.

SUMÁRIO

	pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A HISTÓRIA DOS PRODUTOS NATURAIS.....	3
2.2. PRODUTOS NATURAIS EM ÂMBITO MUNDIAL E NACIONAL.....	5
2.3. FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE.....	8
2.3.1. Aspectos botânicos.....	8
2.3.2. Aspectos químicos.....	9
2.3.3. Origem biossintética.....	10
2.3.4. Uso medicinal.....	13
2.3.5. Gênero <i>Griffinia</i>	15
2.3.5.1. <i>Griffinia gardneriana</i>	16
2.3.6. Gênero <i>Habranthus</i>	17
2.3.6.1. <i>Habranthus itaobinus</i>	17
2.3.7. Toxicidade.....	18
2.4. CÂNCER.....	19
2.4.1. Vias de indução de apoptose: alvos potenciais de ação de novos agentes citotóxicos.....	21
2.4.1.1. Avaliação de danos no DNA – Teste do Micronúcleo.....	23
2.5. DOCKING MOLECULAR.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. GERAL.....	26
3.2. ESPECÍFICOS.....	26
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1.1. Materiais.....	27
4.1.1.1. Solventes em geral e reagentes específicos.....	27
4.1.1.2. Linhagens celulares e condições das culturas.....	27
4.1.2. Métodos.....	28
4.1.2.1. Cromatografia em Camada Delgada.....	28
4.1.2.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa.....	28

4.1.2.3.	Cromatografia em Coluna e Cromatografia Líquida à Vácuo.....	29
4.1.2.4.	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	29
4.1.2.5.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	29
4.1.2.6.	Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	29
4.1.2.7.	Ressonância Magnética Nuclear.....	29
4.2.	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	30
4.3.	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE ALCALOIDES.....	30
4.4.	ANÁLISE DE CG-EM E IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES.....	33
4.5.	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DE ALCALOIDES.....	33
4.5.1.	<i>Griffinia gardneriana</i>	34
4.5.2.	<i>Habranthus itaobinus</i>	45
4.6.	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	52
4.6.1.	Citotoxicidade celular	52
4.6.1.1.	Ensaio do MTT.....	52
4.6.2.	Avaliação das mutações cromossômicas pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese	54
4.6.3.	Ensaio de <i>docking</i> molecular	55
4.6.4.	Avaliação do nível de apoptose	56
4.6.5.	Processamento de dados e estatísticas	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1.	ANÁLISE DE CG-EM.....	58
5.1.1.	Licorina	61
5.1.2.	Tazetina	62
5.1.3.	Ismina	63
5.1.4.	Trisfaeridina	63
5.1.5.	Galantindol	64
5.2.	ALCALOIDES ISOLADOS.....	64
5.2.1.	Esqueleto licorina	66
5.2.2.	Esqueleto homolicorina	67
5.2.3.	Esqueleto tazetina	69
5.2.4.	Esqueleto galantamina	72

5.2.5.	Esqueleto haemantamina.....	73
5.2.6.	Outro tipo de esqueleto (<i>miscellaneous</i>).....	76
5.3.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR.....	77
5.3.1.	Método colorimétrico do MTT – Frações enriquecidas em alcaloides.....	77
5.3.2.	Método colorimétrico do MTT – Alcaloides isolados.....	78
5.3.3.	Avaliação das mutações cromossômicas pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese.....	83
5.3.4.	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	85
5.3.5.	Avaliação do nível de apoptose.....	90
6.	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	xxvi
	ANEXOS.....	xlvi
Anexo I.	Autorização para atividades com finalidade científica.....	xlvi
Anexo II.	Gradiente de polaridade utilizado na CLV aplicada à fração GGHex.....	xlvi
Anexo III.	Espectros de RMN 1D e 2D dos alcaloides isolados.....	xlvi
III.1.	Espectro de RMN de ¹ H do composto licorina (DMSO-d ₆ , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.....	xlvi
III.2.	Espectro de RMN de ¹³ C do composto licorina (DMSO-d ₆ , 400 MHz, 26°C).....	li
III.3.	Espectro de gCOSY do composto licorina (DMSO-d ₆ , 400 MHz, 26°C).....	lii
III.4.	Mapa de Contornos gHSQC do composto licorina (DMSO-d ₆ , 400 MHz, 26°C).....	lii
III.5.	Mapa de Contornos gHMBC do composto licorina (DMSO-d ₆ , 400 MHz, 26°C).....	liiv
III.6.	Espectro de gNOESY do composto licorina (DMSO-d ₆ , 400 MHz, 26°C).....	lv
III.7.	Espectro de RMN de ¹ H do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (CDCl ₃ , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.....	lvi

III.8.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lviii
III.9.	Espectro de gCOSY do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lix
III.10.	Mapa de Contornos gHSQC do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lx
III.11.	Mapa de Contornos gHMBC do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxi
III.12.	Espectro de gNOESY do composto 2-α-7-dimetoxihomolicorina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxii
III.13.	Espectro de RMN de ^1H do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.....	lxiii
III.14.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxv
III.15.	Espectro de gCOSY do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxvi
III.16.	Mapa de Contornos gHSQC do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxvii
III.17.	Espectro de gNOESY do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxix
III.18.	Espectro de RMN de ^1H do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.....	lxx
III.19.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxi
III.20.	Espectro gCOSY do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxii
III.21.	Mapa de Contornos gHSQC do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxiii
III.22.	Mapa de Contornos gHMBC do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxiv
III.23.	Espectro de gNOESY do composto tazetina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxv

III.24.	Espectro de RMN de ^1H do composto sanguinina (CDCl_3 , 400 MHz, 25°C) e suas expansões.....	lxxvi
III.25.	Espectro de RMN de ^1H do composto 11-hidroxivitatina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.....	lxxviii
III.26.	Espectro de RMN de ^1H do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.....	lxxx
III.27.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxxii
III.28.	Espectro de gCOSY do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxxiii
III.29.	Mapa de Contornos gHSQC do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxxiv
III.30.	Mapa de Contornos gHMBC do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxxv
III.31.	Espectro de gNOESY do composto trisfaeridina (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).....	lxxxvi

1. INTRODUÇÃO

As plantas da família Amaryllidaceae têm sido utilizadas por milhares de anos como remédios herbais na medicina tradicional, sendo plantas bulbosas, monocotiledôneas, de ampla distribuição mundial, com aproximadamente 80 gêneros e 1600 espécies (LOUW; REGNIER; KORSTEN, 2002; BASTIDA et al., 2011; DUTILH et al., 2013; DE ANDRADE et al., 2012; SOUZA; LORENZI, 2012).

Os extratos das plantas desta família têm uma longa história de uso terapêutico, tendo sido usados pelos gregos antigos para o tratamento do câncer, bem como por comunidades africanas, asiáticas e polinésias para o tratamento de diversas doenças (GHAVRE et al., 2016).

O interesse de estudo destas espécies está ligado à presença de alcaloides isoquinolínicos de ocorrência exclusiva nesta família vegetal, muitos deles bioativos, de promissor potencial terapêutico (KILGORE; KUTCHAN, 2016), com mais de 500 compostos isolados (JIN, 2013) e ampla gama de atividades biológicas, tais como antiviral, antimalárica, citotóxica e anticolinesterásica (HULCOVÁ et al., 2017), comprovadas por meio de diversos estudos tanto em nível nacional quanto internacional, destacando-se a potencialidade de aplicação na terapia do câncer, através da ação pró-apoptótica das caspases, e na doença de Alzheimer, oriundo do sucesso da galantamina (Reminyl®).

Neste campo da citotoxicidade, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para ativação das caspases e subsequente estimulação da apoptose em células cancerígenas (PHILCHENKOV et al., 2004), e, neste sentido as técnicas de ancoragem molecular (*docking* molecular) têm se revelado uma importante ferramenta para filtrar compostos ineficazes frente às caspases, e desenhar possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo da enzima.

No Brasil, a família Amaryllidaceae está representada por cerca de 15 gêneros e 150 espécies, algumas das quais endêmicas, com destaque para os gêneros *Cearanthes*, *Eithea*, *Griffinia*, *Tocantinia* e *Worsleya* (MEEROW; SNIJMAN, 1998; DUTILH, 2003).

O gênero *Griffinia* é exclusivamente brasileiro, representado por cerca de 15 espécies de Mata Atlântica, cerrado e caatinga (DUTILH, 2005), enquanto o gênero *Habranthus* Herb. reúne cerca de 40 espécies, ocorrendo no sul da América do Sul, México e sudoeste dos Estados Unidos (MEEROW; SNIJMAN, 1998). No Brasil,

ocorrem cerca de 20 espécies, em campos ou cerrados, sendo muitas consideradas regionais ou localmente endêmicas (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010).

Desta forma, o presente trabalho visa identificar os alcaloides presentes nos bulbos das espécies de Amaryllidaceae *Griffinia gardneriana* e *Habranthus itaobinus*, avaliar o seu potencial citotóxico e genotóxico, e o envolvimento da caspase-3 nestas ações. Propõe-se também, por meio da técnica de *docking* molecular, predizer os alcaloides com maior potencialidade de interação com a proteína e cruzar estas informações com os dados dos ensaios biológicos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A HISTÓRIA DOS PRODUTOS NATURAIS

O uso terapêutico de plantas é muito antigo, e guarda relação direta com a própria evolução do homem, que para tanto utilizava de suas próprias experiências e da observação do uso das plantas pelos animais (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006). O homem primitivo dependia fundamentalmente da natureza para a sua sobrevivência, utilizando-se principalmente de plantas medicinais para curar-se (ALMEIDA, 2011).

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, com vários exemplos na história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental para diferentes finalidades como uso na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, com destaque para as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa; esta última alvo de estudos até os dias atuais na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento de princípios ativos (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O uso de recursos da flora no tratamento de diferentes patologias data de milhares de anos, com relatos de 2800 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do herborista chinês Shen Nung, considerado o mais antigo dos registros, com a descrição do uso de centenas de plantas medicinais na cura de várias moléstias (ALMEIDA, 2011).

No final do século XIX, o egiptólogo alemão Georg Ebers, ocasionalmente teve acesso a um longo papiro datado de aproximadamente 1500 a.C., que após tradução passou para a história como o *Papiro de Ebers*, um dos mais importantes documentos da cultura médica, contendo um compilado de receitas medicinais antigas, além de cerca de 700 drogas e minerais (DUARTE, 2006).

Na Grécia, Pedacius Dioscórides (78 d.C.) escreveu a obra *De Matéria Médica*, considerada, por mais de 1500 anos, durante o período greco-romano e na Idade Média, a bíblia de médicos e farmacêuticos, contando com a descrição da origem, características e usos em terapêutica de mais de 500 drogas vegetais, aproximadamente 100 drogas de origem animal e outras de origem mineral, sendo considerada a obra precursora da farmacognosia moderna (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Com a queda do Império Romano, a Europa atravessou um longo período de obscurantismo científico entre os séculos V e XV – a Idade Média. Paralelamente à esse período, o mundo árabe emergiu com grande atividade científica, acrescido de alguns conhecimentos de origem indiana (ALMEIDA, 2011), com destaque para Avicena com suas famosas flores para problemas cardíacos e sua obra *Cânon da Medicina*, que serviu de base para o ensino de medicina até o século XVII e que fez de Avicena, ao lado de Hipócrates e Galeno, um dos pilares da teoria e prática médica do Ocidente (PEREIRA, 2002). Nesta mesma época, muitas drogas foram introduzidas na terapêutica europeia, com destaque para canela, limão, noz-moscada, sene, tamarindo e cânfora (EVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

O final do século XVIII marca o início de um importante período para os fitofármacos, a partir do isolamento e estudo de metabólitos. As primeiras substâncias químicas foram isoladas de extratos vegetais quando os ácidos orgânicos (oxálico, málico e tartárico) foram separados e identificados. A partir daí, no início do século XIX, foram isoladas várias substâncias bioativas: narcotina e morfina, do ópio; estricnina, de *Strychnus nux vomica*; quinina, de *Cinchona*; cafeína, de *Coffea*. Os primeiros heterosídeos, salicina e digitalina, são deste século (ALMEIDA, 2011). Algumas destas estruturas são apresentadas na Figura 1:

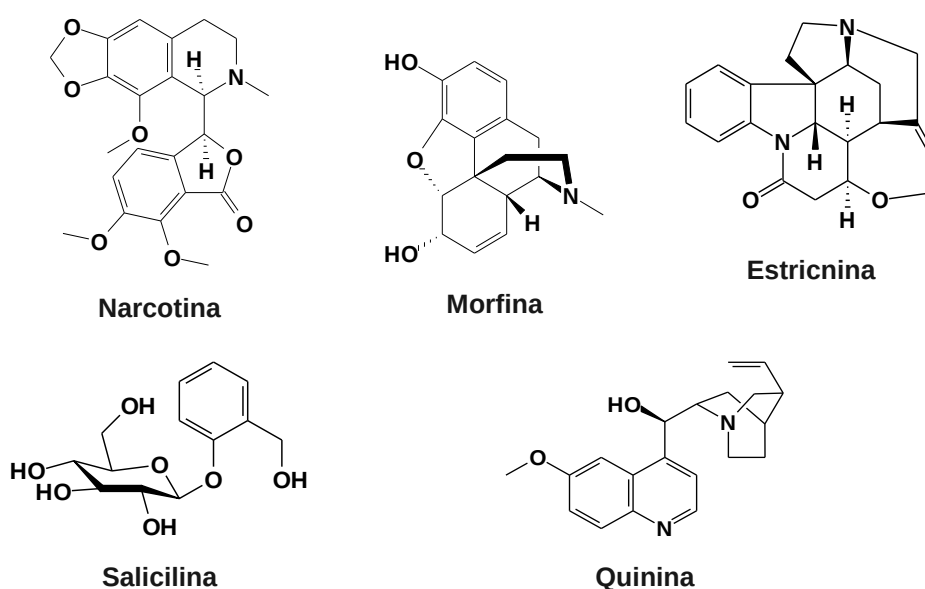


Figura 1. Substâncias bioativas isoladas no início do século XIX.

No Brasil, o uso de espécies vegetais bioativas é anterior ao Período Colonial, integrando as práticas tradicionais das diversas nações indígenas. Os relatos acerca

da flora brasileira iniciaram-se logo após a descoberta do país. Na carta de Pero Vaz de Caminha são citadas espécies vegetais e seus usos, dentre as quais o urucum (*Bixa orellana* L.). Pedro Álvares Cabral, observou entre os povos indígenas o uso de produtos de origem vegetal para alimentação, tratamento de doenças e finalidades cosméticas (FILGUEIRA; PEIXOTO, 2002; WALKER, 2013).

A primeira descrição do uso de plantas como medicamento foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587, onde denominava os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Com a vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez na colônia de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento. É importante mencionar também o corante extraído da árvore pau-brasil, o principal produto de exportação da colônia durante mais de dois séculos, e um dos motivos para a colonização do Brasil pelos portugueses (PINTO et al., 2002).

Desta forma, a utilização de ervas medicinais no Brasil tem na prática indígena suas bases, que influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasta cultura popular (ALVES; SILVA, 2003).

2.2. PRODUTOS NATURAIS EM ÂMBITO MUNDIAL E NACIONAL

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática bastante antiga e em grande parte oriundo do conhecimento popular, e, mesmo com a evolução do conhecimento científico, esta prática ainda é bastante recorrente, principalmente devido ao alto valor dos medicamentos sintéticos (VASCONCELOS; LIMA; ALCOFORADO, 2010).

Os vegetais representam as maiores fontes de substâncias essenciais para a vida, em função da grande diversidade estrutural dos metabólitos secundários produzidos (BRANDÃO et al., 2010).

Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012).

Segundo Newman; Cragg; Snader (2003) medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, exibindo as mais variadas ações farmacológicas, tais como antibacteriana, anticoagulante,

antiparasitária, imunossupressora e anticancerígena. Ainda de acordo com os autores, entre os anos de 1981 e 2014, o campo dos produtos naturais produziu ou esteve envolvido em aproximadamente 50,6% de todas os novos fármacos aprovados pelo FDA e organizações semelhantes (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Na área de câncer, da década de 40 ao final de 2014, das 175 moléculas aprovadas, 131, ou 75%, são produtos oriundos direta ou indiretamente do estudo de compostos de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2016). Gurib-Fakim (2006) já havia relatado esta significativa participação dos produtos naturais e seus derivados como fonte de quimioterápicos, representando mais de 50% de todos os medicamentos quimioterápicos em uso clínico no mundo, com contribuição dos vegetais superiores em pelo menos 25% deste total.

Em outras áreas, a influência dos produtos naturais é também bastante acentuada, como relatado na área de agentes anti-infecciosos. Em se tratando de ambos os alvos biológicos, uma análise rápida das moléculas aprovadas entre 2011 e 2014 indica que houve um número significativo de agentes antitumorais, antibacterianos e antifúngicos aprovados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 44 bilhões anuais. Não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil, mas as estimativas variam entre 350 e 550 milhões de dólares anuais (BRASIL, 2012), constituindo um mercado promissor e em franca expansão (RODRIGUES, 2016).

A biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira já em 1886 eram descritos em inventários, onde era relatada a sua riqueza em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal (JACOBSON et al., 2005).

As florestas tropicais, localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, representam grande fonte de biodiversidade, concentrando cerca de um terço da flora mundial (KLEIN et al., 2009). Estima-se que 20% do patrimônio genético mundial esteja concentrado em território brasileiro (PINTO et al., 2002; SILVEIRA, 2013), com número de espécies vegetais superior a 55 mil descritas, o que corresponde a 22% do total registrado no mundo (SILVEIRA, 2013).

Essa rica biodiversidade contrasta com a carência de estudos do potencial dos produtos naturais: das 250 mil espécies de vegetais superiores existentes no mundo, somente cerca de 15% foram investigadas quimicamente, e apenas 6%,

biologicamente (GURIB-FAKIM, 2006), com muitas espécies sendo utilizadas para fins medicinais com pouca ou nenhuma propriedade farmacológica confirmada (SANTOS; TORRES, 2012).

Assim, uma das principais preocupações com relação ao uso de plantas medicinais com finalidade curativa é o seu uso indiscriminado e sem comprovação científica. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pela cultura tradicional (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A OMS tem estimulado e valorizado o uso de fitoterápicos desde a declaração de Alma-Ata, em 1978, em que foi constatado que 80% da população mundial utilizava plantas ou preparações delas derivadas no cuidado à saúde. No Brasil, parcela significativa da população encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação (MARINHO et al., 2007).

Para a sua utilização segura, em 2006 o Brasil implementou a PNPIC no SUS, inserindo estas práticas por meio da fitoterapia, da homeopatia e da medicina antroposófica, no processo de atenção a saúde, com embasamento científico (BRASIL, 2006).

Entre 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo SUS mais que dobrou: o crescimento foi de 161%, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018).

O uso de terapias complementares está crescendo pela sua facilidade de acesso e por serem menos agressivas ao corpo quando comparadas à medicina alopática (VARGAS et al., 2014).

2.3. FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE

2.3.1. Aspectos botânicos

Identificada primeiramente por Jaume St. Hilaire em 1805, a família Amaryllidaceae é constituída por cerca de 80 gêneros e 1.600 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012). Trata-se de uma família de monocotiledôneas de ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde as áreas temperadas até as tropicais, com três centros de diversidade principais: América do Sul, Sul da África e região do Mediterrâneo (MEEROW; SNIJMAN, 1998; MEEROW, 2004).

A família é composta por plantas terrestres, eventualmente aquáticas ou epifíticas, com bulbos subterrâneos e perenes; suas folhas são simples, sésseis ou subpecioladas, dísticas, sendo concentradas basalmente, podendo ser lanceoladas a elípticas. Possui escapos florais terminais (cheios ou fistulosos), inflorescências frequentemente umbeliformes, subentendidas por duas brácteas livres ou condescidas somente de um lado, ou formando um tubo, podendo haver bractéolas pequenas e filiformes (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010).

As flores, epíginas (HERBERT, 1837), vistosas e bissexuadas, podem ser actinomorfas ou zigomorfas, pediceladas, raramente sésseis, sendo eretas ou declinadas, monóclinas e geralmente protândricas, possuindo seis tépalas petaloides, em dois verticilos, unidas na base e adnatas aos estames, formando hipanto. Apresenta ovário sincárpico, súpero ou ínfero, tricarpetal e trilocular, com estigma capitado a trifido (AMARAL, 2007).

Os frutos podem ser deiscentes ou indeiscentes, sendo o seu formato bastante variável, enquanto que as sementes são largas e sem dormência. Apresentam-se em cápsulas loculicidas ou bagas, com muita ou pouca semente em cada fruto, papiráceas e, geralmente, de escuras a negras (SNIJMAN; LINDER, 1996).

Em muitos países são utilizadas para fins ornamentais, em função de sua beleza, relacionada principalmente aos gêneros *Narcissus* L., *Leucojum* L. e *Galanthus* L., além de espécies do gênero *Hippeastrum* (MEEROW; SNIJMAN, 1998), conforme ilustrado na Figura 2:



Figura 2. Exemplos da exuberância da família Amaryllidaceae: *Narcissus pseudonarcissus*, *Leucojum aestivum* e *Galanthus elwesii* “Polar Bear”, na sequência.

Fontes: Pacific Essences® (2018); The Gardening Blog (2018); Odyssey Bulbs (2018).

No Brasil, a família está representada por alguns táxons exclusivamente brasileiros, como *Cearanthes* Ravenna, *Eithea* Ravenna, *Griffinia* Ker Gawl., *Tocantinia* Ravenna e *Worsleya* (W. Watson ex Traub) Traub (DUTILH; OLIVEIRA, 2012).

2.3.2. Aspectos químicos

Alcaloides são compostos estruturalmente caracterizados pela presença de nitrogênio, divididos em diferentes classes, oriundos do metabolismo dos aminoácidos (SIMÕES et al., 2017; GURIB-FAKIM, 2006) e produzidos por uma variedade de organismos, como bactérias, fungos, animais marinhos e plantas, dotados de importantes atividades farmacológicas (BHADRA; KUMAR, 2011).

As dicotiledôneas são as que apresentam maior número de famílias com espécies alcaloídicas, embora alcaloides possam aparecer em algumas monocotiledôneas e menos frequentemente nas gimnospermas, distribuindo-se por toda a planta, mas com tendência a acúmulo em certas regiões, em particular nos tecidos externos, no tegumento das sementes e nas cascas dos caules e raízes (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2001).

Dentre as famílias que se destacam pela presença de alcaloides pode-se citar a Amaryllidaceae (SIMÕES et al., 2017), considerada uma das 20 famílias mais importantes entre as que apresentam alcaloides em sua composição (UNVER, 2007)

Os alcaloides de Amaryllidaceae, constituem um grupo amplo de alcaloides isoquinolínicos que já foram isolados em todos os gêneros da família Amaryllidaceae, sendo a grande maioria não encontrada em outras famílias de plantas, o que os torna exclusivos (DE ANDRADE et al., 2012). Este grupo conta com cerca de 500 estruturas conhecidas, e continua a ser alvo de estudos (JIN, 2013; BASTIDA et al., 2011).

O primeiro alcaloide isolado da família Amaryllidaceae foi a licorina, ainda em 1877 de *Lycoris radiata* (Figura 3) (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006). Porém, a família ficou muito tempo sem ser estudada e, somente por volta de 1950, é que os estudos de composição química foram retomados, estimulados principalmente pelo potencial biológico das espécies (DE ANDRADE et al., 2012).



Figura 3. *Lycoris radiata* e o alcaloide licorina.
Fonte: Brent and Beckys Bulbs (2018).

2.3.3. Origem biossintética

Biossinteticamente, os alcaloides de Amaryllidaceae têm como precursor os aminoácidos L-fenilalanina (L-Phe) e L-tirosina (L-Tyr). Porém, isto não ocorre de forma direta, uma vez que há a formação de um intermediário precursor. A L-Phe serve como um precursor primário do fragmento C6-C1, correspondente ao anel A e a posição benzílica (C-6), e L-Tyr é o precursor do anel C, da cadeia lateral de dois carbonos (C-11 e C-12) e de nitrogênio, C6-C2-N (Figura 4) (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

Estas informações relativas aos precursores dos anéis A e C foram devidamente comprovadas por meio de estudos com compostos radiomarcados (3-C¹⁴-tirosina e 3-C¹⁴-fenilalanina) (WILDMAN; FALES; BATTERSBY, 1962; JEFFS, 1962; SUHADOLNIK; FISCHER; ZULALIAN, 1962).

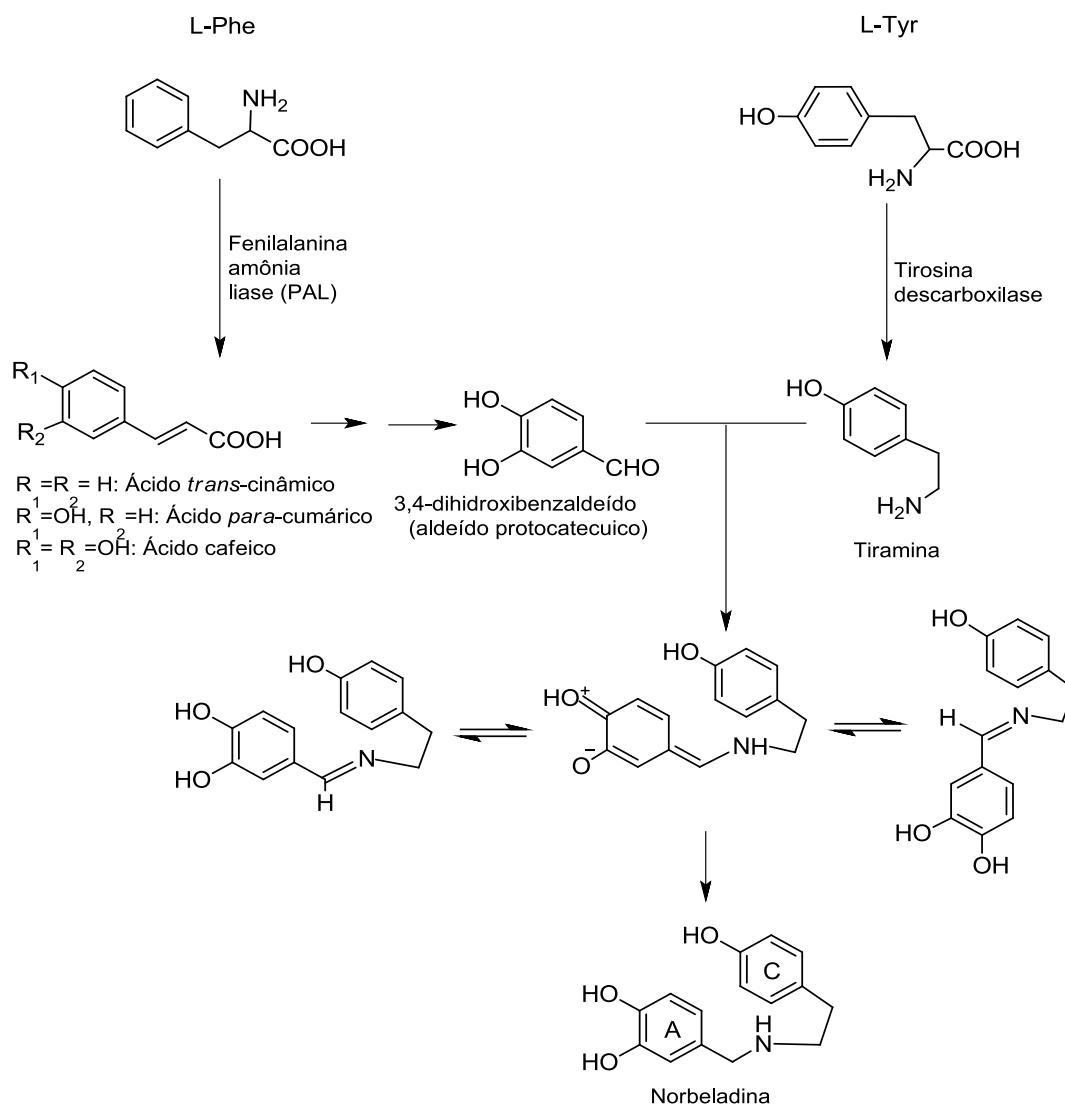


Figura 4. Formação do intermediário norbeladina por fusão dos aminoácidos L-Phe e L-Tyr.
Fonte: Bastida; Lavilla; Viladomat (2006).

Foi proposto que a norbeladina e os alcaloides relacionados poderiam sofrer acoplamentos oxidativos em plantas da família Amaryllidaceae, uma vez que o anel A tinha sido adequadamente protegido por metilação, resultando em diferentes esqueletos dos alcaloides desta família (BARTON; COHEN, 1957). As estruturas desse grupo de alcaloides podem variar consideravelmente, ainda que consideradas biogeneticamente relacionadas. Embora ocorra esta variedade de estruturas, estes alcaloides são classificados em nove tipos de esqueletos derivados de diferentes tipos de acoplamentos fenol oxidativos do intermediário 4-O-metilnorbeladina, como mostra a Figura 5 (BU'LOCK, 1965; HOSHINO, 1998; UNVER et al., 1999; UNVER et al., 2003; BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006; HE et al., 2015).

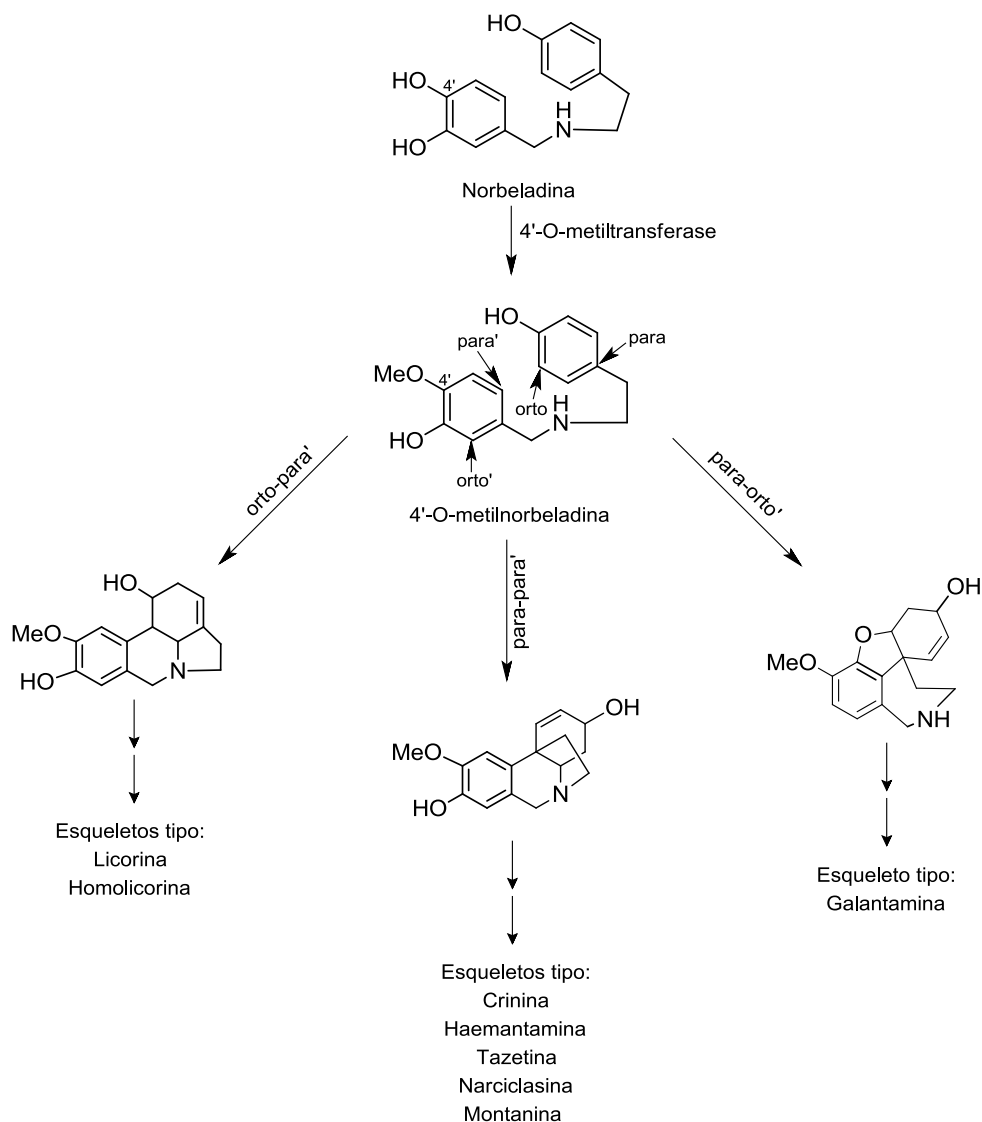


Figura 5. Acoplamentos fenol oxidativos em alcaloides de Amaryllidaceae.
Fonte: Bastida; Lavilla; Viladomat (2006).

O acoplamento fenol oxidativo *orto-para'* origina os esqueletos do tipo licorina e homolicorina, o *para-para'* origina os esqueletos do tipo crinina, haemantamina, tazetina, narciclasina e montanina, enquanto o acoplamento *para-orto'* origina o esqueleto do tipo galantamina (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006). Vale ressaltar que novas descobertas têm sido feitas, resultando no surgimento de novos esqueletos, como os do tipo plicamina, gracilina e licosinina (UNVER, 2007; JIN, 2013).

Todos os esqueletos encontram-se representados na Figura 6:

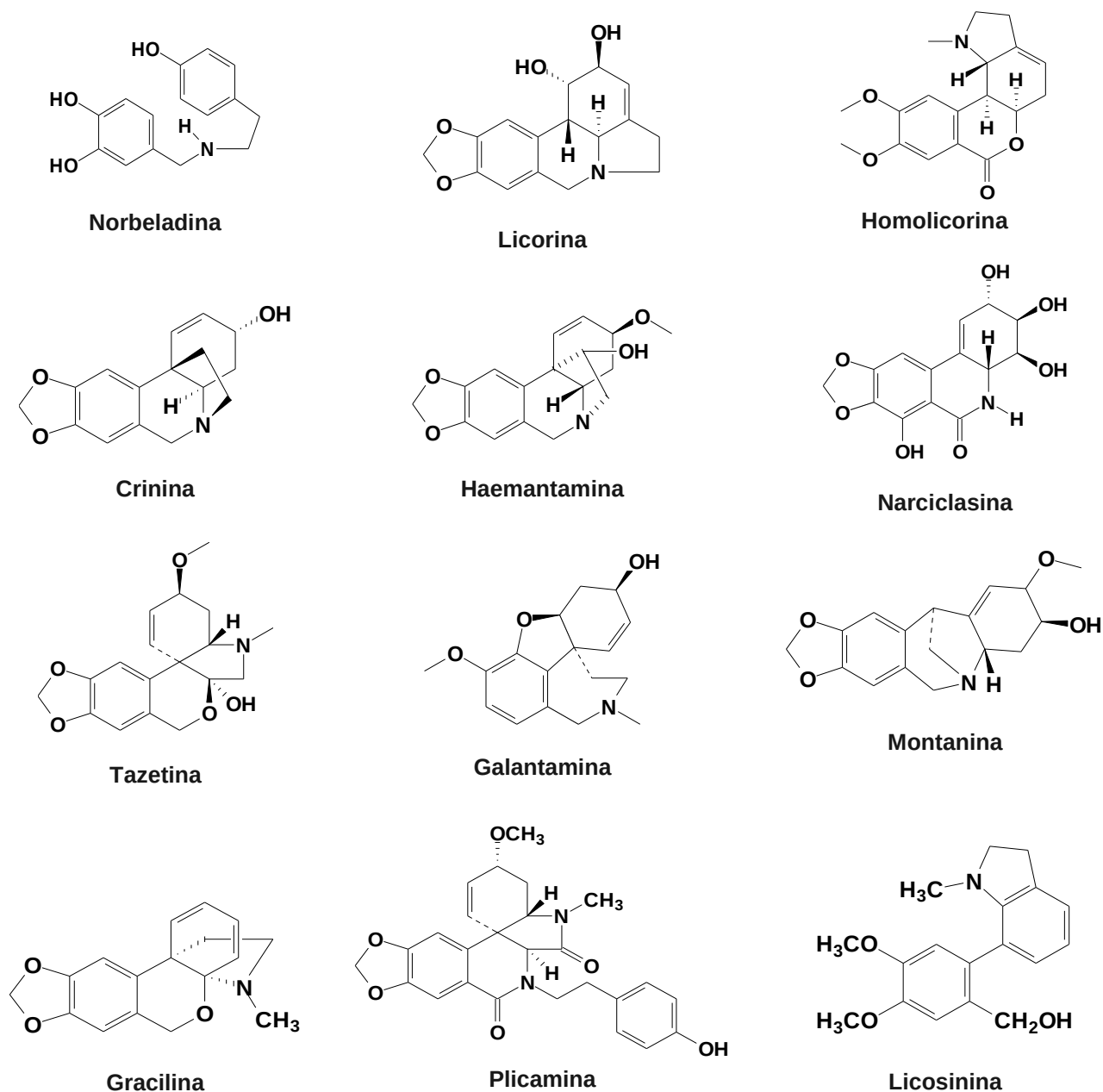


Figura 6. Esqueletos típicos de alcaloides de Amaryllidaceae.

2.3.4. Uso medicinal

A família Amaryllidaceae apresenta também aplicações medicinais conhecidas desde tempos remotos. Na bíblia, existem relatos do uso de preparações à base de plantas da família para tratamento de enfermidades (HARTWELL, 1967). No século IV a.C., Hipócrates utilizou o óleo de *Narcissus poeticus* L. para o tratamento de tumores uterinos (HULCOVÁ et al., 2017). Culturas indígenas antigas faziam uso de algumas espécies bulbosas de gêneros tropicais como cataplasma para o tratamento de feridas ou fervidas e embebidas para preparo de chá emético para o estômago (MEEROW; SNIJMAN, 1998). Há relatos de uso dos extratos de plantas da família

Amaryllidaceae, como *Narcissus poeticus*, *Narcissus pseudonarcissus* e *Hymenocallis caribaea*, no tratamento de tumores na prática médica da China, norte da África, América Central e Arábia durante a idade média (EVIDENTE et al., 2009).

Grande parte destas propriedades medicinais estão relacionadas à rica composição alcaloídica das espécies (UNVER, 2007).

As espécies caracterizam-se por apresentar amplo espectro de atividades biológicas que incluem, entre outras, propriedades antivirais, antitumorais e antiparasitárias (BASTIDA et al., 2011). Entre estas diversas propriedades biológicas conhecidas, dois temas são recorrentes: inibição da acetilcolinesterase, com o sucesso da galantamina para a terapia de Alzheimer, e citotoxicidade (NAIR et al., 2012). Neste último caso, tem havido vários indicadores positivos para o surgimento de um fármaco anticâncer a partir desta família devido às atividades antiproliferativas potentes manifestadas por vários dos seus alcaloides constituintes, com destaque para as estruturas fenantridônicas, como a pancratistatina (NAIR; VAN STADEN; BASTIDA, 2016a), considerada pelo NCI o alcaloide mais potente do grupo no que diz respeito à ação citotóxica (MUTSUGA et al., 2002).

Diversos trabalhos evidenciam o uso popular destas plantas contra o câncer. O alcaloide narciclasina apresenta potente atividade antitumoral, induzindo importantes efeitos citotóxicos por apoptose em células humanas (linhagens celulares MCF-7, de câncer de mama, e PC-3, de câncer de próstata), mas não em fibroblastos normais (KORNIENKO; EVIDENTE, 2008).

Crinamina e haemantamina são indutores potentes da apoptose em células tumorais a concentrações micromolares (MOHAN; DEEPA, 2012). Licorina, vitatina e montanina apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra cinco linhagens celulares humanas (adenocarcinoma de cólon, carcinoma de pulmão, carcinoma de células renais, câncer de mama e de ovário), e, dentre as três, a montanina demonstrou potencial atividade antiproliferativa (SILVA et al., 2008), assim como uma série de atividades psicofarmacológicas, tais como antidepressiva, ansiolítica e anticonvulsivante (SILVA et al., 2006),

Carvalho et al. (2015) em seu estudo de avaliação da atividade citotóxica dos alcaloides de *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. (Amaryllidaceae), isolaram um novo alcaloide, 2 α -10 β -dihidroxi-9-O-desmetilhomolicorina, e sete outros já conhecidos: pseudolicorina, narcissidina, sanguinina, 11-hidroxivitatina, N-óxido-galantamina,

galantamina e narciclasina. A avaliação da citotoxicidade destes alcaloides revelou alta atividade para a narciclasina e pseudolicorina.

Alguns alcaloides de Amaryllidaceae dotados de ação citotóxica são apresentados na Figura 7.

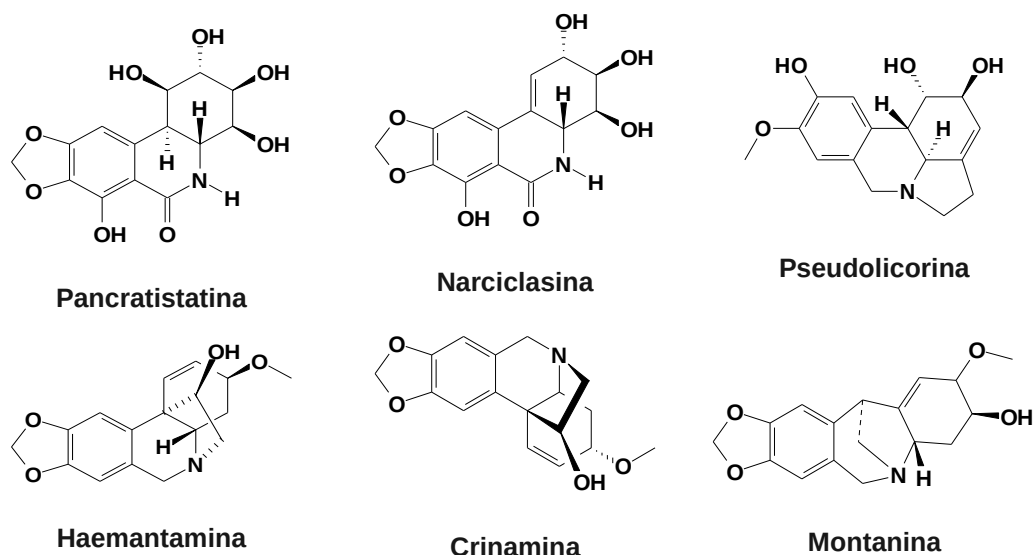


Figura 7. Alcaloides de Amaryllidaceae dotados de ação citotóxica.

Desta forma, os alcaloides de Amaryllidaceae têm demonstrado grande potencial de aplicação farmacológica, comprovado por meio de diversos estudos tanto em nível nacional quanto internacional.

2.3.5. Gênero *Griffinia*

O gênero *Griffinia* foi proposto em 1820, porém, a primeira espécie descrita, *Amaryllis hyacinthina*, renomeada posteriormente para *Griffinia hyacinthina*, data de 1816. Trata-se de um gênero endêmico do Brasil representado por aproximadamente vinte espécies, muitas das quais ameaçadas ou em vias de extinção (ROCHA NETO, 2015), visto que apresentam escassa reprodução vegetativa e desaparecem com a perturbação das matas. Em quase todas as espécies as plantas são pequenas, de floração aparentemente esporádica, o que torna a sua coleta uma raridade ainda maior (DUTILH, 2005).

O gênero encontra-se atualmente dividido em dois subgêneros com importantes diferenças morfológicas e ecológicas: *Griffinia* e *Hyline*. O primeiro com quatro a quinze flores sem odor, de cor lilás, azulada ou branca e antese diurna, com espécies

distribuídas pelas florestas úmidas e estacionais de São Paulo ao Ceará, enquanto as espécies do subgênero *Hyline* geralmente produzem duas ou quatro flores grandes brancas e com odor, apresentam antese noturna, sendo encontradas sobretudo em áreas mais secas do país, como em regiões da Caatinga e do Cerrado (ENGEL, 2014; ROCHA NETO, 2015). As diferenças podem ser visualizadas na Figura 8.



Figura 8. *Griffinia intermedia* e *Griffinia gardneriana*, na sequência, exemplos de espécies dos subgêneros *Griffinia* e *Hyline*, respectivamente.

Fonte: Engel (2014).

Conforme pode ser verificado na Figura 8, são plantas de elevado potencial na horticultura, pois são bastante apreciadas por suas belíssimas flores. Entretanto, esse gênero de plantas endêmicas encontra-se seriamente ameaçado de extinção e, atualmente, algumas espécies não têm sido mais encontradas em seus habitats originais, e algumas poucas são cultivadas em coleções particulares (ENGEL, 2014).

2.3.5.1. *Griffinia gardneriana*

Descrita originalmente na obra Plant Life 25: 63. 1969, a espécie é caracterizada por bulbos obovados a oblato, e, compõe o subgênero *Hyline* (CNCFlora, 2018).

Griffinia gardneriana (Figura 9) ocorre na Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Possui flores odoríferas, antese noturna, abertura dos botões da mesma inflorescência quase concomitante e duração dos mesmos por apenas uma noite. A floração ocorre entre dezembro e março (ALVES-ARAÚJO, 2007).

É uma espécie típica da caatinga de areia ocorrendo em áreas abertas, ou ainda, sob arbustos em solos bem drenados. No Parque Nacional do Catimbau, a espécie possui uma densa população, o que pode ser melhor observado na estação chuvosa, uma vez que as folhas são decíduas no período seco (ALVES-ARAÚJO, 2007).

Em todo o levantamento bibliográfico realizado, não foi identificado estudo de caracterização do perfil químico da espécie.



Figura 9. *Griffinia gardneriana*, bulbo e flor.
Fonte: Tsang (2017).

2.3.6. Gênero *Habranthus*

Habranthus Herb. pertence a tribo Hippeastreae Herb. ex Sweet de Amaryllidoideae, apresentando entre 30 e 40 espécies, distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos e México até a América do Sul (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015). Na Cadeia do Espinhaço, entre os estados de Minas Gerais e Bahia, o gênero está representado por sete espécies (*H. bahiensis*, *H. botumirimensis*, *H. datensis*, *H. irwinianus*, *H. itaobinus*, *H. lucidus* e *H. sylvaticus*) (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010).

Os representantes do gênero são caracterizados pela presença de bulbos perenes, folhas anuais, brácteas fundidas em tubo, flores zigomorfas e estames em quatro comprimentos diferentes (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015).

Habranthus é semelhante morfológicamente ao gênero *Zephyranthes* Herb., e a distinção entre eles é feita principalmente com base na simetria das flores: enquanto *Habranthus* apresenta flores zigomorfas, *Zephyranthes* apresenta flores actinomorfas (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010).

2.3.6.1. *Habranthus itaobinus*

Dentre as espécies do gênero, *Habranthus itaobinus* (Figura 10) é a de distribuição mais ampla, abrangendo vários estados do Nordeste e Centro-Oeste. Ocorre tanto na Caatinga quanto no Cerrado, em formações de campo rupestre,

campos e brejos temporários, em solos arenosos, areno-argilosos e afloramento de calcário (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015).

Habranthus itaobinus pode ser reconhecida pelas flores branco-esverdeadas a rosadas, com ápice mais escuro, filetes em 2 comprimentos e paraperigônio reduzido a calosidades opostas aos filetes. Aparecem entre os meses de outubro e dezembro (OLIVEIRA; ANTOINETTE; SANO, 2010).

A espécie apresenta ampla variação morfológica (OLIVEIRA, 2006), que parece não estar relacionada à fatores ambientais, mas sim à plasticidade genética dos indivíduos, ou seja, a ocorrência de cruzamento de *H. itaobinus* com indivíduos de outras espécies (AMARAL, 2007).

Em todo o levantamento bibliográfico realizado, não foi identificado estudo de caracterização do perfil químico da espécie.



Figura 10. *Habranthus itaobinus*, bulbo e flor.

Fonte: Aschaff (2018).

2.3.7. Toxicidade

É importante ressaltar que esta ampla gama de atividades biológicas demonstradas pelos alcaloides de Amaryllidaceae também implicam em toxicidade significativa para as espécies da família.

Os efeitos tóxicos dos alcaloides de Amaryllidaceae são amplos, variando de distúrbios gastrintestinais como vômito e diarreia, efeitos cardiopulmonares como parada respiratória e parada cardíaca, assim como efeito alucinógenos e neurotóxicos no sistema nervoso central (DING et al., 2017).

Plantas do gênero *Narcissus* têm sido utilizadas como estimulantes para induzir transe e alucinações, assim como agente para suicídio. Após ingestão de *Narcissus*

pseudonarcissus e *Narcissus jonquilla*, os primeiros sintomas visualizados foram salivação, dor abdominal aguda, náusea, vômito e diarreia, seguido de sequelas neurológicas e cardíacas. Se ingerido em grande quantidade pelo homem e animais de sangue quente, pode resultar em morte (DING et al., 2017).

2.4. CÂNCER

O câncer caracteriza-se por ser uma doença multifatorial, resultado de sequências de mutações ou alterações genéticas, cujas causas variam desde erros aleatórios na replicação do DNA à indução por meio de agentes mutagênicos, como a radiação, substâncias químicas ou infecções virais. As células cancerígenas proliferam-se rapidamente, invadindo tecidos e órgãos e formando tumores malignos com alta capacidade de metástase, isto é, de disseminação para outras regiões do corpo (SILVA et al., 2017). De forma geral, as células de câncer apresentam defeitos em vias de regulação de proliferação celular e homeostase (WCRF; AICR, 2007). Trata-se de um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2002).

O *Relatório Mundial do Câncer 2014*, divulgado pela OMS, estima que o número de novos casos chegue a 22 milhões em 2030 (comparados aos 14 milhões em 2012). Mais de 70% das mortes pela doença acontecem em países em desenvolvimento, onde a detecção tardia, a demora em iniciar o tratamento e a falta de acesso a medicamentos de última geração explicam boa parte dos óbitos (IARC, 2014).

Estima-se, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais comuns em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figurarão entre os principais (INCA, 2017).

As principais terapias utilizadas no tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia citotóxica (ALMEIDA et al., 2005).

A cirurgia é o método mais antigo e definitivo de tratamento de câncer, podendo ser curativa ou paliativa. O primeiro caso é o tratamento primário para um terço de cânceres pequenos e que ainda não apresentam metástase – se o tumor for removido com uma pequena quantidade de tecido normal, as chances de cura são boas. No

segundo caso, uma grande massa de tumor é removida para deixar o paciente mais confortável (EHRMAN et al., 2013).

A radioterapia é a modalidade terapêutica que utiliza as radiações ionizantes no combate aos agentes neoplásicos com o objetivo de atingir células malignas, impedindo sua multiplicação por mitose e/ou determinando a morte celular (BRASIL, 2008).

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. É o tratamento de escolha para doenças malignas do sistema hematopoético e para os tumores sólidos, que apresentam metástases regionais ou à distância. A maioria dos agentes atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto benignas (BRASIL, 2008).

A maioria dos agentes quimioterápicos pode ser agrupada de acordo com a atuação no ciclo celular quer seja em fase de atividade ou de repouso. Os agentes ciclo celular específicos têm a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem no ciclo celular ou estarem em repouso, enquanto os agentes ciclo celular não-específicos atuam apenas nas células que se encontram no ciclo celular. Os agentes hormonais não são citotóxicos, por serem modulares de proliferação celular, e devem ser classificados à parte; a ação hormonal depende de ligações entre o hormônio e o seu receptor citoplasmático específico (ALMEIDA et al., 2005).

Os produtos naturais ciclo-celular específicos são outro tipo de agente antineoplásico importante e eficiente, representando muitos fármacos usados na terapia clínica do câncer e que originalmente não são compostos sintéticos. Incluem alcaloides da Vinca, taxol, podofilotoxinas, dentre outros (ALMEIDA et al., 2005).

O século XX representou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (PINTO et al., 2002).

A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (PINTO et al., 2002). Em 2002, um terço do mercado de fármacos para o câncer foi representado por dois

grupos de quimioterápicos derivados de produtos naturais (taxanos e derivados de camptotecina) (BRANDÃO et al., 2010).

A busca por tais medicamentos tem aumentado a fim de se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. As pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo de enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (BRANDÃO et al., 2010).

2.4.1. Vias de indução de apoptose: alvos potenciais de ação de novos agentes citotóxicos

As células tumorais podem se manter viáveis apesar de danos no DNA em função de alterações no processo de apoptose (WENDT et al., 2006), um tipo de morte celular que ocorre de forma organizada e controlada, com mínima ativação do sistema imune, fundamental no desenvolvimento e na manutenção dos organismos, permitindo a eliminação de células e tecidos lesados (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), sem haver perturbação das células adjacentes.

Dentre os fenômenos observados na apoptose tem-se a clivagem de proteínas, realizada, principalmente, por caspases (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003), cuja ativação resulta, em geral, de estímulos apoptóticos, podendo constituir o passo inicial de uma das vias de apoptose conhecidas (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

Das 14 caspases humanas conhecidas, seis participam da apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). São classificadas em dois grupos: as *caspases iniciadoras* e as *caspases efetoras*. As caspases iniciadoras (8, 9, 10) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as; caspases efetoras (3, 6, 7) por sua vez clivam outros substratos protéicos da célula resultando no processo apoptótico. A iniciação da reação em cascata é regulada por inibidores de caspases (PERES; CURI, 2005).

A ativação das caspases ocorre por duas vias principais, as vias intrínseca e extrínseca, conduzindo a uma cascata complexa de eventos (FULDA; DEBATIN, 2006), apesar da ativação das caspases induzida por estresse de retículo endoplasmático também ser possível (SANO; REED, 2013).

Na *via extrínseca* (Figura 11), ligantes como Fas ou TNF- α interagem com receptores de morte na membrana celular e recrutam proteínas adaptadoras, como a FADD, que por sua vez recrutam e agregam moléculas de caspase-8 promovendo auto-processamento e ativação dessa caspase iniciadora. A caspase-8 ativa promove proteólise e ativação das caspases efetoras 3 e 7, o que resulta na degradação de inúmeros substratos e, finalmente, em morte celular (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

Em algumas situações, a via extrínseca pode estabelecer comunicação com a *via intrínseca* por meio da proteólise de BID mediada pela caspase-8. BID é parte de uma família de proteínas que funcionam como sensores de estresse celular. Quando as proteínas que compõem essa família são ativadas acima de certo limiar, superam a ação inibidora dos membros de outra família, BCL-2, e promovem a formação de oligômeros de BAK-BAX na membrana mitocondrial (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008), através do qual ocorre o efluxo de componentes do espaço intramembranar da mitocôndria para o citoplasma, entre eles o citocromo C. Com a subsequente ativação de caspase-9, desenvolve-se uma cascata proteolítica e a ativação de caspases efetoras (SLEE et al., 1999).

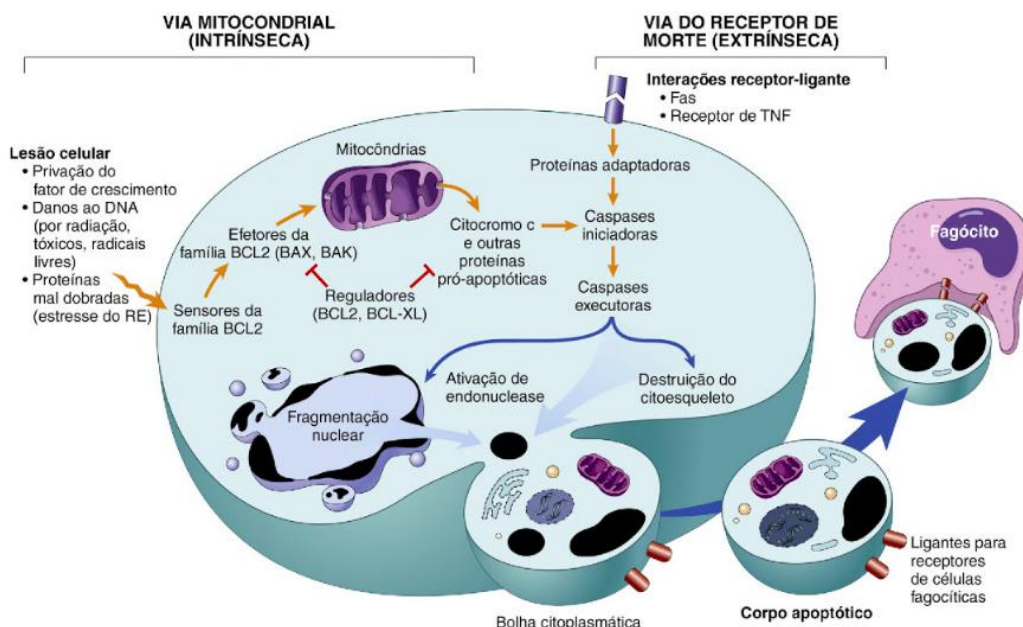


Figura 11. Vias de indução de apoptose: intrínseca e extrínseca.

Fonte: Abbas et al. (2010).

As caspases também podem ser ativadas por uma via dependente de granzima B, uma protease presente em grânulos de linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*

(ANTHONY et al., 2010). Além de granzima B, os grânulos contêm uma proteína formadora de poros, a perforina, que se polimeriza na membrana das células-alvo formando poros e permitindo a entrada da granzima (MASSON; TSCHOPP, 1985; PODACK; YOUNG; COHN, 1985). Após entrar na célula, a granzima B cliva seus substratos, entre eles BID, caspases 3 e 7, dando início à apoptose (ADRAIN; MURPHY; MARTIN, 2005).

A literatura ressalta a importância da caspase-3 no processo apoptótico. Trata-se de um dos executores chave da apoptose, sendo responsável, parcial ou totalmente, pela clivagem proteolítica de várias proteínas, igualmente importantes (COHEN, 1997). A caspase-3 é a responsável pela maioria dos efeitos celulares deletérios da apoptose, recebendo suporte de outras como a caspase-6 e a 7 (ZIMMERMANN; GREEN, 2001).

2.4.1.1. Avaliação de danos no DNA – Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo possui a capacidade de detectar a quebra de cromossomos e também a segregação cromossômica anormal (RIBEIRO; SALVADOR; MARQUES, 2003), baseando-se no fato de que a formação espontânea de MN é baixa e quase uniforme entre as espécies. Assim, efeitos de substâncias que provoquem as quebras cromossômicas ou ainda afetem componentes do fuso ou da região centromérica, podem ser detectados a partir da presença de MN (HEDDLE et al., 1991).

Os MN são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo das células-filhas durante a divisão celular (FENECH, 2007).

O método gera resultados com forte apoio estatístico, e, portanto, é amplamente usado como ferramenta de triagem para determinar a segurança de muitas substâncias (FENECH et al., 1999).

O teste do MN *in vitro* é utilizado para elucidação do mecanismo de ação de agentes citogenéticos (FENECH et al., 2003). A Cyt B é o agente que tem sido amplamente utilizado para bloquear a citocinese, pois inibe a polimerização da proteína actina, requerida para a formação de anel de microfilamentos, que induz à contração do citoplasma e divisão da célula em duas células-filhas (citocinese). Com isso, promove inibição da citocinese, mas não impede o processo de divisão nuclear

e, como resultado, observa-se um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão nuclear (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; FENECH, 2007).

Uma das considerações mais importantes no ensaio MN é assegurar que as células que estão sendo pontuadas tenham concluído a mitose durante o tratamento ou o período de incubação pós-tratamento (OECD, 2010).

2.5. DOCKING MOLECULAR

A modelagem molecular envolve representações estruturais mais próximas o possível do real, através de um conjunto de cálculos, utilizando a química teórica como instrumento matemático e a computação gráfica para manusear os modelos obtidos, facilitando assim a interpretação da relação entre a estrutura e atividade biológica (BIELSKA et al., 2011).

Neste contexto, a química teórica atua como ferramenta de apoio em análises e interpretação de dados experimentais, possuindo grande importância no planejamento racional de fármacos, já que este envolve análise conformacional de sistemas complexos, como por exemplo o estudo da interação entre fármaco-proteína (MILLER, 2012).

O *docking* é composto por um conjunto de previsões baseadas no ranqueamento das melhores poses ou *clusters* de ocupação do substrato, ancoradas no sítio ativo da proteína-alvo. A afinidade de ligação pode ser prevista através da comparação de quão efetivamente os ligantes se ligam à proteína (funções de pontuação e ranqueamento). O ranqueamento ou classificação é estabelecido com a priorização das poses energeticamente favorecidas e com orientações de ligação efetiva à proteína, determinada por algoritmo computacional. Essa priorização é definida por diferentes funções de cálculo da energia de interação, tais como eletrostática, ligação de hidrogênio, van der Waals, entropia e solvatação explícita, descritos como uma combinação de algoritmo de busca associado a função de pontuação (*scoring* = ranqueamento) (KROEMER, 2007).

Desta forma, são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante-alvo. A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de

ligação (entre ligante e alvo), onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN et al., 2004).

O preparo das estruturas químicas a serem testadas, compreende uma das partes mais importantes nas propostas de novos ligantes, pois as moléculas devem ser projetadas com cuidado, mantendo disposições parecidas dos átomos da molécula primária. Através de varredura conformacional e alinhamento tridimensional com o ligante original podem ser propostas moléculas melhoradas (GOODARZI; FREITAS; FERREIRA, 2009).

Logo, as técnicas de *docking* molecular têm se revelado uma importante ferramenta para filtrar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor. Trabalhos de modelagem molecular utilizando *docking*, envolvendo a caspase-3, têm sido conduzidos a fim de identificar ligantes promissores, em diferentes quadros patológicos (AHMAD et al., 2014; KUMAR; JHA, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Realizar o estudo químico em alcaloides dos bulbos das espécies *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna e *Habranthus itaobinus* Ravenna, pertencentes à família Amaryllidaceae, avaliar suas propriedades citotóxicas e genotóxicas e o papel da caspase-3 como mediador molecular da apoptose induzida pelos alcaloides isolados.

3.2. ESPECÍFICOS

- Identificar os alcaloides isolados por técnicas espectroscópicas, como a Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D, e o Dicroísmo Circular;
- Analisar as ações biológicas de frações enriquecidas e de alcaloides isolados em ensaio *in vitro* de citotoxicidade (MTT);
- Analisar a ação genotóxica dos alcaloides citotóxicos através do ensaio *in vitro* do micronúcleo celular;
- Avaliar a ativação da apoptose pela via das caspases por meio do ensaio colorimétrico de detecção da expressão de caspase-3 para os alcaloides citotóxicos;
- Realizar estudos *in silico* (*docking* molecular) para investigar o processo de interação entre os alcaloides isolados e a proteína caspase-3.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Materiais

4.1.1.1. Solventes em geral e reagentes específicos

Foram utilizados:

- *Solventes comerciais*: *n*-hexano, acetato de etila, metanol, clorofórmio, acetona e diclorometano, analiticamente puros ou purificados através de processo de destilação fracionada.
- *Solventes HPLC*: metanol (Panreac), acetonitrila (Panreac).
- *Solventes para RMN*: metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido deuterados (Sigma Aldrich).
- *Outros*: Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio), Mayer (iodomercurato de potássio), sulfato de sódio anidro, hidróxido de amônio, ácido sulfúrico e ácido trifluoroacético.
- *Substâncias específicas para os ensaios de citotoxicidade celular*: MTT (Sigma Aldrich), camptotecina (Sigma Aldrich), DMEM (Gibco, Invitrogen Corporation), solução de penicilina G-estreptomicina-L-glutamina (Sigma Aldrich), soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen Corporation), tripsina-EDTA (Gibco), DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen Corporation), citocalasina B (Sigma Aldrich), mitomicina C (Sigma Aldrich), kit colorimétrico de detecção da expressão de caspase-3 (Thermo Scientific), kit para detecção de contaminação de micoplasma (MycoAlert™ Plus Mycoplasma Detection Kit, LT07-705 controle LT07-518, Lonza), isopropanol acidificado com ácido clorídrico, dimetilsulfóxido, formaldeído, peroxidase de rábano (Thermo Scientific) e corante panótico (Instant Prov).

4.1.1.2. Linhagens celulares e condições das culturas

Nos ensaios de atividade biológica foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: OVCAR-3 ATCC® HTB-161™ (adenocarcinoma de ovário), J774 ATCC® TIB-67™, (macrófago murino), L929 ATCC® CCL-1™ (fibroblasto murino), HepG2 ATCC® HB-8065™ (hepatocarcinoma), MCF-7 ATCC® HTB-22™

(adenocarcinoma de mama) e A549 ATCC® CCL-185™ (adenocarcinoma de pulmão), mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10 mL de solução de penicilina G-estreptomicina-L-glutamina e 20% de soro fetal bovino, a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Foram utilizadas também células CHO-1-15 BCRJ0067 (ovário de hamster *Cricetulus griseus*), cultivadas em meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 UI.mL⁻¹ e estreptomicina 100 µg.mL⁻¹, tendo sido respeitado, assim como para as células A549 ATCC® CCL-185™, o número máximo de passagens 10 e testadas para verificar contaminação por micoplasma com kit específico.

4.1.2. Métodos

4.1.2.1. Cromatografia em Camada Delgada

Realizada em cromatofolhas de alumínio (0,20 mm) recobertas com sílica gel 60 G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel (20 x 20 cm). Empregada a fim de comparar os fatores de retenção (R_f) entre os constituintes químicos dos extratos e suas frações (realizada em uma cuba de vidro com tampa e atmosfera de amônia), visualizados por exposição ao UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm, e posteriormente borrifadas com o reagente de Dragendorff seguido de aquecimento a fim de monitorar a presença de alcaloides.

4.1.2.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Utilização de cromatoplaças de vidro (0,25 mm) recobertas com sílica gel 60 G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel (20 x 20 cm). As frações foram monitoradas através de luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e pelo reagente de Dragendorff, seguidas de aquecimento. A cromatografia foi realizada em uma cuba de vidro com tampa e atmosfera de amônia. A fase móvel foi escolhida de acordo com as características da fração e a aplicação da amostra feita com capilar recurvado a uma distância de 3,0 cm da base da placa. As manchas removidas da placa foram imersas em AcOEt (grau HPLC) e mantidas em banho de ultrassom por trinta minutos, sendo posteriormente filtradas com filtro de porosidade de 0,45 µm e a sílica lavada com duas alíquotas de aproximadamente 2 mL de AcOEt, e AcOEt/MeOH na proporção 4:1 (ambos grau HPLC). O solvente foi removido em evaporador rotatório e os compostos isolados foram armazenados a vácuo em um dessecador por 24 horas.

4.1.2.3. Cromatografia em Coluna e Cromatografia Líquida à Vácuo

Realizadas em colunas com altura, diâmetro e fase móvel variáveis, e utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck). Todos os parâmetros foram escolhidos de acordo com as características de cada amostra, tais como solubilidade, quantidade de amostra e polaridade na CCD.

4.1.2.4. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento 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 μ m); programação da temperatura: 100-180°C a 15°C.min⁻¹, 1 min. em 180°C, 180-300°C a 5°C.min⁻¹ e 40 min. a 300°C; temperatura no injetor: 280°C; fluxo de gás: 0,8 mL.min⁻¹ com gás hélio. As análises foram realizadas no Laboratório Central Analítica I, do campus de Alegre da UFES.

4.1.2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O isolamento dos alcaloides por CLAE preparativo foi realizado em equipamento Agilent de bomba binária modelo G1361A-1260 prep pump, coluna Agilent Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 9,4 x 250 mm (semi-prep.), acoplado a um detector *Diode Array* (DAD) 1260 MWD VL, G1365D e coletor de frações 1260 FC-PS, modelo G1364B; fase móvel: H₂O/MeOH/ACN (8:1:1 + 1% TFA). O procedimento foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do campus Goiabeiras da UFES.

Para desprotonar os alcaloides oriundos da CLAE foi adotado o seguinte procedimento: o composto foi solubilizado com 4 mL de uma solução aquosa de NH₄OH 25% (v/v), a qual foi submetida à extração com 20 mL de CHCl₃ grau HPLC (4 x 5 mL). A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e rotaevaporada.

4.1.2.6. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

O espectro de DC foi obtido em espectrômetro Jasco-J-810 (Easton, MD, USA), utilizando como solvente MeOH. A análise foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Barcelona – Espanha.

4.1.2.7. Ressonância Magnética Nuclear

As análises foram realizadas em espectrômetro Varian 400 MHz, com sonda 5

mm ATB BroaBand $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$, realizando-se RMN ^1H , RMN ^{13}C (totalmente desacoplado), espectros bidimensionais (gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm, as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e ao TMS usado como padrão interno é atribuído $\delta=0$ ppm. As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do NCQP do campus Goiabeiras da UFES.

4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Bulbos frescos de *Griffinia gardneriana* (2.091 g) e *Habranthus itaobinus* (1.747 g) (Figura 12) foram coletados no Parque Nacional do Catimbau, em Buíque, Pernambuco, nas coordenadas geográficas 8°31'59" S e 37°15'04" W, em novembro de 2014 (autorização de coleta nº 42.164-1 – Ministério do Meio Ambiente; Anexo I).

A coleta do material vegetal foi realizada pelo Dr. Warley de Souza Borges, sendo a identificação e herborização deste material realizada pelo Dr. Anderson Alves-Araújo.

A exsicata de *Habranthus itaobinus* foi depositada no herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número 38995, e a exsicata de *Griffinia gardneriana* foi depositada no herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número 43016.



Figura 12. Flores de *Griffinia gardneriana* e *Habranthus itaobinus*, na sequência.
Autoria: Alves-Araújo (2014).

4.3. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE ALCALOIDES

Os bulbos frescos coletados, de ambas as espécies, foram triturados, separadamente, em liquidificador e submetidos à remaceração com MeOH por quatro vezes, admitindo-se um intervalo de 72h entre os procedimentos e sendo filtrados em

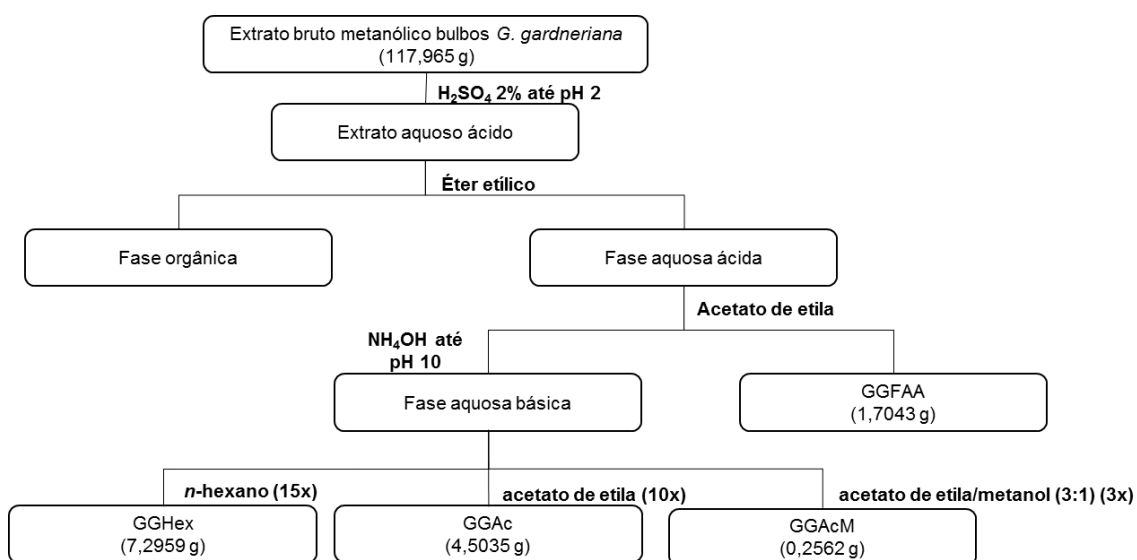
papel de filtro. Os filtrados foram reunidos e o solvente removido em rotaevaporador, originando os extratos brutos.

Os extratos brutos obtidos pela remaceração dos bulbos foram particionados com éter etílico (4 x 200 mL) após acidificação com H_2SO_4 (2% v/v) até pH 2. A fase aquosa obtida neste último passo foi então submetida a uma nova partição com AcOEt (4 x 200 mL). A fração AcOEt em pH ácido foi armazenada para posterior confirmação de presença de alcaloides.

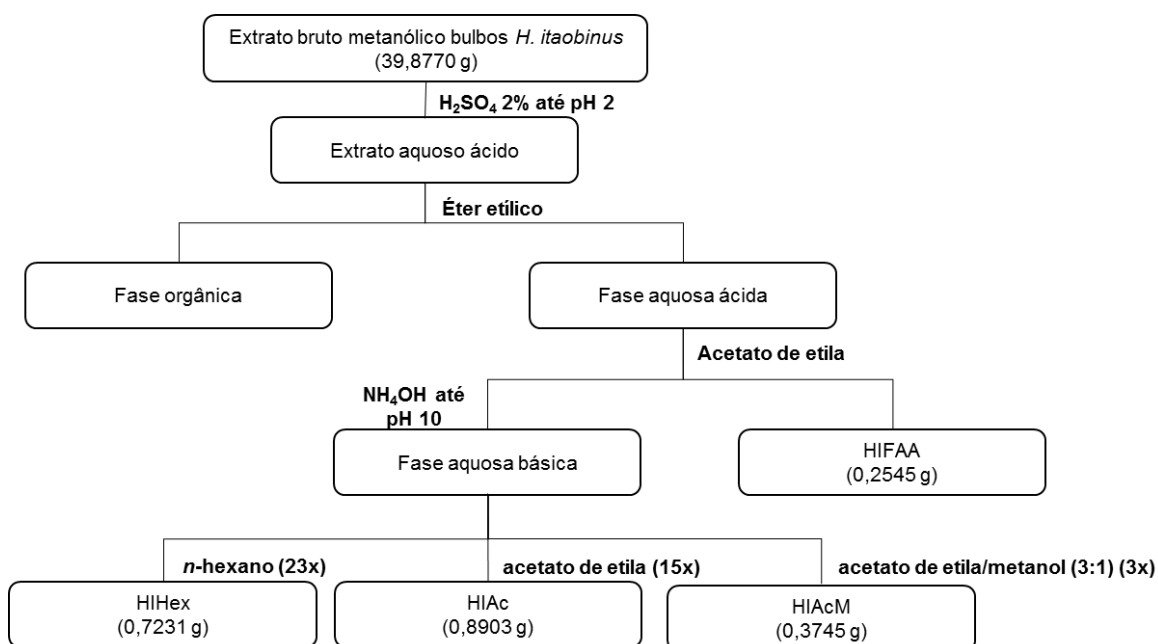
O passo seguinte consistiu em alcalinizar o meio aquoso ácido com NH_4OH (25% v/v) até pH 10 para a extração dos alcaloides mediante o uso repetido de solventes em ordem crescente de polaridade: Hex, AcOEt e, AcOEt/MeOH (3:1). As extrações com cada solvente foram feitas até o momento em que a reação de Dragendorff fosse negativa.

Cada uma das frações foi filtrada na presença de sulfato de sódio anidro, sendo o solvente posteriormente evaporado à pressão reduzida, armazenadas a vácuo em um dessecador por 48h, e, então pesadas. O processo é ilustrado no Esquema 1, partes A e B, referentes respectivamente à *Griffinia gardneriana* e *Habranthus itaobinus*:

A)



B)



Esquema 1. Fracionamento ácido-base, dirigido à obtenção de frações enriquecidas em alcaloides dos bulbos de (A) *Griffinia gardneriana* e (B) *Habranthus itaobinus*.

Todas as frações foram submetidas à análise por CCD, utilizando AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (3:2:1) como solução eluente. As frações AcOEt/MeOH (3:1) de ambas as espécies (GGAcM e HIACM) e a fração AcOEt ácido de *H. itaobinus* (HIFAA) apresentaram resultado negativo frente ao reagente de Dragendorff.

Com base no peso das frações e do seu perfil cromatográfico por CCD analítica decidiu-se, em cada caso, o método cromatográfico preparativo a ser utilizado.

Nos casos de pouca massa, onde na análise por CCD aparecem apenas 2 ou 3 alcaloides, pode-se optar pela CCD preparativa para evitar perdas, desde que os R_f estejam razoavelmente separados. Quando isso não é possível, e dois compostos tendem a eluir e comportar-se da mesma maneira quando submetidos a qualquer sistema cromatográfico, opta-se por cromatografia de exclusão (Sephadex) ou CLAE preparativo. Se existe uma boa quantidade de massa de amostra e a mesma é rica em alcaloides, o ideal é realizar uma CC ou mesmo uma CLV.

As frações com resultado negativo frente ao reagente de Dragendorff foram submetidas também ao teste com o reagente de Mayer (outro teste para detecção de alcaloides).

O fracionamento cromatográfico é apresentado de forma detalhada no item 4.5.

4.4. ANÁLISE DE CG-EM E IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES

As frações Hex, AcOEt e AcOEt/MeOH (3:1) dos bulbos de ambas as espécies foram submetidas à análise de CG-EM para identificação prévia dos alcaloides (as frações foram diluídas em MeOH na concentração de 3 mg.mL⁻¹).

Os alcaloides foram identificados através da comparação de seus espectros de massas e índices de retenção de Kovats (IR) com os registros da biblioteca de alcaloides de Amaryllidaceae de propriedade do professor Dr. Jaume Bastida, da Universidade de Barcelona – Espanha.

O índice de retenção de Kovats é um índice que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos lineares de diferentes números de átomos de carbono. Ele fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais (JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003).

Os espectros de massas foram analisados usando o *software* AMDIS 2.64 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Para o cálculo dos IRs, uma mistura de padrões de alcanos lineares (C₉-C₃₆) foi injetada no aparelho nas mesmas condições cromatográficas já mencionadas.

4.5. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DE ALCALOIDES

Conforme já mencionado, foi realizada uma identificação prévia de alcaloides por CG-EM das frações enriquecidas, e, além disso obteve-se um perfil cromatográfico das mesmas por CCD.

De acordo com a CCD e a massa da fração enriquecida foi decidido o procedimento cromatográfico a ser realizado.

4.5.1. *Griffinia gardneriana*

A) Fração *n*-hexano (GGHex)

A fração *n*-hexano de *Griffinia gardneriana* (GGHex) (7,2959 g) foi inicialmente submetida à uma CLV utilizando gradiente crescente de polaridade. As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em quatro subfrações, das quais somente GGHex-4 (0,6410 g) apresentou-se positiva frente ao reagente de Dragendorff – Figura 13.

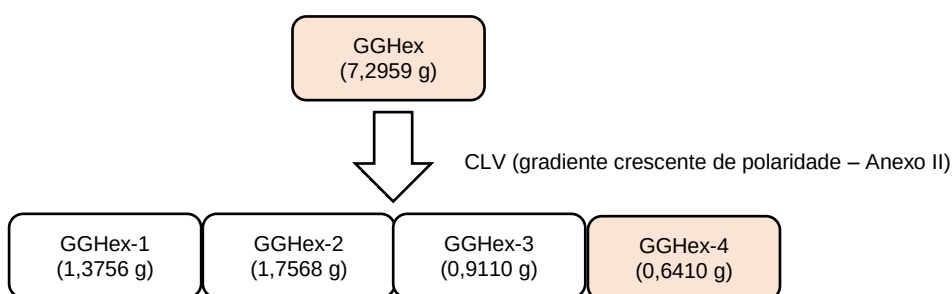


Figura 13. Fracionamento cromatográfico da fração GGHex.

Esta subfração foi então submetida a uma CC, utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel AcOEt/Hex/Me₂CO/MeOH (3:1:1:1).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em 4 subfrações. Destas, somente GGHex-4A revelou-se positiva frente ao reagente de Dragendorff – Figura 14.

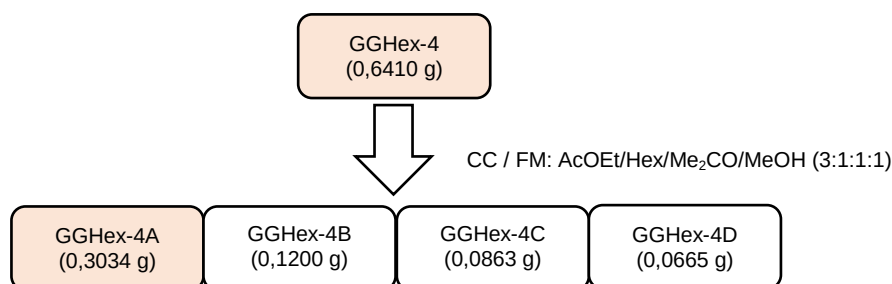


Figura 14. Fracionamento cromatográfico da subfração GGHex-4.

A subfração GGHex-4A (0,3034 g) foi, então, fracionada por uma coluna de exclusão Sephadex LH-20 utilizando como eluente somente MeOH.

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em 4 subfrações, das quais somente GGHex-4A3 apresentou resultado positivo para Dragendorff – Figura 15.

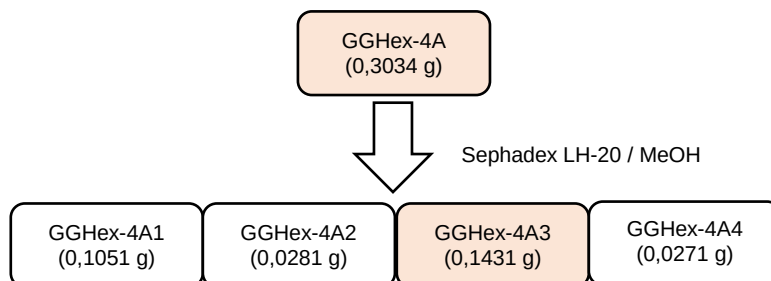


Figura 15. Fracionamento cromatográfico da subfração GGHex-4A.

A subfração GGHex-4A3 (0,1431 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex/Me₂CO/CH₂Cl₂/MeOH (2:3:1:1:1).

A partir desse procedimento, foram originadas quatro novas subfrações: GGHex-4A3a (13,10 mg), GGHex-4A3b (4,80 mg), GGHex-4A3c (1,30 mg) e GGHex-4A3d (2,90 mg). Estes produtos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolados os compostos **licorina** (GGHex-4A3b) e **trisfaeridina** (GGHex-4A3d) – Figura 16.

A.1) Subfração GGHex-4A3b

A subfração GGHex-4A3b foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina (1,80 mg)**.

A.2) Subfração GGHex-4A3d

A subfração GGHex-4A3d foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **trisfaeridina (1,90 mg)**.

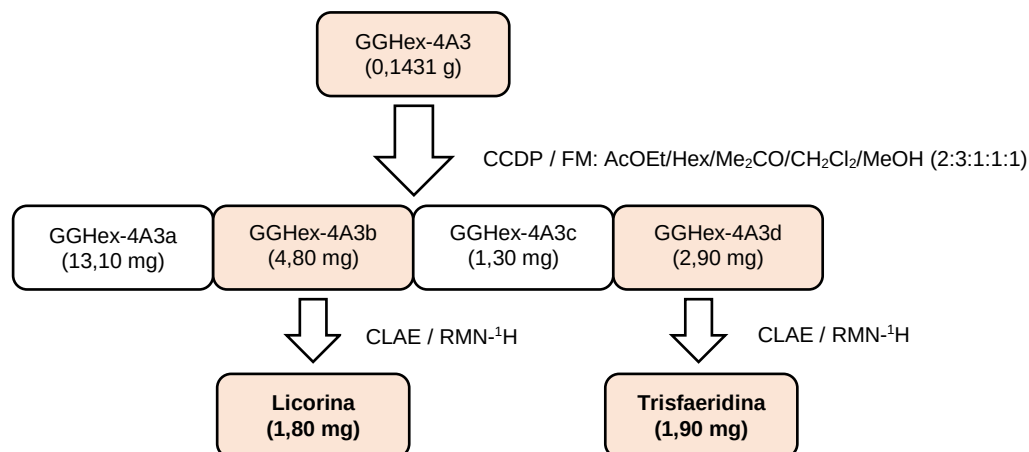


Figura 16. Fracionamento cromatográfico da subfração GGHex-4A3.

B) Fração acetato de etila (GGAc)

A fração acetato de etila de *Griffinia gardneriana* (GGAc) (4,5035 g) foi submetida à uma CC utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel AcOEt/MeOH/CH₂Cl₂ (3:2:1).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em 4 subfrações (Figura 17), das quais somente a fração GGAc-1 não apresentou resultado positivo para o reagente de Dragendorff.

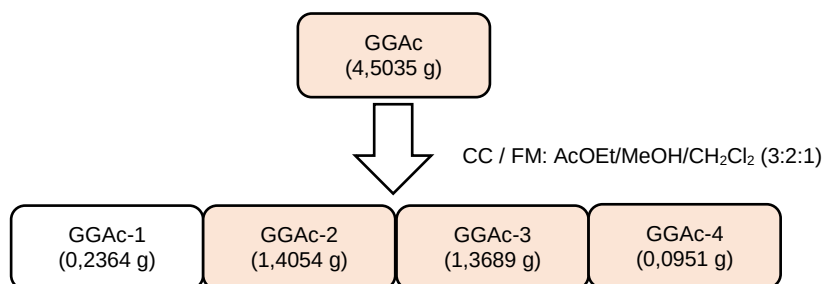


Figura 17. Fracionamento cromatográfico da fração GGAc.

B.1) Fração GGAc-2

A subfração GGAc-2 (1,4054 g) foi submetida a uma CC, utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel AcOEt/CHCl₃/Hex/MeOH (2:2:2:1).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em cinco subfrações (Figura 18), das quais apresentaram resultado positivo para o reagente de Dragendorff: GGAc-2B, GGAc-2C e GGAc-2D.

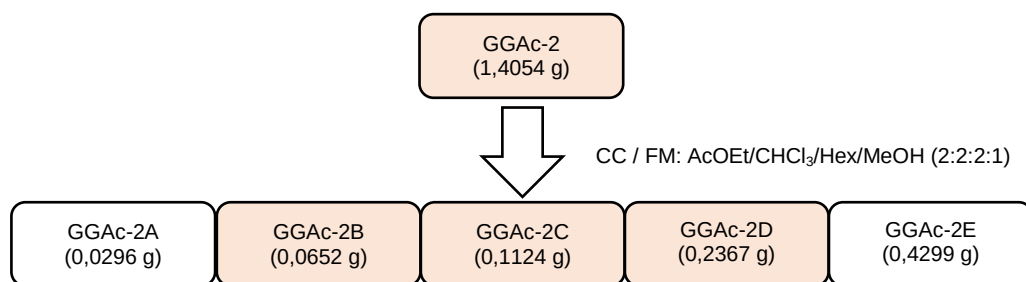


Figura 18. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2.

B.1.1) Subfração GGAc-2B

A subfração GGAc-2B (0,0652 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{Hex}/\text{MeOH}$ (5:2:2). Foram obtidas três novas subfrações: GGAc-2B1 (2,80 mg), GGAc-2B2 (2,50 mg) e GGAc-2B3 (3,00 mg) (Figura 19). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **licorina** (GGAc-2B2).

B.1.1.1) Subfração GGAc-2B2

A subfração GGAc-2B2 foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **licorina (1,50 mg)**.

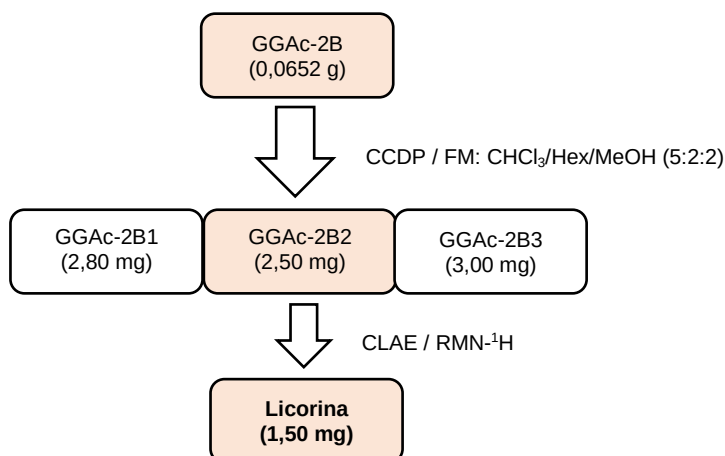


Figura 19. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2B.

B.1.2) Subfração GGAc-2C

A subfração GGAc-2C (0,1124 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3/\text{Hex}/\text{MeOH}$ (2:2:2:3). Foram obtidas três novas subfrações: GGAc-2C1 (4,50 mg), GGAc-2C2 (12,40 mg) e GGAc-2C3 (4,80 mg) (Figura 20).

Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **licorina** (GGAc-2C1).

B.1.2.1) Subfração GGAc-2C1

A subfração GGAc-2C1 foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **licorina (2,50 mg)**.

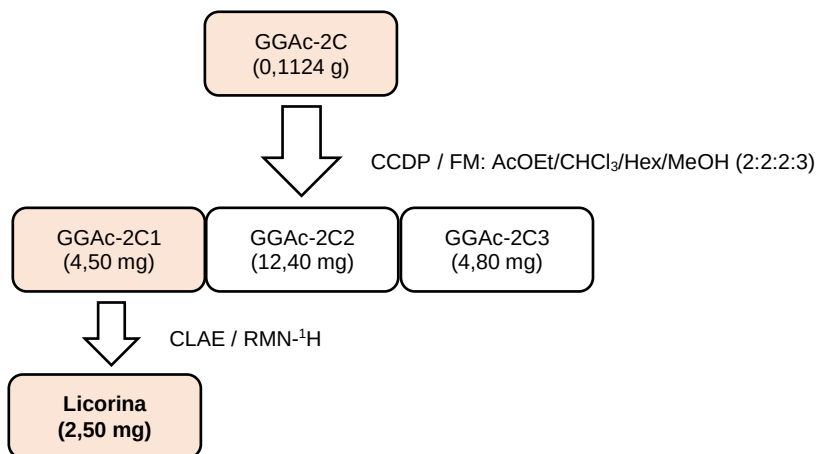


Figura 20. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2C.

B.1.3) Subfração GGAc-2D

A subfração GGAc-2D (0,2367 g) foi submetida a uma CC, utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel AcOEt/Hex/Me₂CO/MeOH (3:1:1:1).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em quatro subfrações (Figura 21), das quais apenas a fração GGAc-2D1 apresentou resultado positivo para o reagente de Dragendorff.

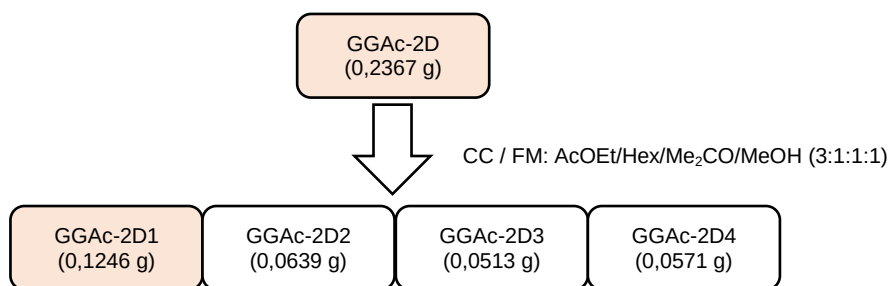


Figura 21. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2D.

B.1.3.1) Subfração GGAc-2D1

A subfração GGAc-2D1 (0,1246 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex/MeOH (3:1:1). Foram obtidas quatro novas subfrações: GGAc-

2D1A (4,00 mg), GGAc-2D1B (3,00 mg), GGAc-2D1C (3,10 mg) e GGAc-2D1D (3,00 mg) (Figura 22). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **licorina** (GGAc-2D1A).

B.1.3.1.1) Subfração GGAc-2D1A

A subfração GGAc-2D1A foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **licorina** (2,20 mg).

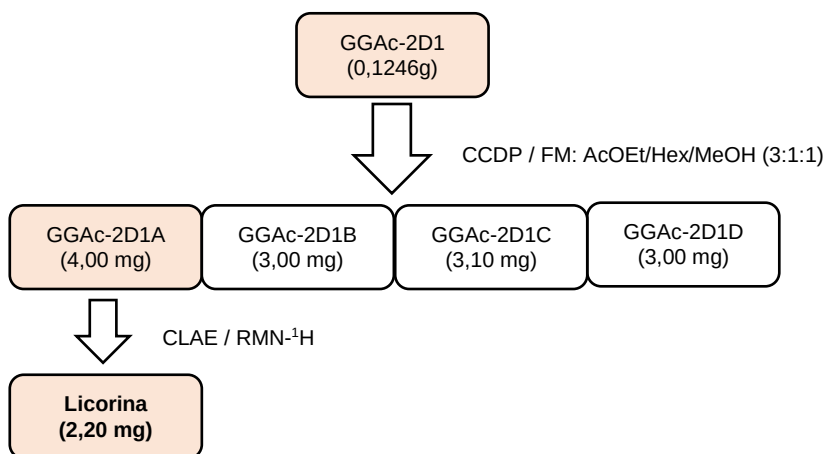


Figura 22. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-2D1.

B.2) Fração GGAc-3

A subfração GGAc-3 (1,3689 g) foi submetida a uma CC, utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel AcOEt/ CH_2Cl_2 /MeOH (2:1:1). As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em três subfrações (Figura 23). Destas, apenas GGAc-3A apresentou resultado negativo para o reagente de Dragendorff.

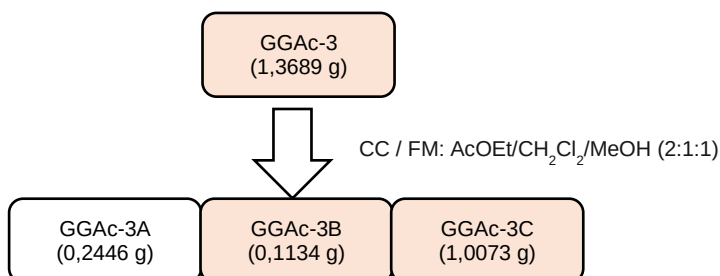


Figura 23. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3.

B.2.1) Subfração GGAc-3B

A subfração GGAc-3B (0,1134 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex/Me₂CO/MeOH (3:1:1:1). Foram obtidas três novas subfrações: GGAc-3B1 (49,60 mg), GGAc-3B2 (8,90 mg) e GGAc-3B3 (4,40 mg) (Figura 24). Estes produtos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina** (GGAc-3B2).

B.2.1.1) Subfração GGAc-3B2

A subfração GGAc-3B2 foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina** (7,70 mg).

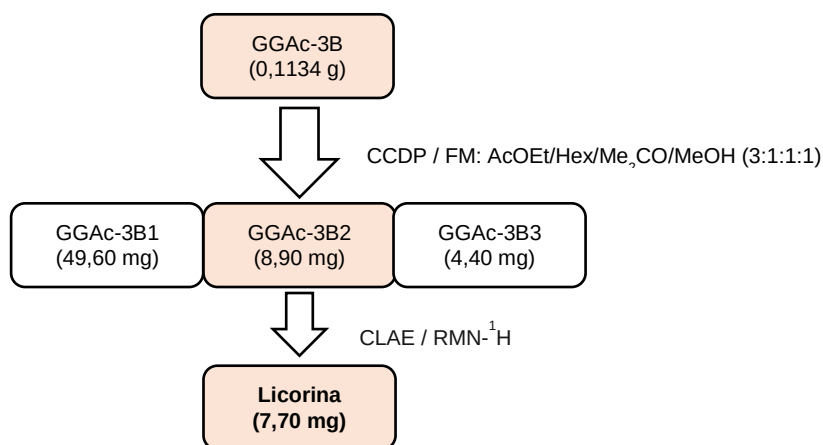


Figura 24. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3B.

B.2.2) Subfração GGAc-3C

A subfração GGAc-3C (1,0073 g) foi submetida à uma nova CC, utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel CHCl₃/Hex/MeOH (5:2:2).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em quatro subfrações (Figura 25).

Destas, somente GGAc-3DEF2 apresentou resultado positivo para o reagente de Dragendorff.

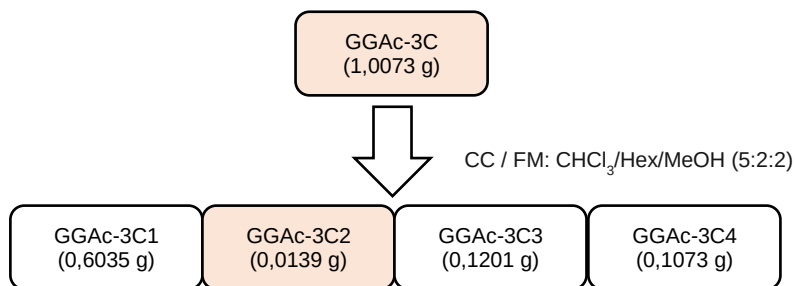


Figura 25. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3C.

B.2.2.1) Subfração GGAc-3C2

A subfração GGAc-3C2 (0,0139 g) foi submetida a uma *CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex/Me₂CO/MeOH (3:1:1:2). Foram obtidas quatro novas subfrações: GGAc-3C2A (2,30 mg), GGAc-3C2B (1,20 mg), GGAc-3C2C (2,80 mg) e GGAc-3C2D (2,20 mg) (Figura 26). Estes produtos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina** (GGAc-3C2A). *Para a CCDP foi utilizada placa de CCD de dimensões 10 x 10 cm.

B.2.2.1.1) Subfração GGAc-3C2A

A subfração GGAc-3C2A foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina (1,00 mg)**.

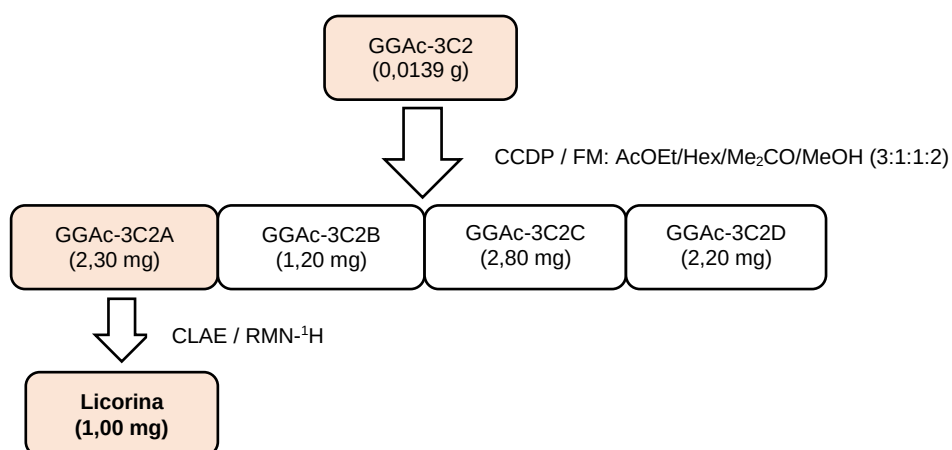


Figura 26. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-3C2.

B.3) Fração GGAc-4

A subfração GGAc-4 (0,0951 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex/Me₂CO/CH₂Cl₂/MeOH (2:3:1:1:1). Foram obtidas quatro novas subfrações: GGAc-4A (11,20 mg), GGAc-4B (3,50 mg), GGAc-4C (4,00 mg) e GGAc-

4D (2,50 mg) (Figura 27). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **sanguinina** (GGAc-4B).

B.3.1) Subfração GGAc-4B

A subfração GGAc-3DEF2A foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **sanguinina** (1,70 mg).

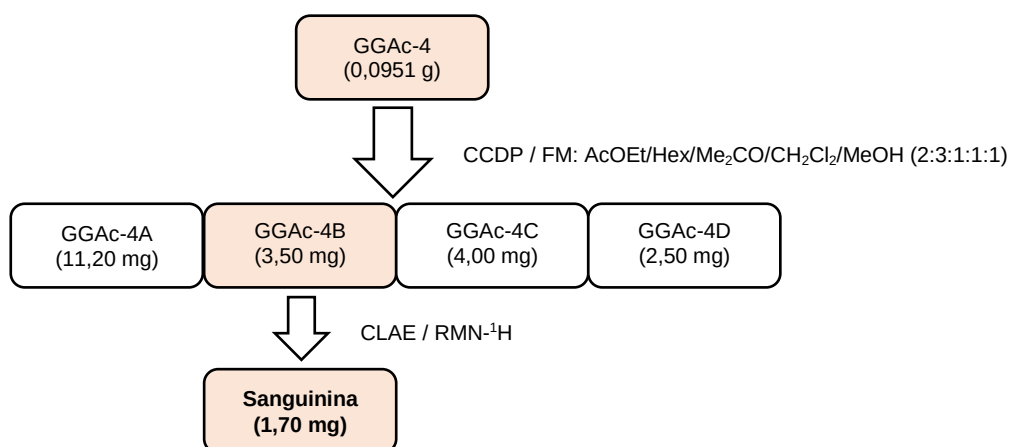


Figura 27. Fracionamento cromatográfico da subfração GGAc-4.

C) Fração acetato de etila/metanol (3:1) (GGAcM)

A fração acetato de etila/metanol (3:1) de *Griffinia gardneriana* (GGAcM) (0,2562 g) foi analisada por CG-EM, não apresentando indícios de alcaloides. A mesma apresentou sucessivos resultados negativos frente ao reagente de Dragendorff, e, em um segundo momento, com o reagente de Mayer. Desta forma não foi trabalhada.

D) Fração acetato de etila ácido (GGFAA)

A fração acetato de etila ácido de *Griffinia gardneriana* (GGFAA) (1,7043 g) apresentou resultado positivo para o reagente de Dragendorff, sendo submetida à uma CC utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel Hex/AcOEt/CH₂Cl₂/Me₂CO/MeOH (3:2:1:1:1). As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em quatro subfrações (Figura 28). Destas, apenas a subfração GGFAA-3 apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff.

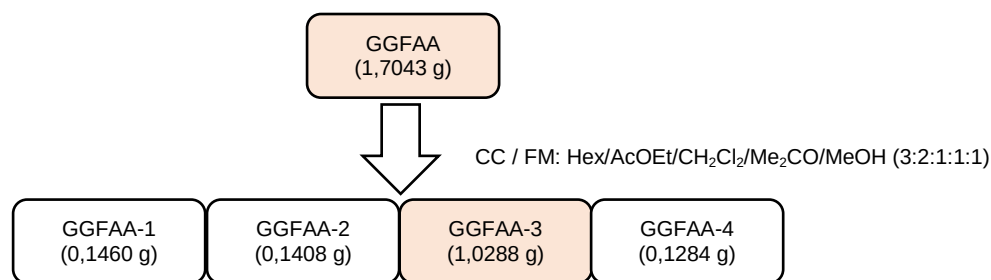


Figura 28. Fracionamento cromatográfico da fração GGFAA.

A subfração GGFAA-3 (1,0288 g) foi então submetida à uma nova CC, utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel Hex/AcOEt/CH₂Cl₂/Me₂CO/MeOH (4:2:1:1:2). As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em cinco subfrações, das quais somente GGFAA-3C e GGFAA-3E apresentaram resultado positivo para o reagente de Dragendorff (Figura 29).

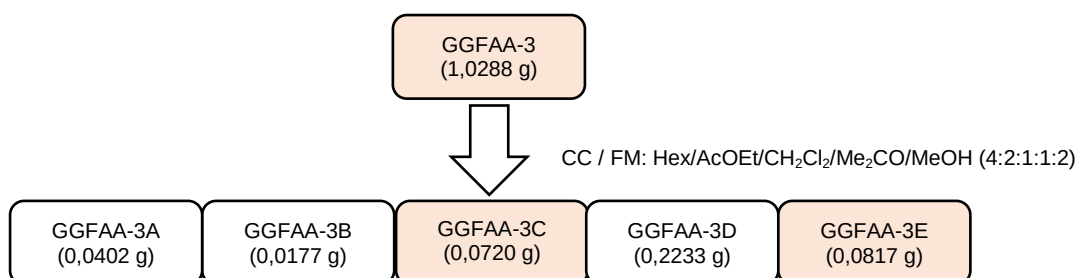


Figura 29. Fracionamento cromatográfico da subfração GGFAA-3.

D.1) Fração GGFAA-3C

A subfração GGFAA-3C (0,0720 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel Hex/AcOEt/Me₂CO/CH₂Cl₂/MeOH (3:2:1:1:4). Foram obtidas duas novas subfrações: GGFAA-3C1 (12,70 mg) e GGFAA-3C2 (5,90 mg) (Figura 30). Estes produtos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina** (GGFAA-3C1).

D.1.1) Subfração GGFAA-3.4C1

A subfração GGFAA-3.4C1 foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **licorina** (11,40 mg).

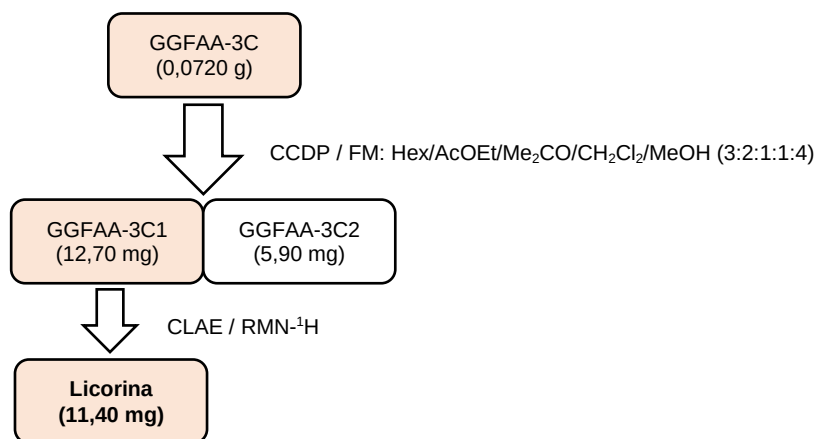


Figura 30. Fracionamento cromatográfico da subfração GGFAA-3.4C.

D.2) Fração GGFAA-3E

A subfração GGFAA-3E (0,0817 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel Hex/AcOEt/Me₂CO/MeOH (3:2:2:1). Foram obtidas quatro novas subfrações: GGFAA-3E1 (6,50 mg), GGFAA-3E2 (5,60 mg), GGFAA-3E3 (4,80 mg) e GGFAA-3E4 (3,20 mg) (Figura 31). Estes produtos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **pretazetina** (GGFAA-3E3).

D.2.1) Subfração GGFAA-3E3

A subfração GGFAA-3.4E3 foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **pretazetina** (3,40 mg).

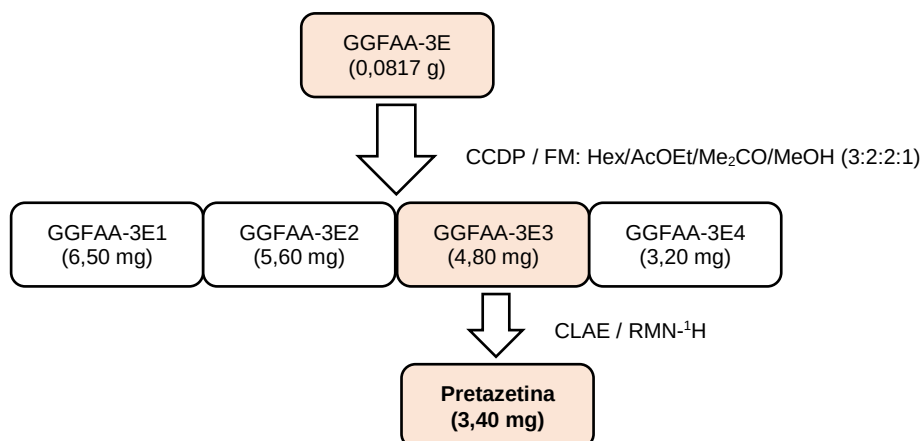


Figura 31. Fracionamento cromatográfico da subfração GGFAA-3E.

4.5.2. *Habranthus itaobinus*

A) Fração *n*-hexano (HIHex)

A fração *n*-hexano de *Habranthus itaobinus* (HIHex) (0,7231 g) foi submetida à uma CC utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel CH₂Cl₂/Me₂CO/Hex/MeOH (2:1:2:1).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em cinco subfrações (Figura 32). Destas, apresentaram resultado positivo para o reagente de Dragendorff: HIHex-1, HIHex-2, HIHex-4 e HIHex-5.

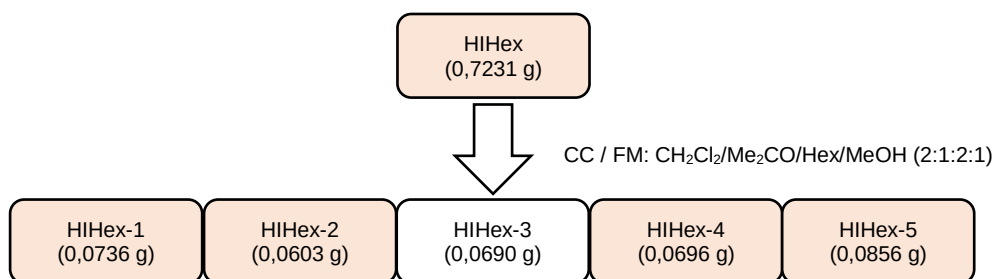


Figura 32. Fracionamento cromatográfico da fração HIHex.

A.1) Fração HIHex-1

A subfração HIHex-1 (0,0736 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex (1:1). Foram obtidas quatro novas subfrações: HIHex-1A (6,30 mg), HIHex-1B (6,70 mg), HIHex-1C (11,00 mg) e HIHex-1D (9,00 mg) (Figura 33). Estes produtos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **trisfaeridina** (HIHex-1C).

A.1.1) Subfração HIHex-1C

A subfração HIHex-1C foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ¹H, sendo isolado o composto **trisfaeridina** (9,50 mg).

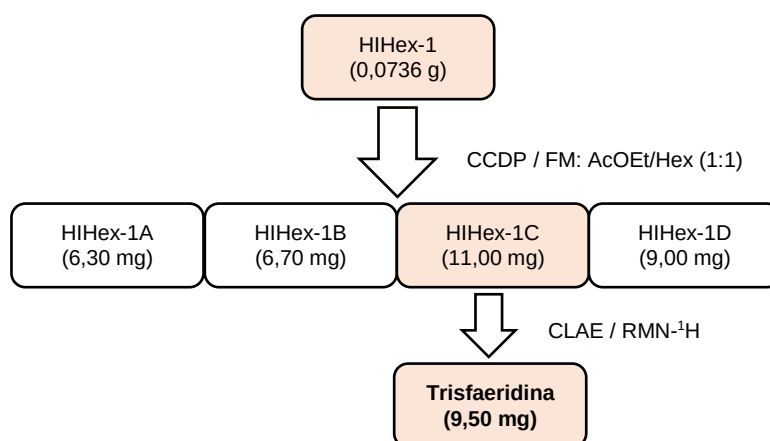


Figura 33. Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-1.

A.2) Fração HIHex-2

A subfração HIHex-2 (0,0603 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$ (5:5:2). Foram obtidas quatro novas subfrações: HIHex-2A (3,30 mg), HIHex-2B (0,50 mg), HIHex-2C (16,00 mg) e HIHex-2D (0,90 mg) (Figura 34). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **tazetina** (HIHex-2C), sendo necessária, porém, a purificação por CLAE.

A.2.1) Subfração HIHex-2C

A subfração HIHex-2C foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **tazetina** (6,80 mg).

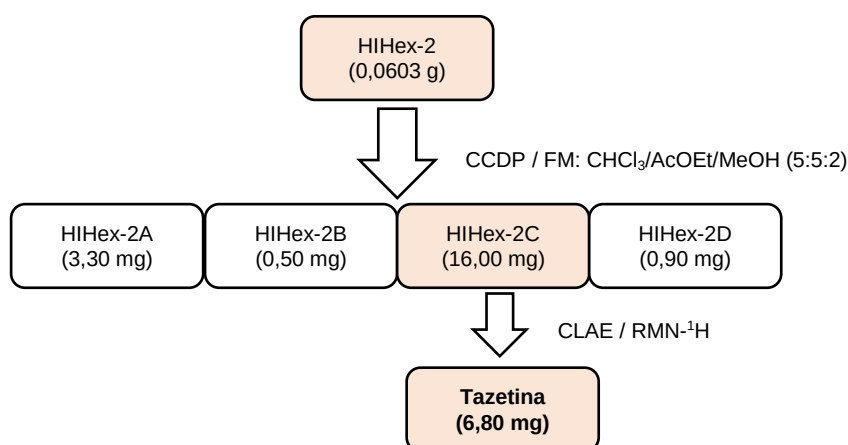


Figura 34. Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-2.

A.3) Fração HIHex-4

A subfração HIHex-4 (0,0696 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{Me}_2\text{CO}/\text{Hex}/\text{MeOH}$ (2:1:1:2). Foram obtidas cinco novas

subfrações: HIHex-4A (3,00 mg), HIHex-4B (1,80 mg), HIHex-4C (5,10 mg), HIHex-4D (0,50 mg) e HIHex-4E (0,30 mg) (Figura 35). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **pretazetina** (HIHex-4C).

A.3.1) Subfração HIHex-4C

A subfração HIHex-4C foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **pretazetina** (4,00 mg).

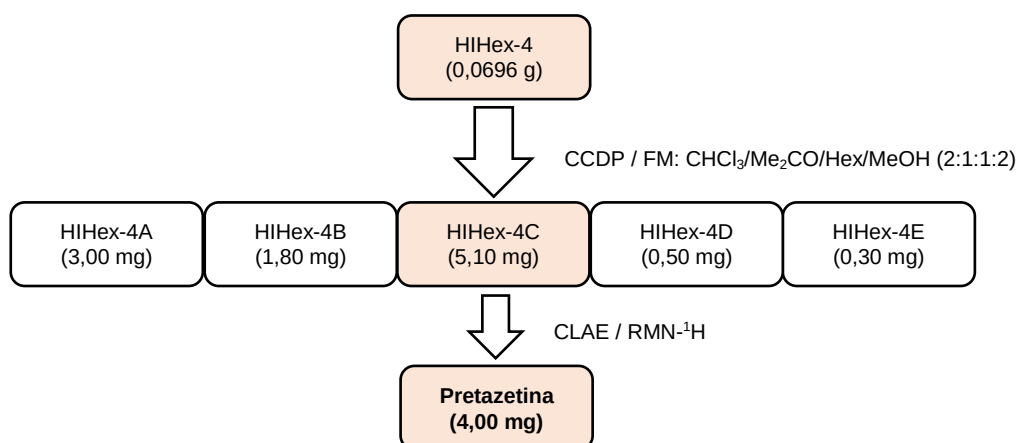


Figura 35. Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-4.

A.4) Fração HIHex-5

A subfração HIHex-5 (0,0856 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/MeOH (9:1). Foram obtidas três novas subfrações: HIHex-5A (0,70 mg), HIHex-5B (12,60 mg) e HIHex-5C (4,70 mg) (Figura 36). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (HIHex-5B), sendo necessária, porém, a purificação por CLAE.

A.4.1) Subfração HIHex-5B

A subfração HIHex-5B foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (6,60 mg).

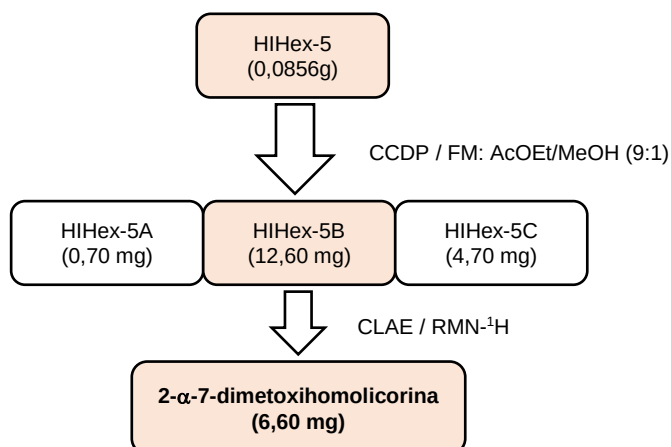


Figura 36. Fracionamento cromatográfico da subfração HIHex-5.

B) Fração acetato de etila (HIAC)

A fração acetato de etila de *Habranthus itaobinus* (HIAC) (0,8903 g) foi submetida à uma CC utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{Hex}/\text{MeOH}$ (2:1:2:1).

As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em 6 subfrações (Figura 37), das quais somente as subfrações HIAC-3 e HIAC-5 apresentaram-se negativas frente ao reagente de Dragendorff.

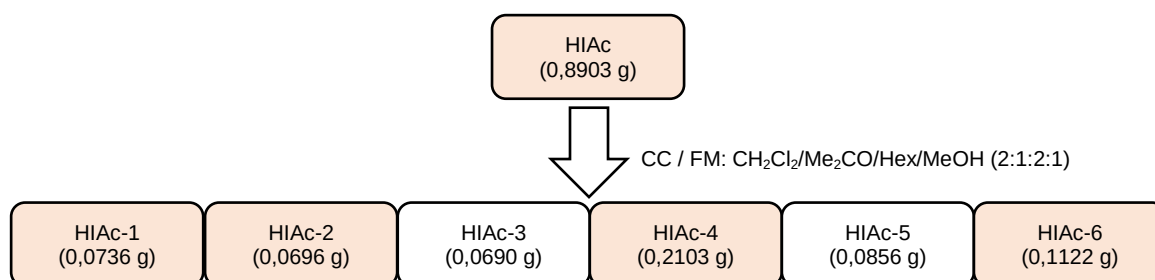


Figura 37. Fracionamento cromatográfico da fração HIAC.

B.1) Fração HIAC-1

A subfração HIAC-1 (0,0736 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{Hex}/\text{MeOH}$ (4:2:4:1). Foram obtidas quatro novas subfrações (Figura 38): HIAC-1A (4,40 mg), HIAC-1B (7,60 mg), HIAC-1C (4,70 mg) e HIAC-1D (14,80 mg). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **trisfaeridina** (HIAC-1D), sendo necessária, porém, a purificação por CLAE.

B.1.1) Subfração HIAC-1D

A subfração HIAC-1D foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **trisfaeridina (10,90 mg)**.

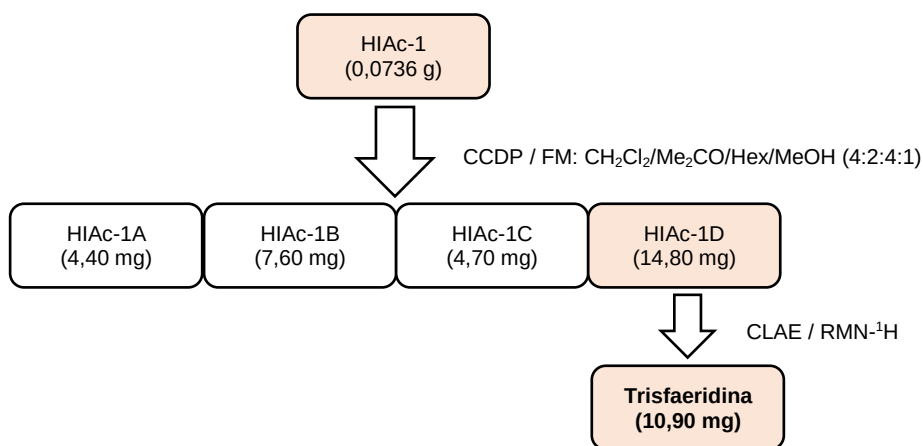


Figura 38. Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-1.

B.2) Fração HIAC-2

A subfração HIAC-2 (0,0696 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{Me}_2\text{CO}$ (5:4). Foram obtidas quatro novas subfrações (Figura 39): HIAC-2A (10,10 mg), HIAC-2B (25,40 mg), HIAC-2C (5,80 mg) e HIAC-2D (9,20 mg). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **tazetina (HIAC-2C)**.

B.2.1) Subfração HIAC-2C

A subfração HIAC-2C foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **tazetina (4,30 mg)**.

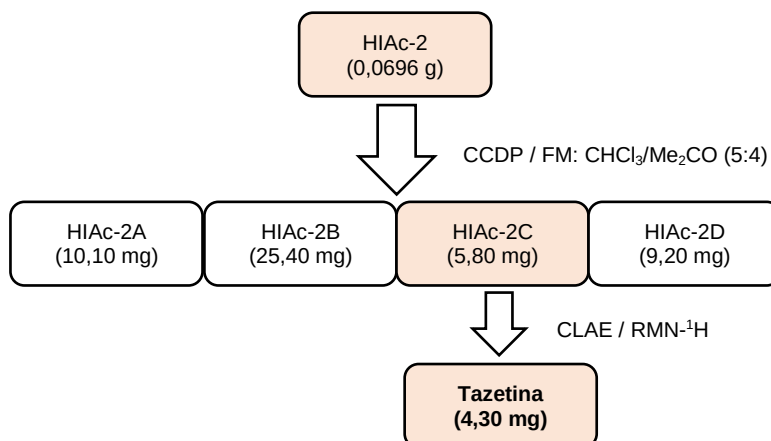


Figura 39. Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-2.

B.3) Fração HIAC-4

A subfração HIAC-4 (0,2103 g) foi submetida à uma CC utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{Hex}/\text{MeOH}$ (4:2:3:2). As frações coletadas foram reunidas por similaridade, através de CCD, resultando em cinco subfrações (Figura 40). Destas, somente a subfração HIAC-4D apresentou-se positiva frente ao reagente de Dragendorff.

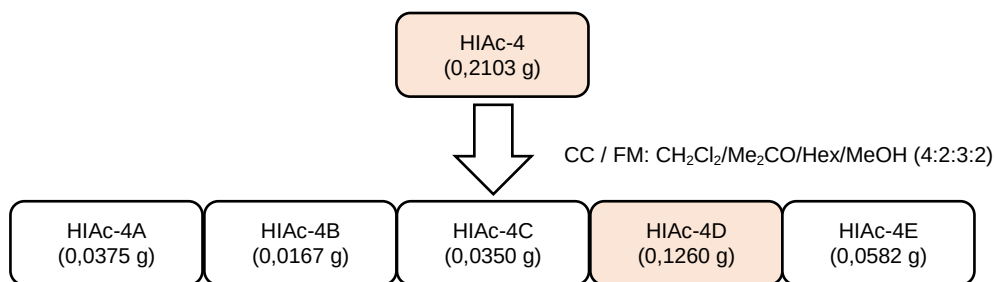


Figura 40. Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-4.

B.3.1) Subfração HIAC-4D

A subfração HIAC-4D (0,1260 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel $\text{AcOEt}/\text{Me}_2\text{CO}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5:1:1:3). Foram obtidas quatro novas subfrações (Figura 41): HIAC-4D1 (5,70 mg), HIAC-4D2 (3,90 mg), HIAC-4D3 (2,50 mg) e HIAC-4D4 (3,90 mg). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **11-hidroxitatina** (HIAC-4D3).

B.3.1.1) Subfração HIAC-4D3

A subfração HIAC-4D3 foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **11-hidroxitatina (1,50 mg)**.

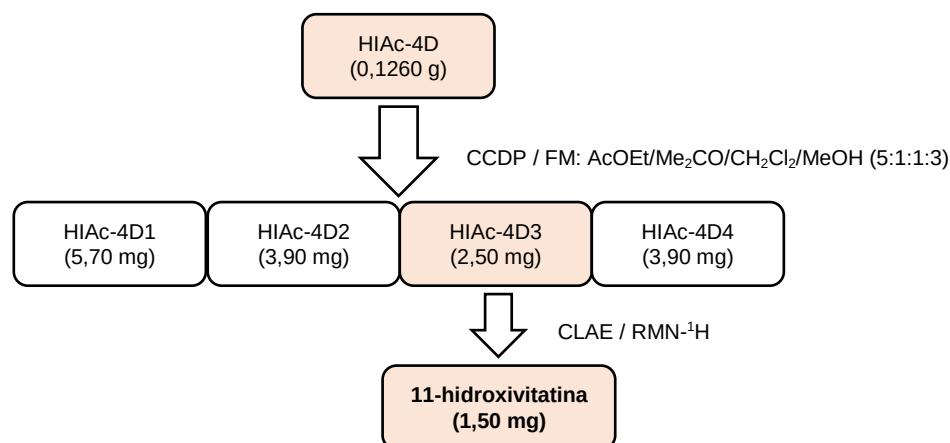


Figura 41. Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-4D.

B.4) Fração HIAC-6

A subfração HIAC-6 (0,1122 g) foi submetida a uma CCDP, utilizando como fase móvel AcOEt/Hex/MeOH (1:1:1). Foram obtidas quatro novas subfrações (Figura 42): HIAC-6A (4,00 mg), HIAC-6B (3,90 mg), HIAC-6C (7,70 mg) e HIAC-6D (1,60 mg). Estes produtos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **pretazetina** (HIAC-6C).

B.4.1) Subfração HIAC-6C

A subfração HIAC-6C foi submetida à técnica de CLAE e os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H , sendo isolado o composto **pretazetina** (6,20 mg).

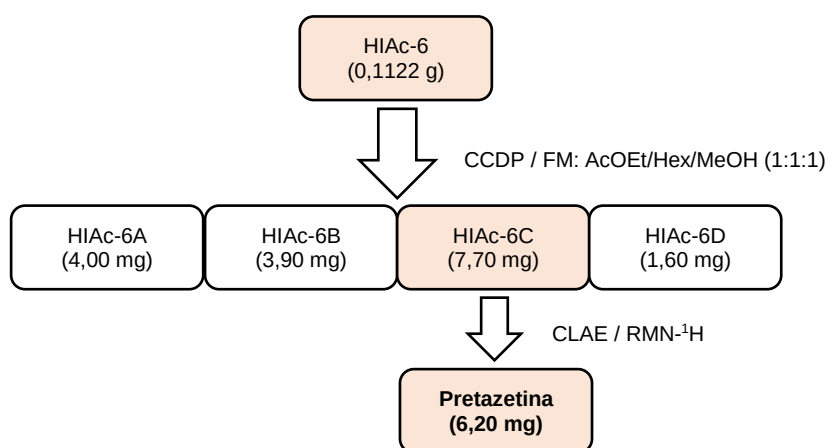


Figura 42. Fracionamento cromatográfico da subfração HIAC-6.

C) Fração acetato de etila/metanol (3:1) (HIAcM)

A fração acetato de etila/metanol (3:1) de *Habranthus itaobinus* (HIAcM) (0,3745 g) foi analisada por CG-EM, não apresentando indícios de alcaloides. A mesma apresentou sucessivos resultados negativos frente ao reagente de Dragendorff, e, em um segundo momento, com o reagente de Mayer. Desta forma, não foi trabalhada.

D) Fração acetato de etila ácido (HIFAA)

A fração acetato de etila ácido de *Habranthus itaobinus* (HIFAA) (0,2545 g) apresentou sucessivos resultados negativos frente ao reagente de Dragendorff, e, em um segundo momento, com o reagente de Mayer. Desta forma, não foi trabalhada.

4.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

De posse dos dados de CG-EM das frações enriquecidas, foram feitos alguns testes de citotoxicidade (MTT) a fim de buscar uma possível relação entre a ação biológica destas frações, caso exista, e a sua composição química.

Posteriormente, procede-se aos ensaios biológicos com os alcaloides isolados, avaliando-se a citotoxicidade (MTT) e genotoxicidade (Micronúcleo) dos mesmos, assim como o papel da caspase-3 como mediador do fenômeno apoptótico, sendo estes ensaios precedidos por estudos de *docking* molecular a fim de buscar correlação dos resultados teóricos com os resultados práticos do experimento.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Vila Velha.

4.6.1. Citotoxicidade celular

4.6.1.1. Ensaio do MTT

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a citotoxicidade celular foi o método colorimétrico do MTT. O MTT é reduzido a formazan (precipitado de coloração violeta), pela succinato desidrogenase mitocondrial (Figura 43), uma enzima que é ativa em células com o metabolismo da cadeia respiratória intacto (MOSMANN, 1983). Assim, o formazan é quantificado espectrofotometricamente e possui correlação direta com o número de células viáveis.

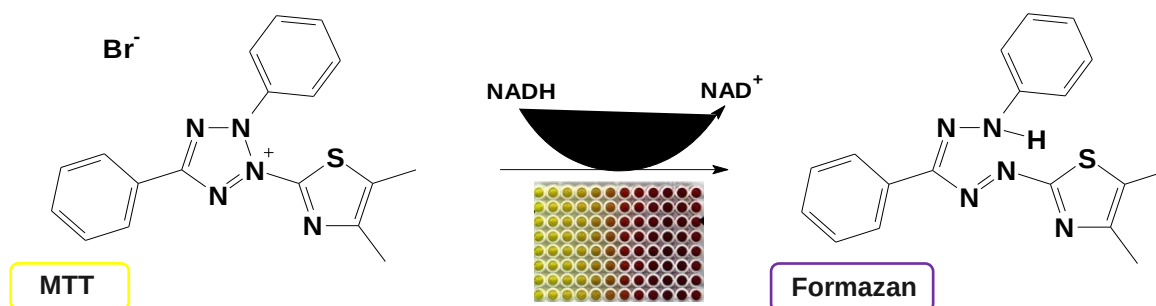


Figura 43. Reação de redução do ensaio do MTT.

Na avaliação da citotoxicidade das frações enriquecidas, foi adotado o seguinte procedimento:

As linhagens celulares OVCAR-3, J774 e L929 ($190 \mu\text{L}$ da suspensão celular) foram semeadas em placa de 96 poços, estéril, na concentração de $5 \cdot 10^4$ células. mL^{-1} para adesão; em seguida foram adicionados $10 \mu\text{L}$ das amostras selecionadas para teste (concentrações de $40,0$ a $1,71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) para determinação do CI_{50} . A microplaca foi incubada a 37°C , $5\% \text{CO}_2$, por 24h .

Após esse intervalo, adicionou-se $10 \mu\text{L}$ de solução de MTT ($5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) diluído em DMEM e a placa foi incubada novamente por 4h . O meio foi descartado e em seguida foram acrescentados $150 \mu\text{L}$ de isopropanol acidificado com HCl a $0,04 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, para solubilizar os cristais formados pela degradação dos anéis de tetrazólio, e procedeu-se a leitura a 595nm em leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190, EUA).

Como controle positivo, foi utilizada a camptotecina na concentração final de $10 \mu\text{M}$. Para controle negativo foi utilizado meio de cultura com células não tratadas. As análises foram realizadas em triplicata. A CI_{50} foi calculada através do *software Table Curve 2D* (AISN Software, USA).

Já a avaliação da citotoxicidade dos alcaloides isolados adotou o seguinte procedimento:

As linhagens celulares L929, HepG2 e MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços de fundo plano a uma concentração de $2 \cdot 10^4$ células. mL^{-1} para adesão, por 24h a 37°C em atmosfera umidificada (5% de CO_2). Após adesão, as células foram tratadas com os alcaloides isolados nas concentrações de $50,0$ a $0,39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para determinação do CI_{50} , sendo então incubadas por mais 24h . A camptotecina ($10 \mu\text{M}$) foi usada como controle positivo. Após incubação, $100 \mu\text{L}$ de MTT ($5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em PBS $1:3$) foram adicionados à placa seguida de incubação por mais 2h . Posteriormente, o

excesso de MTT foi aspirado, e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 μL de DMSO. A absorbância proporcional ao número de células viáveis foi medida a 595 nm utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata. A CI_{50} foi calculada através do *software Table Curve 2D* (AISN Software, USA).

Os alcaloides que apresentaram citotoxicidade frente às células cancerosas foram selecionados para estudo de mecanismo de morte celular com as linhagens celulares A549 e MCF-7, com período de incubação de 72h (MOSMANN, 1983; RAVID et al., 2003; YIN et al., 2004). Este período de incubação foi preconizado para o teste de ativação de caspase-3 uma vez que linhagem celular A549 produz ceramidas (via ativação da enzima esfingomielinase neutra, nSMase) antes da ativação da cascata de morte celular e este processo demanda um período de tempo maior (RAVID et al., 2003) – as ceramidas promovem a apoptose em células A549 por um mecanismo que envolve a proteína JNK juntamente com BIM (KURINNA et al., 2004).

4.6.2. Avaliação das mutações cromossômicas pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese

Para determinação da formação de MNs foram usados frascos de cultura celular (25 cm^3) mantidos sob atmosfera umidificada e temperatura controlada (37°C) (HARA; MARIN-MORALES, 2017). As células (CHO-1-15) foram semeadas na densidade de $3.10^5.\text{mL}^{-1}$ (DELLA TORRE et al., 2011) e, após 24h de estabilização, foram expostas aos alcaloides na concentração da CI_{50} (previamente determinada por teste de citotoxicidade do MTT). PBS e mitomicina C (2,99 μM) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente (PIRNIA et al., 2002). Somente foram testados os alcaloides que se apresentaram citotóxicos no ensaio do MTT.

Após 3h de tratamento, as células foram lavadas com PBS e tratadas com Cyt B, na concentração de 6,25 μM . A mitomicina C foi utilizada sem Cyt B (OECD, 2010).

Após a adição de Cyt B, as células foram incubadas por mais 18h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,025%), submetidas à centrifugação (velocidade de 448xg, por 10 min.), transferidas para lâminas, fixadas e coradas com panótico, sendo a leitura realizada em microscópio óptico Olympus CX23 (1000x). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A determinação da genotoxicidade foi realizada através da análise da formação de MN, NBUDs e NPBs de acordo com a OECD (2010), cujas imagens são representadas na Figura seguinte:

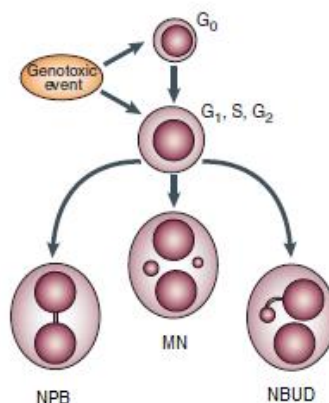


Figura 44. Alguns dos possíveis destinos de culturas celulares com citocinese bloqueada após exposição a agentes citotóxicos/genotóxicos: NPB, MN e NBUD.

Fonte: Adaptado de Fenech (2007).

Além destes parâmetros, foram avaliados: número de células bi e multinucleadas, índice de replicação e citotoxicidade relativa.

Estes constituem exemplos de alterações nucleares que envolvem as evidências de dano ao genoma das células analisadas.

Para cálculo de citotoxicidade relativa foram consideradas as contagens na ausência de Cyt B, definida como: **Contagem final de células tratadas/Contagem de células controle positivo (mitomicina C) x 100**, de acordo com Fowler et al. (2010) modificado.

4.6.3. Ensaios de *docking* molecular

As estruturas de todos os compostos foram construídas usando GaussView (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2008) e refinadas pela Teoria de Densidade Funcional (TDF) utilizando o parâmetro (B3LYP) (LEE; YANG; PARR, 1988; BECKE, 1988; BECKE, 1993) e implementadas no Gaussian 09W (FRISCH et al., 2009). Em seguida, os ligantes e o alvo molecular, o qual foi obtido no banco de dados de proteínas com o código 1PAU (ROTONDA et al., 1996), foram preparados usando o protocolo padrão do programa Autodock Tools e submetidos ao software Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010).

Uma caixa foi gerada com espaçamento de 1 Å e coordenadas para x, y, z de 16, 10 e 10 Å, respectivamente. O centro do ligante na proteína foi determinado pelos valores de x, y e z igual a 39,345, 95,974 e 22,343 Å, respectivamente. O inibidor cristalográfico de tetrapeptídeo foi redocado no sítio da proteína 1PAU para validar a metodologia e, posteriormente, o acoplamento dos ligantes foi efetuado. Todas as simulações de docking foram realizadas com o termo "exaustividade" definido como 8 para obter resultados mais precisos. Os resíduos de água foram removidos. Os resultados foram descritos pelo software BIOVIA Discovery Studio Visualizer R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016).

A constante de inibição teórica, K_i , foi calculada usando equações termodinâmicas da seguinte forma:

$$(1) \Delta G = RT (\ln K_i)$$

$$(2) K_i = \exp (\Delta G/RT)$$

Onde, ΔG é a energia de ligação obtida dos resultados de *docking*, R é a constante universal dos gases perfeitos com valor de $1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ e T é a temperatura ambiente absoluta de 298,15 K.

4.6.4. Avaliação do nível de apoptose

A ativação da apoptose pela via das caspases foi determinada com o uso do kit colorimétrico Elisa (In-Cell Elisa Colorimetric Detection Kit, Thermofisher 62218), sendo utilizadas células A549 para este fim.

Brevemente, células A549 foram semeadas a uma placa de 96 poços para cultivo celular na densidade de $7.10^4.\text{mL}^{-1}$ e mantidas em estufa umidificada de 5% de CO_2 por 24h para permitir adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com os alcaloides na concentração da CI_{50} (previamente determinada por teste de citotoxicidade do MTT). PBS e mitomicina C ($14,95 \mu\text{M}$) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente (PIRNIA et al., 2002). Somente foram testados os alcaloides que se apresentaram citotóxicos no ensaio do MTT.

Incubou-se por 72h (RAVID et al., 2003) e, após esse período, a detecção colorimétrica da caspase-3 ativada foi determinada.

O ensaio consiste na detecção da caspase-3 pelo anticorpo monoclonal (primário) com subsequente captura deste, pelo anticorpo secundário HRP. Através desta ligação, a enzima HRP conjugada com o anticorpo secundário pode catalisar a

reação colorimétrica do substrato cromogênico que é adicionado à reação. A reação enzimática consiste na detecção do cromóforo *p*-nitroanilina (*p*NA) liberado após hidrólise do substrato cromogênico DEVD-*p*NA (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina), onde DEVD é a sequência de aminoácidos reconhecida pela caspase-3. A intensidade da reação é medida pela leitura da absorbância, em 405 nm, utilizando-se um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190, EUA). A determinação da atividade é realizada em comparação ao controle negativo.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.5. Processamento de dados e estatísticas

Os demais experimentos foram realizados em triplicata e os dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. Onde apropriado, foi realizada análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de médias *a posteriori* de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DE CG-EM

A análise de CG-EM revelou apenas o alcaloide licorina nas frações Hex e AcOEt de *Griffinia gardneriana*. Nas frações Hex e AcOEt de *Habranthus itaobinus* foram identificados cinco e quatro alcaloides, respectivamente; estas frações apresentaram quatro compostos que não tiveram padrão de fragmentação identificado pela biblioteca (dois compostos em cada fração). Tazetina foi o alcaloide mais abundante na fração Hex, enquanto licorina foi o mais abundante na fração AcOEt. Estes resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Dados de CG-EM das frações Hex, AcOEt e AcOEt/MeOH (3:1) de *G. gardneriana* e *H. itaobinus*.

<i>Griffinia gardneriana</i>				
BULBO Hex				
Alcaloides	TR	%	M ⁺	EM
Licorina	29,65	100,00	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
TOTAL		100,00		
BULBO AcOEt				
Alcaloides	TR	%	M ⁺	EM
Licorina	29,56	100,00	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
TOTAL		100,00		
BULBO AcOEt/MeOH (3:1)				
Alcaloides	TR	%	M ⁺	EM
--	--	--	--	--
TOTAL		--		
<i>Habranthus itaobinus</i>				
BULBO Hex				
Alcaloides	TR	%	M ⁺	EM
Ismina	21,99	2,48	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)
Trisfaeridina	22,29	15,54	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)
Galantindol	25,72	13,83	281(100)	280(7), 264(13), 263(17), 262(20), 252(15), 204(7), 1(14), 132(8)
Tazetina	28,07	62,22	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)
Licorina	29,57	3,01	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
TOTAL		100,00		
BULBO AcOEt				
Alcaloides	TR	%	M ⁺	EM
Ismina	22,30	5,67	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)
Tazetina	28,06	24,96	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)
Licorina	29,60	57,70	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
Galantindol	25,73	5,80	281(100)	280(7), 264(13), 263(17), 262(20), 252(15), 204(7), 1(14), 132(8)
TOTAL		100,00		
BULBO AcOEt/MeOH (3:1)				
Alcaloides	TR	%	M ⁺	EM
--	--	--	--	--
TOTAL		--		

Trata-se do primeiro estudo químico em alcaloides destas espécies.

Abaixo, nas Figuras 47 a 50, são apresentados os cromatogramas das frações Hex e AcOEt de *G. Gardneriana* e *H. itaobinus*, respectivamente.

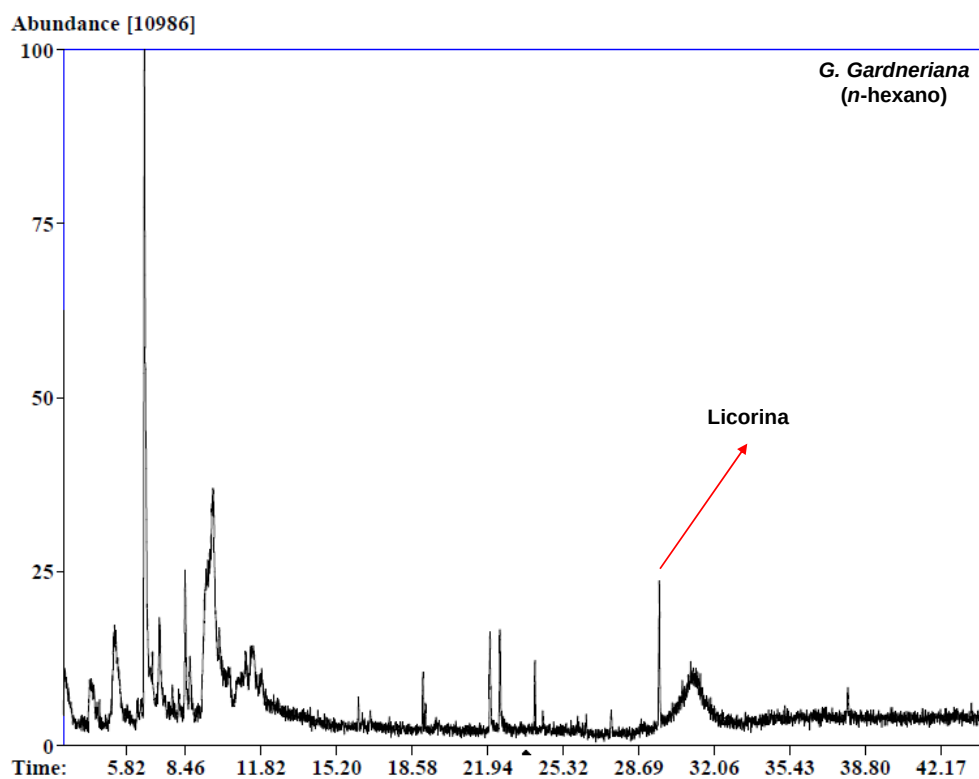


Figura 45. Cromatograma da fração *n*-hexano de *G. gardneriana*.

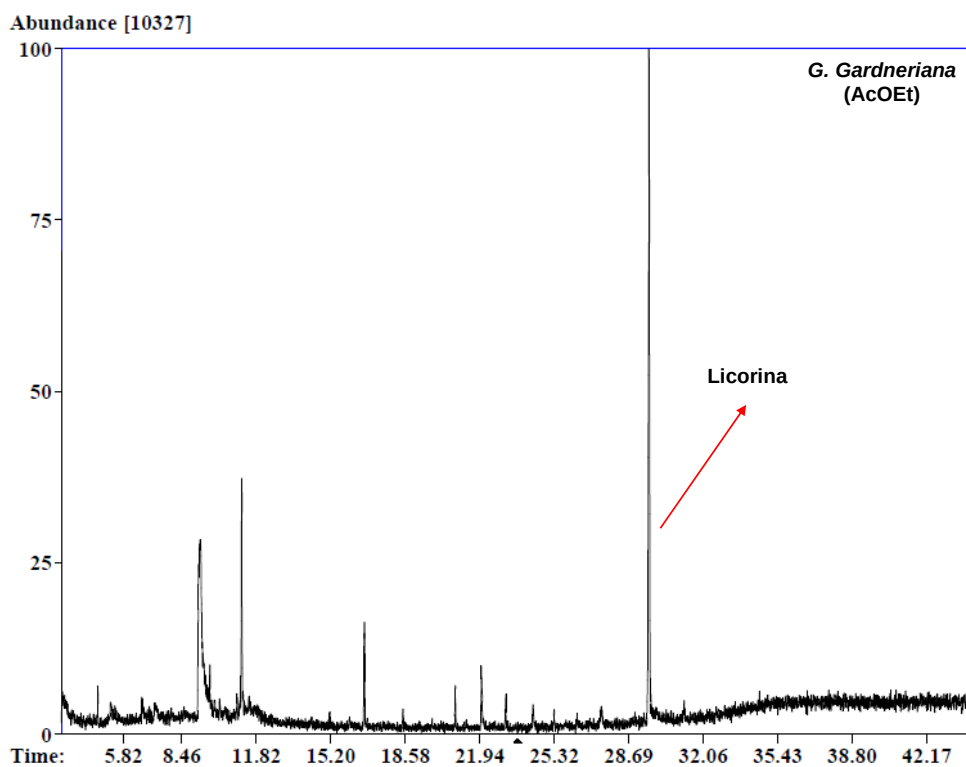


Figura 46. Cromatograma da fração acetato de etila de *G. gardneriana*.

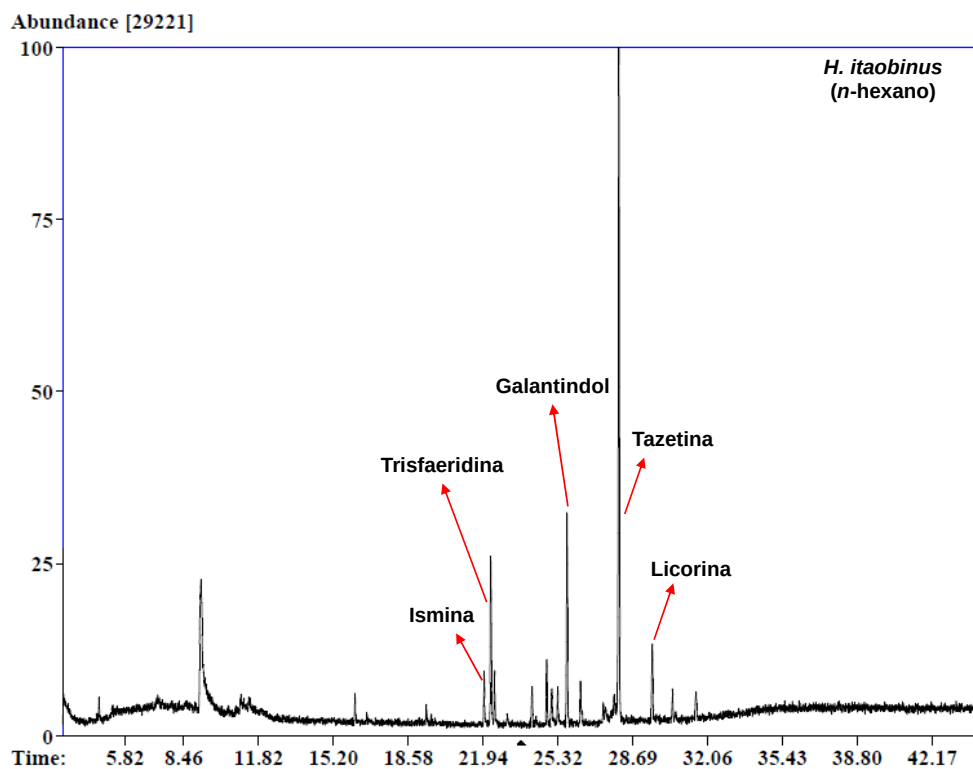


Figura 47. Cromatograma da fração *n*-hexano de *H. itaobinus*.

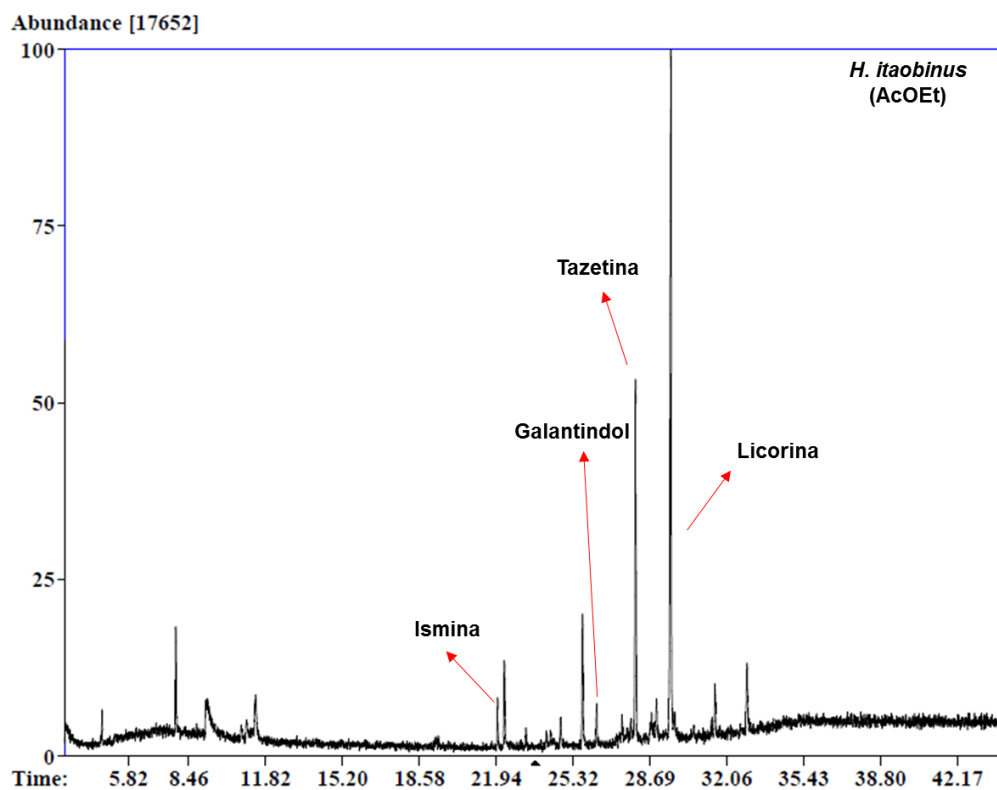


Figura 48. Cromatograma da fração acetato de etila de *H. itaobinus*.

Ao se estudar o teor de alcalóides de uma espécie é muito útil obter um perfil geral por CG-EM, tanto do extrato bruto quanto das frações dele derivadas. Além de fornecer informações sobre a presença de alcaloides conhecidos e possíveis novas estruturas, permite a análise de rendimento e perdas potenciais que podem surgir durante a aplicação das várias técnicas de isolamento. Durante os anos 60 e 70 foram realizados numerosos estudos de espectrometria de massas de impacto de elétrons de alcaloides de Amaryllidaceae, permitindo estabelecer padrões de fragmentação característicos para os vários tipos de esqueleto (DE ANDRADE, 2014).

Os espectros de massas dos alcaloides identificados, com seu respectivo íon molecular e pico base, estão relacionados nas Figuras 51, 53, 55, 56 e 57. Estes padrões de fragmentação coincidem com os relatados em outros trabalhos.

5.1.1. Licorina

O espectro de massas da licorina é apresentado na Figura 49:

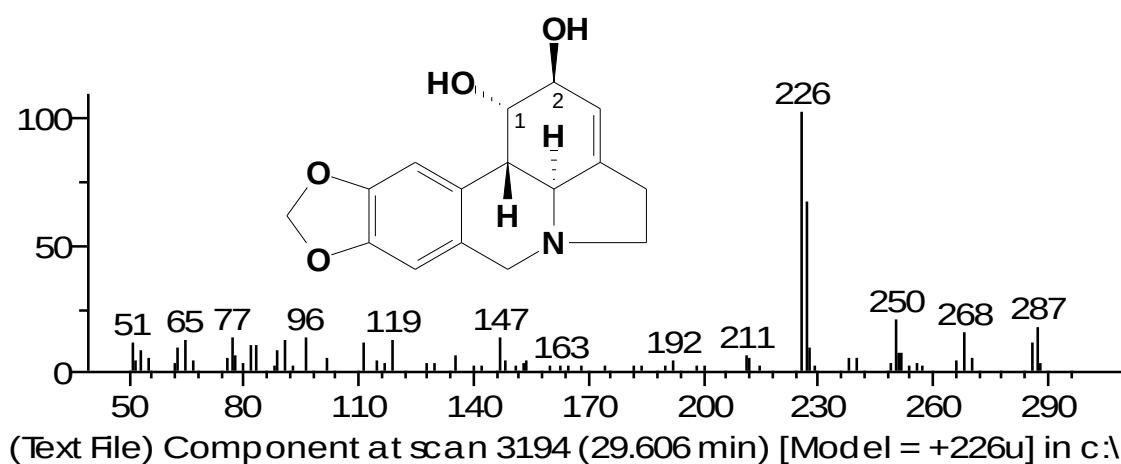


Figura 49. Espectro de massas do alcaloide licorina.

Na licorina, o íon molecular (m/z 287) sofre a perda de água, originando um pico de valor de m/z 269 que, com a perda de um radical hidrogênio origina o íon (m/z 268). Outra fragmentação inclui a perda de C-1 e C-2 com seus substituintes, através de uma reação de retro-Diels-Alder. Não se verifica perda de água nos espectros dos derivados acetilados. A facilidade da perda de água a partir do íon-molecular depende da estereoquímica do grupo hidroxila em C-2 (como ocorre com a licorina) (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

Este padrão de fragmentação descrito para a licorina é representado na Figura 50:

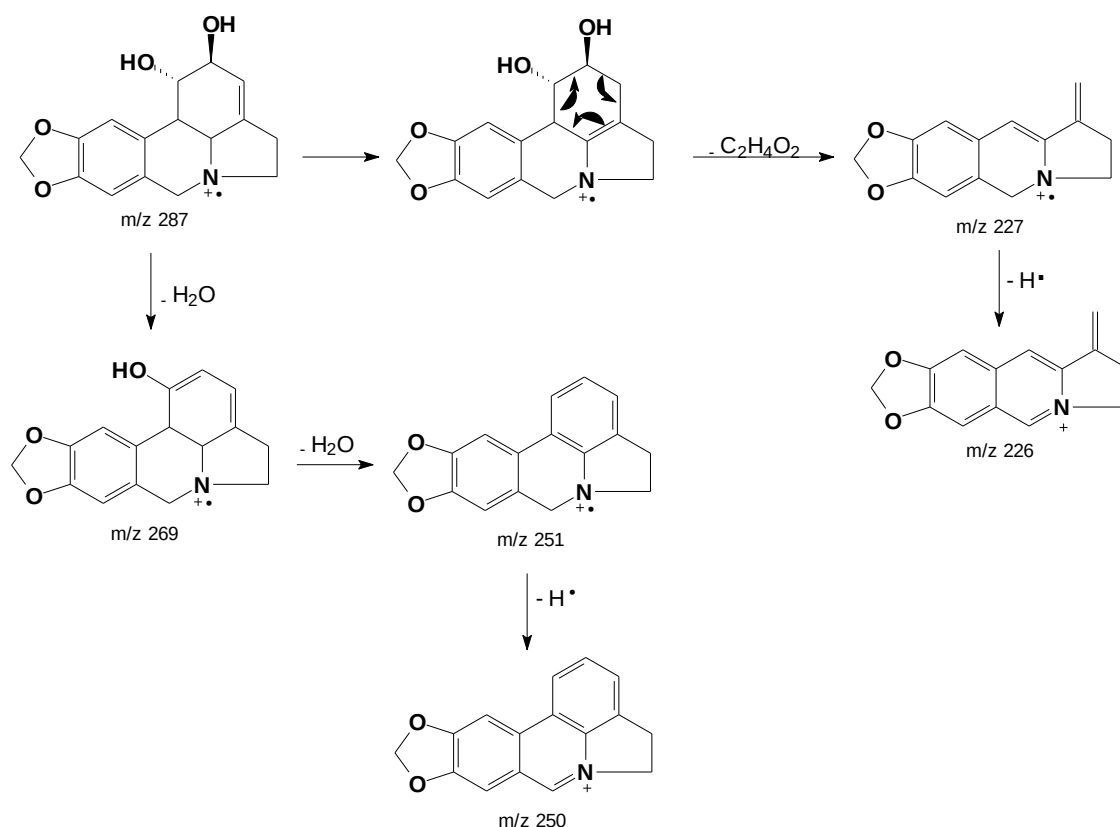


Figura 50. Padrão de fragmentação de alcaloides com esqueleto do tipo licorina.
Fonte: Bastida; Lavilla; Viladomat (2006).

5.1.2. Tazetina

O espectro de massas da tazetina é apresentado na Figura 51:

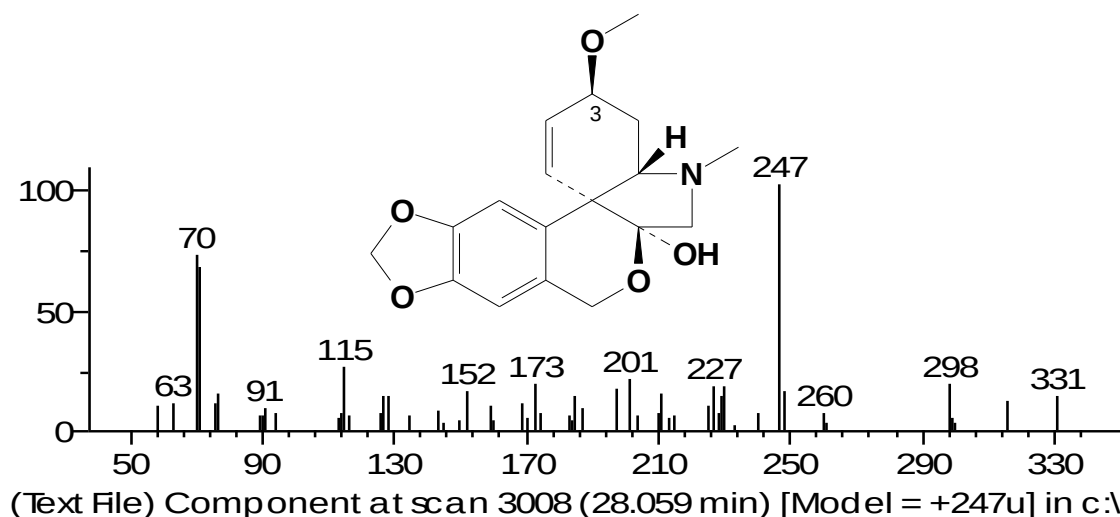


Figura 51. Espectro de massas do alcaloide tazetina.

Nos alcaloides do tipo tazetina, pequenas mudanças na estereoquímica são suficientes para causar diferenças apreciáveis nos estereoisômeros. Desta forma, no

espectro de massas da tazetina, com uma configuração β do grupo metoxila em C-3, o pico base ocorre em m/z $[M^+ - 84]$, após uma fragmentação do anel C por retro-Diels-Alder (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

No alcaloide tazetina, o íon-molecular e pico base ocorrem em m/z 331 e 247, respectivamente.

O padrão de fragmentação da tazetina é representado na Figura 52:

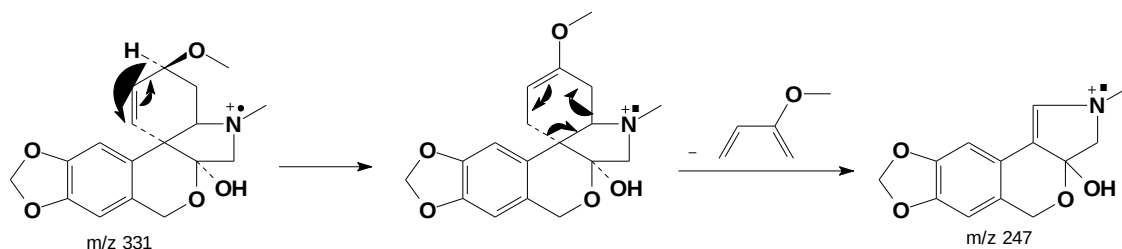


Figura 52. Padrão de fragmentação de alcaloides com esqueleto do tipo tazetina.

Fonte: Bastida; Lavilla; Viladomat (2006).

5.1.3. Ismina

O espectro de massas da ismina é apresentado na Figura 53:

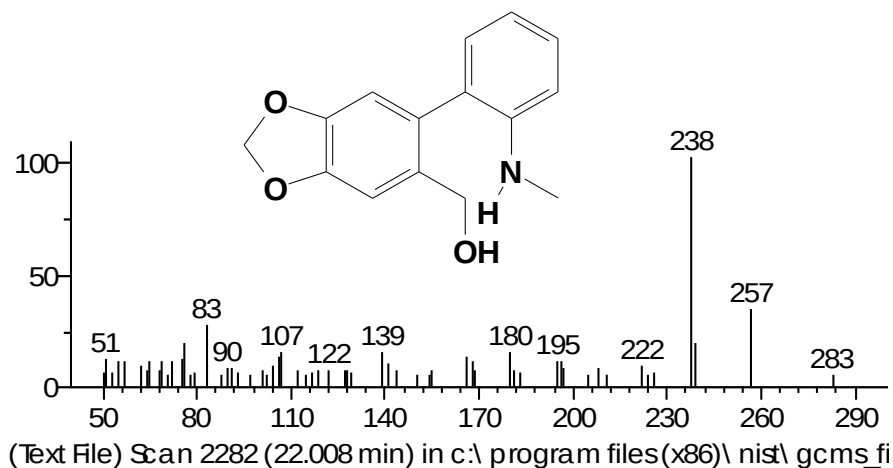


Figura 53. Espectro de massas do alcaloide ismina.

O alcaloide ismina, considerado um produto do catabolismo da série haemantamina, apresenta íon-molecular em m/z 257 e pico base em m/z 238.

5.1.4. Trisfaeridina

O espectro de massas da trisfaeridina é apresentado na Figura 54:

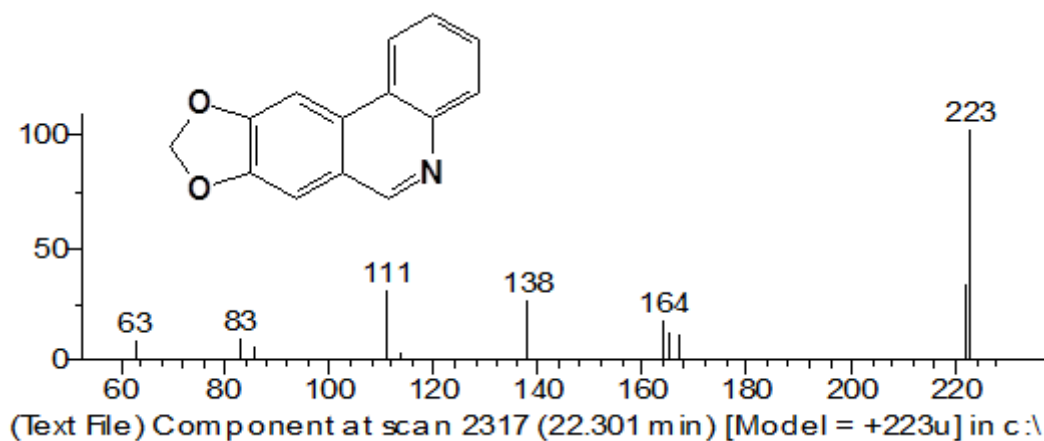


Figura 54. Espectro de massas do alcaloide trisfaeridina.

O alcaloide trisfaeridina, considerado um produto do catabolismo do esqueleto crinano, apresenta íon-molecular e pico base coincidentes em m/z 223.

5.1.5. Galantindol

O espectro de massas do galantindol é apresentado na Figura 55:

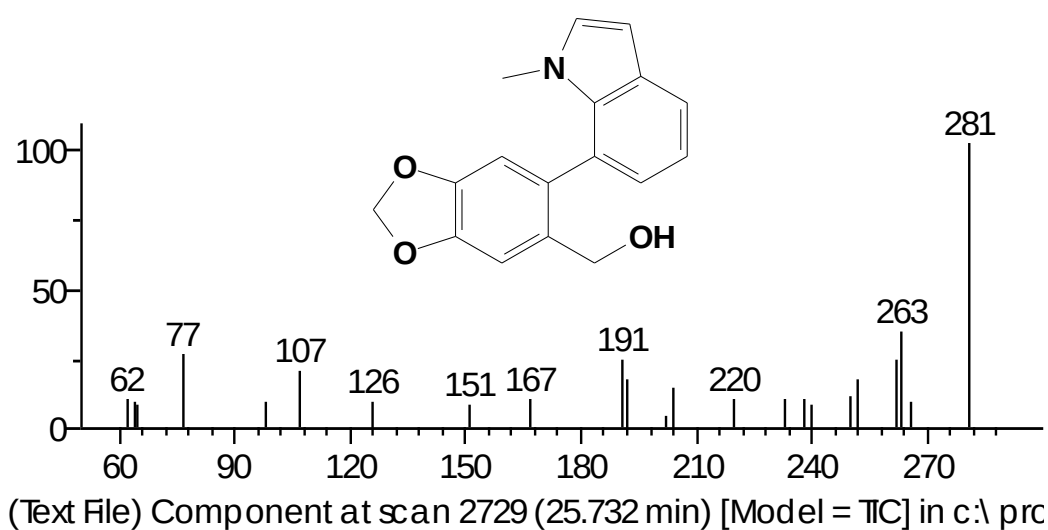


Figura 55. Espectro de massas do alcaloide galantindol.

No alcaloide galantindol o íon-molecular e o pico base coincidem em m/z 281.

5.2. ALCALOIDES ISOLADOS

Foram isolados sete alcaloides de Amaryllidaceae, todos devidamente identificados por comparação de resultados de RMN de ^1H com a literatura (Tabela 2).

Para alguns alcaloides foram utilizadas também técnicas bidimensionais de ressonância (gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC), juntamente com RMN de ^{13}C .

Tabela 2. Alcaloides isolados de *Griffinia gardneriana* e *Habranthus itaobinus*.

<i>Griffinia gardneriana</i>		
Alcaloide	Massa (mg)	Frações
Licorina	28,10	GGHex-4A3b, GGAc-2B2, GGAc-2C1, GGAc-2D1A, GGAc-3B2, GGAc-3C2A e GGFAA-3C1
Trisfaeridina	1,90	GGHex-4A3d
Sanguinina	1,70	GGAc-4B
Pretazetina	3,40	GGFAA-3E3
<i>Habranthus itaobinus</i>		
Alcaloide	Massa (mg)	Frações
Tazetina	11,30	HIHex-2C e HIAC-2C
Pretazetina	10,20	HIHex-4C e HIAC-6C
Trisfaeridina	20,40	HIHex-1C e HIAC-1D
11-hidroxivitatina	1,50	HIAC-4D3
2- α -7-dimetoxihomolicorina	6,60	HIHex-5B

Os sete compostos isolados (Figura 56) pertencem aos seguintes esqueletos básicos: licorina, homolicorina, tazetina, galantamina e haemantamina. A trisfaeridina, considerada um produto do catabolismo do esqueleto crinano, não é classificada em nenhum esqueleto (BASTIDA et al., 2011). O sistema de numeração utilizado para esses alcaloides segue o proposto por Ghosal; Saini; Razdan (1985).

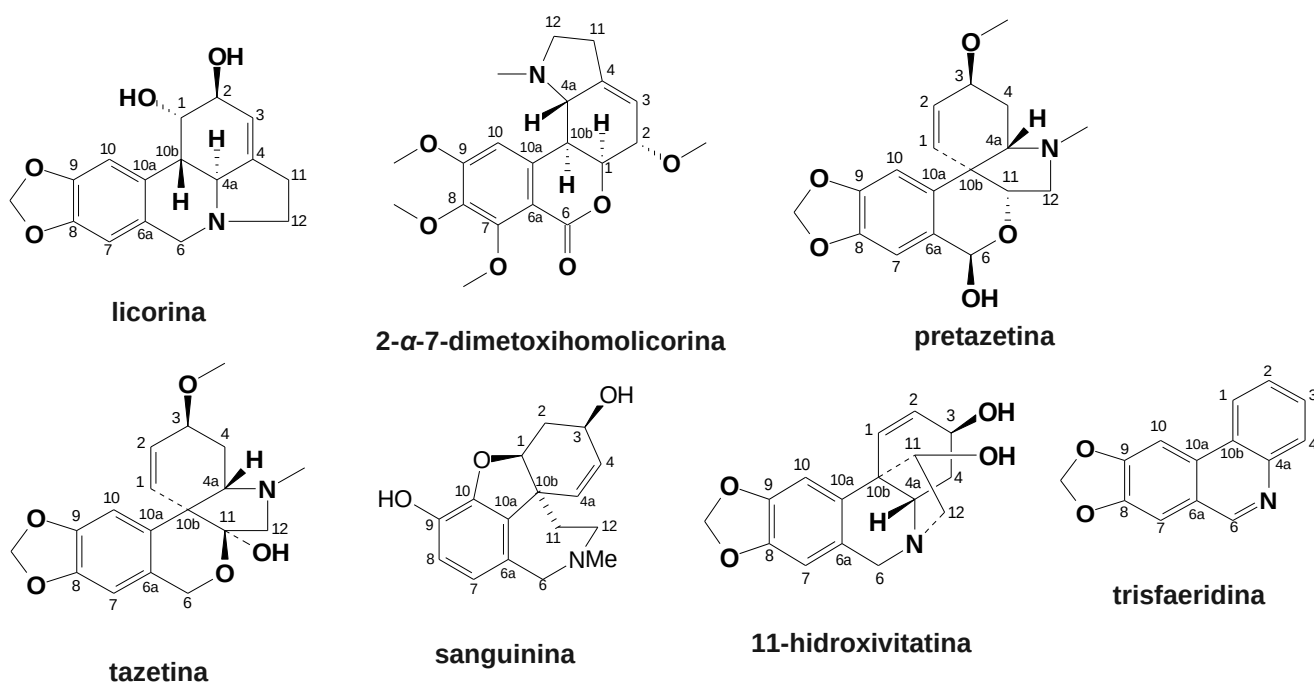


Figura 56. Alcaloides de Amaryllidaceae isolados das espécies *G. gardneriana* e *H. itaobinus*.

Abaixo são apresentados os resultados de RMN uni e bidimensionais. No caso da 11-hidroxitatina e da sanguinina, em função das massas obtidas, os espectros bidimensionais não se mostraram resolutivos.

5.2.1. Esqueleto licorina

O alcaloide **licorina** foi isolado apenas na espécie *Griffinia gardneriana*, sendo devidamente identificado por RMN de ^1H , além de RMN de ^{13}C e RMN bidimensional para completa elucidação estrutural. A análise inicial dos extratos por CG-EM já havia acusado a sua presença nas frações Hex e AcOEt. A análise de CG-EM da espécie *Habranthus itaobinus* também revelou licorina nas mesmas frações, porém a mesma não foi isolada.

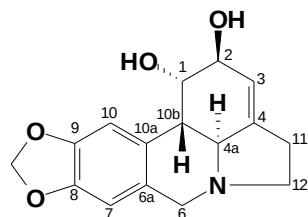
Os alcaloides do tipo licorina e homolicorina estão entre os mais comuns da família Amaryllidaceae. Licorina foi isolada pela primeira vez em 1877 de *Lycoris radiata* (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

As características gerais do espectro de RMN de ^1H incluem:

- a) dois singletos relativos aos hidrogênios aromáticos *para*-orientados, com δ entre 6,5 e 7,2 ppm, juntamente com um singlete relativo ao hidrogênio olefínico, com δ em torno de 5,5;
- b) dois dubletos formando um sistema AB correspondente aos hidrogênios benzílicos da posição C-6;
- c) desblindamento dos hidrogênios β -orientados nas posições 6 e 12 em relação aos homólogos α pela relação *cis* com o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio;
- d) em sua maioria apresentam junção *trans* dos anéis B/C com constante de acoplamento $J_{4a,10b}$ de 11 Hz;
- e) na planta, o alcaloide licorina é particularmente vulnerável à processos oxidativos (RHAMAN, 1999; BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

O composto **licorina** foi obtido nas subfrações GGHex-4A3b, GGAc-2B2, GGAc-2C1, GGAc-2D1A, GGAc-3B2, GGAc-3C2A e GGFAA-3C1, apresentando-se como um sólido branco. O composto foi solubilizado em DMSO- d_6 para análise de RMN, sendo encontradas características compatíveis com as apresentadas por Likhitwitayawuid et al. (1993), conforme mostrado na Tabela 3:

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto **licorina** (DMSO- d_6 , 400 MHz).



Posição	δ_{H} (J em Hz) licorina	δ_{H} (J em Hz) Literatura ¹	gCOSY	gNOESY	^{13}C /gHSQC	δ_{C} (J em Hz) Literatura ²	gHMBC
1	4,26 <i>sl</i>	4,27 <i>sl</i>	H-2, H-3, H-10b, 1-OH	H-2, H-4a, H-10, H-10b, 1-OH, 2-OH	70,2 <i>d</i>	70,2	
2	3,97 <i>sl</i>	3,97 <i>sl</i>	H-1, H-3, H-10b	H-1, H-3, 1-OH, 2-OH	71,7 <i>d</i>	71,7	
3	5,36 <i>sl</i>	5,37 <i>sl</i>	H-1, H-2, H-4a, H-11 α/β	H-2, H-11 α/β , 2-OH	118,5 <i>d</i>	118,5	
4					141,7 <i>s</i>	141,7	
4a	2,60 <i>d</i> (9,8)	2,60 <i>d</i> (10,6)	H-1, H-3, H-10b	H-1, H-6 α , H-12 α , 1-OH	60,8 <i>d</i>	60,8	
6 α	3,30-3,36 (ovl)*	3,32 <i>d</i> (14,4)	H-6 β , H-7	H-4a, H-6 β , H-7, H-12 α	56,7 <i>t</i>	56,7	C-12
6 β	4,01 <i>d</i> (14,4)	4,02 <i>d</i> (14,4)	H-6 α , H-7	H-7, H-6 α , H-12 β		56,7	C-4a, C-7
6a					129,7 <i>s</i>	129,7	
7	6,68 <i>s</i>	6,68 <i>s</i>	H-6 α , H-6 β	H-6 α , H-6 β	107,0 <i>d</i>	107,0	C-6, C-6a, C-9
8					145,2 <i>s</i>	145,2	
9					145,6 <i>s</i>	145,6	
10	6,80 <i>s</i>	6,81 <i>s</i>	H-10b	H-1, H-10b	105,0 <i>d</i>	105,1	C-6a, C-8, C-10b
10a					129,6 <i>s</i>	129,6	
10b	2,37-2,54 (ovl)**	2,50 <i>m</i>	H-1, H-4a, H-10	H-1, H-10, 2-OH	40,2 <i>d</i> **	40,2	C-4a
11 α/β	2,37-2,54 (ovl)**	2,44 <i>m</i>	H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	28,1 <i>t</i>	28,1	
12 α	2,20 <i>q</i> (8,8)	2,19 <i>ddd</i> (14,4; 8,6; 1,5)	H-11 α/β , H-12 β	H-4a, H-6 α , H-11 α/β , H-12 β	53,3 <i>t</i>	53,3	C-6
12 β	3,15-3,22 <i>m</i>	3,19 <i>dd</i> (14,4; 7,5)	H-11 α/β , H-12 α	H-6 β , H-11 α/β , H-12 α			C-4, C-4a
OCH ₂ O	5,94 <i>2d</i> (0,8)	5,94-5,96 <i>s</i>			100,5 <i>t</i>	100,6	C-8, C-9
1-OH	4,76 <i>d</i> (4,0)		H-1	H-1, H-2, H4a			
2-OH	4,86 <i>d</i> (6,0)		H-2	H-1, H-2, H-3			

*Sobreposto com o sinal do solvente (H₂O do DMSO- d_6). **Sobreposto com o sinal do solvente (DMSO- d_6)

***Atribuição realizada com base na correlação direta C-H dada pelo mapa de contornos gHSQC, não sendo possível atribuir a multiplicidade do sinal.

¹Likhitwitayawuid et al. (1993), DMSO- d_6 , 300 MHz.

²Likhitwitayawuid et al. (1993), DMSO- d_6 , 75 MHz.

Os espectros obtidos são apresentados no Anexo III (III.1 a III.6)

5.2.2. Esqueleto homolicorina

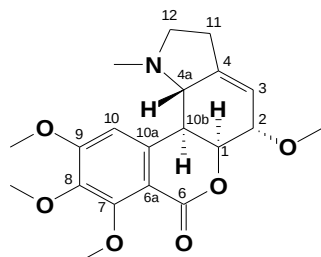
O alcaloide **2- α -7-dimetoxihomolicorina** foi isolado apenas na espécie *Habranthus itaobinus*, sendo devidamente identificado por RMN de ^1H , além de RMN de ^{13}C e RMN bidimensional para completa elucidação estrutural. A análise inicial dos extratos por CG-EM de ambas as espécies não revelou a presença do mesmo.

O grupo das homolicorinas inclui as séries lactona, hemiacetal ou, de forma mais incomum, alcaloides éteres cíclicos. As características gerais para estes alcaloides podem ser resumidas em:

- dois singletos *para*-orientados referentes aos hidrogênios aromáticos;
- desblindagem de H-7, na série lactona, causada pela posição *peri* do grupo carbonila;
- os alcaloides da série hemiacetal apresentam um substituinte em C-6 em posição α e, o hidrogênio benzílico da posição 6β aparece como um singlete entre 5 e 6 ppm (dependendo do substituinte em C-6);
- a maioria dos alcaloides pertence a uma única série enantiomérica com junção *cis* dos anéis B/C, que é coerente com a pequena constante de acoplamento $J_{1,10b}$;
- grande constante de acoplamento entre H-4a e H-10b ($J_{4a,10b} = 10$ Hz), condizente com uma relação *trans*-diaxial;
- em geral, o anel C apresenta um hidrogênio vinílico, e, se a posição 2 for substituída por um grupo OH, OMe ou OAc, este se apresentará *alfa*-orientado;
- singlete correspondente ao grupo *N*-metil aparece na faixa de deslocamento químico de 2,0 a 2,2 ppm, sendo sua ausência pouco comum;
- o hidrogênio 12α é mais desblindado que o 12β devido a relação *cis* com o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio (RHAMAN, 1999; BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

O composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** foi obtido na subfração HIHex-5B. O mesmo foi solubilizado em $CDCl_3$ para análise de RMN, e, as principais características do espectro são coerentes com as encontradas por Giordani et al. (2011), conforme pode ser visto na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (400 MHz, $CDCl_3$).



Posição	δ_H (J em Hz)	δ_H (J em Hz) Literatura ¹	gCOSY	gNOESY	^{13}C /gHSQC	δ_C (J em Hz) Literatura ¹	gHMBC
1	4,73 d (4,4)	4,73 d (4,5)	H-2, H-3, H-10b	H-2, H-10b, 2-OMe	75,4 d	74,5	C-3, C-4a

2	4,15-4,22 <i>m</i>	4,18 <i>m</i>	H-1, H-3, H-10b, H-11	H-1, H-3, H-4a, 2-OMe	76,4 <i>d</i>	77,3	
3	5,62 <i>s</i>	5,62 <i>sl</i>	H-1, H-2, H-4a, H-11	H-2, H-11 α/β	118,0 <i>d</i>	117,6	
4					144,3 <i>s</i>	144,5	
4a	2,85-2,89 <i>m</i>	2,83 <i>s</i>	H-3	H-2, H-12 β , NMe	67,0 <i>d</i>	66,8	
6					161,5 <i>s</i>	161,3	
6a					112,4 <i>s</i>	111,6	
7					156,5 <i>s</i>	156,3	
8					142,9 <i>s</i>	142,7	
9					157,2 <i>s</i>	157,0	
10	6,78 <i>s</i>	6,74 <i>s</i>	9-OMe	H-10b, 9-OMe, NMe	107,0 <i>d</i>	106,8	C-6a, C-7, C-8, C-10b
10a					140,0 <i>s</i>	140,0	
10b	2,85-2,89 <i>m</i>	2,83 <i>s</i>	H-1, H-2	H-1, H-10	45,7 <i>d</i>	45,9	C-4a
11 α	2,43-2,57 <i>m</i>	2,52 <i>ddl</i> (9,0; 2,0)	H-2, H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	27,7 <i>t</i>	27,6	
11 β	2,43-2,57 <i>m</i>	2,46 <i>dl</i> (9,0)	H-2, H-3, H-12 α , H-12 β	H-3, H-12 α , H-12 β	27,7 <i>t</i>	27,6	
12 α	3,14-3,21 <i>m</i>	3,14 <i>ddd</i> (9,2; 8,0; 2,5)	H-11, H-12 β	H-11 α/β , H-12 β , NMe	56,3 <i>t</i>	56,4	
12 β	2,29 <i>q</i> (9,2)	2,27 <i>q</i> (9,5)	H-11, H-12 α	H-4a, H-11 α/β , H-12 α	56,3 <i>t</i>	56,4	NMe
2-OMe	3,48 <i>s</i>	3,49 <i>s</i>		H-1, H-2	56,7 <i>q</i>	56,5	C-2
7-OMe	3,99 <i>s</i>	4,00 <i>s</i>			62,2 <i>q</i>	62,0	C-7
8-OMe	3,88 <i>s</i>	3,88 <i>s</i>			61,3 <i>q</i>	61,2	C-8
9-OMe	3,90 <i>s</i>	3,90 <i>s</i>	H-10	H-10, NMe	56,4 <i>q</i>	56,3	C-9
NMe	2,10 <i>s</i>	2,08 <i>s</i>		H-4a, H-10, H-12 α , 9-OMe	43,5 <i>q</i>	43,4	C-4a, C-12

¹Giordani et al. (2011), CDCl₃, 500 MHz.

O RMN de ¹H apresenta apenas um hidrogênio aromático, sendo atribuído para a posição C-10 devido a correlação de gNOESY com os hidrogênios do grupo *N*-metil. As atribuições das 3 metoxilas aromáticas observadas no RMN de ¹H foram atribuídas de acordo com o experimento de gHMBC.

A orientação alfa do substituinte 2-OMe foi confirmada por experimentos de RMN 2D e estudos de modelagem molecular (Giordani et al., 2011).

Os espectros obtidos são apresentados no Anexo III (III.7 a III.12).

5.2.3. Esqueleto tazetina

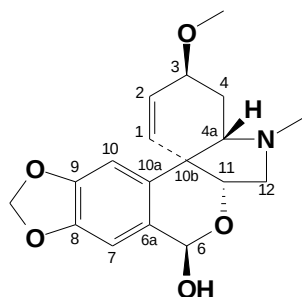
O alcaloide **pretazetina** foi isolado em ambas as espécies, sendo devidamente identificado por RMN de ¹H, além de RMN de ¹³C e RMN bidimensional para completa elucidação estrutural, apesar da análise inicial dos extratos por CG-EM não ter revelado a presença do mesmo (o que pode ser explicado pelo fato da pretazetina facilmente se converter em tazetina mediante a extração ácido-base ou pela metodologia utilizada na CG-EM) (DE ANDRADE et al., 2012).

Já o alcaloide **tazetina** foi isolado apenas na espécie *Habranthus itaobinus*, sendo também devidamente identificado pelas técnicas anteriormente mencionadas. A análise inicial dos extratos desta espécie por CG-EM já havia acusado a sua presença nas frações Hex e AcOEt.

O espectro de RMN de ^1H dos alcaloides do grupo apresenta como características gerais a presença de grupo *N*-metil com deslocamento químico na faixa de 2,4 a 2,5 ppm e a presença de sinal correspondendo ao grupo metilenodioxifenila (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

A **pretazetina** foi obtida nas subfrações GGFAA-3E3, HIHex-4C e HIAc-6C. O composto foi solubilizado em CDCl_3 para análise de RMN, apresentando características compatíveis com o descrito por Zhang et al. (2006) – Tabela 5.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY e gHSQC do composto pretazetina (CDCl_3 , 400 MHz).



Posição	δ_{H} (J em Hz) pretazetina	δ_{H} (J em Hz) Literatura ¹	gCOSY	gNOESY	^{13}C /gHSQC	δ_{C} (J em Hz) Literatura ²
1	5,51 <i>dt</i> (10,4; 1,6)	5,52 <i>d</i> (10,4)	H-2, H-3, H-4a		129,0 <i>d</i>	128,9
2	5,87 <i>d</i> (10,8)	5,89 <i>d</i> (10,8)	H-1, H-3		129,2 <i>d</i>	129,1
3	4,16 <i>ddt</i> (9,2; 6,8; 2,0)	4,14-4,18 <i>m</i>	H-1, H-2, H-4 α , H-4 β	H-4 α , H-4 β , 3-OMe	73,3 <i>d</i>	73,1
4 α	2,50-2,54 <i>m</i>	2,48-2,55 <i>m</i>	H-3, H-4 β , H-4a	H-3, H-4 β , H-4a, H-11	30,3 <i>t</i>	30,2
4 β	1,77 <i>ddd</i> (13,6; 9,2; 2,0)	1,77 <i>dd</i> (11,2; 10,0)	H-3, H-4 α , H-4a	H-3, H-4 α , H-4a, H-10	30,3 <i>t</i>	30,2
4a	2,94-2,97 <i>m</i>	2,96-3,01 <i>m</i>	H-1, H-4 α , H-4 β	H-4 α , H-4 β , H-10, H-11	64,2 <i>d</i>	64,1
6	6,11 <i>s</i>	6,13 <i>s</i>		H-7	94,1 <i>d</i>	93,9
7	6,76 <i>s</i>	6,77 <i>s</i>		H-6	105,0 <i>d</i>	104,9
10	6,86 <i>s</i>	6,87 <i>s</i>		H-4 β , H-4a	108,2 <i>d</i>	108,1
11	4,33 <i>dd</i> (11,2; 7,6)	4,43 <i>dd</i> (11,2; 7,2)	H-12 α , H-12 β	H-4 α , H-4a, H-12 α , H-12 β	74,0 <i>d</i>	73,9
12 α	2,98 <i>dd</i> (11,2; 10,0)	2,96-3,01 <i>m</i>	H-11, H-12 β	H-11, H-12 β	54,2 <i>t</i>	54,1
12 β	2,66 <i>dd</i> (10,0; 7,6)	2,67 <i>dd</i> (9,6; 8,0)	H-11, H-12 α	H-11, H-12 α	54,2 <i>t</i>	54,1
NMe	2,49 <i>s</i>	2,50 <i>s</i>			43,4 <i>q</i>	43,3
OCH ₂ O	5,92 <i>dl</i>	5,93 <i>s</i>			101,4 <i>t</i>	101,2
3-OMe	3,43 <i>s</i>	3,44 <i>s</i>		H-3	56,2 <i>q</i>	56,1

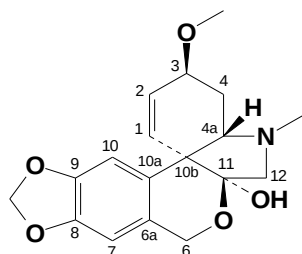
¹Zhang et al. (2006), CDCl_3 , 400 MHz.

²Zhang et al. (2006), CDCl_3 , 100 MHz.

Os espectros obtidos são apresentados no Anexo III (III.13 a III.17). O mapa de contornos gHMBC não se apresentou resolutivo e por esta razão não foi incluído no trabalho.

Já a **tazetina** foi obtida nas subfrações HIHex-2C e HIAc-2C, apresentando-se como um sólido amarelado. O composto foi solubilizado em CDCl₃ para análise de RMN de ¹H, além de RMN de ¹³C e RMN bidimensional para completa elucidação estrutural e, as principais características do espectro são compatíveis com os trabalhos de Crain; Wildman; Roberts (1971) e Ghosal; Kumar; Singh (1984), conforme Tabela 6.

Tabela 6. Dados de RMN de ¹H, ¹³C, gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto **tazetina** (CDCl₃, 400 MHz).



Posição	δ_H (J em Hz) tazetina	δ_H (J em Hz) Literatura ¹	gCOSY	gNOESY	¹³ C/gHSQC	δ_C (J em Hz) Literatura ²	gHMBC
1	5,60 <i>dt</i> (10,4; 1,6)	5,60 <i>ddd</i> (10,5; 2,0; 1,5)	H-2, H-3, H-4a	H-2, H-6 α , H-10, H-12 α ,	130,8 <i>d</i>	130,5	C-3, C-4a
2	6,13 <i>d</i> (10,4)	6,15 <i>ddd</i> (10,5; 2,0; 1,2)	H-1, H-3	H-1, H-3	128,8 <i>d</i>	128,4	C-10b
3	4,13 <i>ddt</i> (10,0; 6,4; 1,6)	4,13 <i>m</i>	H-1, H-2, H-4 α , H-4 β	H-2, H-3, H-4 α , H-4 β , H-4a, 3-OMe	73,1 <i>d</i>	72,4	C-1, C-2
4 α	2,23 <i>dddd</i> (13,6; 6,4; 4,0; 0,8)	2,20 <i>m</i>	H-3, H-4 β , H-4a	H-4 β , 3-OMe	26,9 <i>t</i>	26,6	NMe
4 β	1,62 <i>ddd</i> (13,6; 10,0; 2,4)	1,60 <i>m</i>	H-3, H-4 α , H-4a	H-3, H-4 α , H-4a, H-10, 3-OMe	26,9 <i>t</i>	26,6	C-2
4a	2,86 <i>sl</i>	2,83 <i>m</i>	H-1, H-4 α , H-4 β	H-3, H-4 α , H-4 β , H-6, H-10	70,1 <i>d</i>	69,9	C-1
6 α	4,95 <i>d</i> (14,8)	4,95 <i>dd</i> (14,7; 0,5)	H-6 β , H-7	H-1, H-6 β , H-7	65,7 <i>t</i>	65,0	C-6a, C-7, C-10a, C-11
6 β	4,63 <i>d</i> (14,8)	4,65 <i>d</i> (14,7)	H-6 α , H-7	H-4a, H-6 α , H-7, H-12 β	65,7 <i>t</i>	65,0	
6a					128,2 <i>s</i>	127,8	
7	6,49 <i>s</i>	6,50 <i>sl</i>	H-6 α , H-6 β	H-6 α , H-6 β	104,1 <i>d</i>	103,7	C-6a, C-9
8					146,5 <i>s</i>	146,3	
9					146,5 <i>s</i>	146,3	
10	6,85 <i>s</i>	6,85 <i>s</i>	H-12 β	H-1, H-4 β , H-4a	109,5 <i>d</i>	109,1	C-8, C-10b
10a					125,7 <i>s</i>	125,4	
10b					50,1 <i>s</i>	50,1	
11					102,2 <i>s</i>	101,7	
12 β	2,67 <i>d</i> (10,8)	2,65 <i>d</i> (10,5)	H-10, H-12 α	H-6 β , H-12 α , NMe	62,2 <i>t</i>	61,7	C-10b, C-11, NMe
12 α	3,29 <i>d</i> (10,8)	3,30 <i>d</i> (10,5)	H-12 β	H-1, H-12 β , NMe	62,2 <i>t</i>	61,7	C-4a, C-11, NMe
OCH ₂ O	5,89 <i>s</i>	5,90 <i>s</i>			101,1 <i>t</i>	100,6	C-8, C-9
3-OMe	3,46 <i>s</i>	3,45 <i>s</i>		H-3, H-4 α , H-4 β	56,2 <i>q</i>	55,6	C-3
NMe	2,39 <i>s</i>	2,40 <i>s</i>		H-12 α , H-12 β	42,1 <i>q</i>	41,9	C-4a, C-12

¹Ghosal; Kumar; Singh (1984), CDCl₃, 90 MHz.

²Crain; Wildman; Roberts (1971), CDCl₃, 16 MHz.

Os espectros obtidos são apresentados no Anexo III (III.18 a III.23).

5.2.4. Esqueleto galantamina

O alcaloide **sanguinina** foi isolado apenas na espécie *Habranthus itaobinus*, sendo devidamente identificado por RMN de ^1H . A análise inicial dos extratos por CG-EM de ambas as espécies não revelou a presença do mesmo.

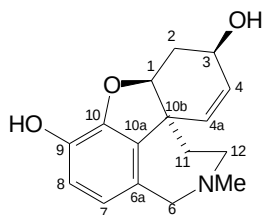
Dentre os alcaloides de Amaryllidaceae, apenas os do tipo galantamina apresentam constante de acoplamento *orto* entre os hidrogênios aromáticos do anel A. O espectro de RMN de ^1H do grupo apresenta como características:

- a) dois dubletos relativos aos dois hidrogênios aromáticos *orto*-orientados com constante de acoplamento de $J_{7,8} = 8 \text{ Hz}$;
- b) a atribuição da estereoquímica do substituinte em C-3 é feita em relação à constante de acoplamento do hidrogênio olefínico H-4: quando a constante de acoplamento $J_{3,4}$ é de cerca de 5 Hz, o substituinte é pseudoaxial; se for próximo a 0 Hz isto indica que o substituinte em C-3 é pseudoequatorial;
- c) dois dubletos formando um sistema AB correspondente aos hidrogênios benzílicos de C-6;
- d) a existência do anel furano resulta em efeito de desblindagem em H-1;
- e) presença frequente de grupo *N*-metil, mas ocasionalmente um grupo *N*-formil foi relatado (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

O composto **sanguinina** foi obtido na subfração GGAc-4B, apresentando-se como um sólido de coloração amarela. O composto foi solubilizado em CDCl_3 para análise de RMN de ^1H , sendo obtidas características compatíveis com o relatado por Mary et al. (1998) (Tabela 7).

O espectro obtido é apresentado no Anexo III (III.24).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H do composto sanguinina (CDCl_3 , 400 MHz) em comparação com a literatura.



Posição	δ_{H} (J em Hz) sanguinina	δ_{H} (J em Hz) Literatura ¹
H-1	4,53 <i>sl</i>	4,52 <i>sl</i>
H-2 α	2,01-2,07 <i>m</i>	2,10 <i>ddd</i> (16,0; 5,0; 3,0)
H-2 β	2,53-2,59 <i>m</i>	2,49 <i>m</i>
H-3	4,09 <i>tl</i> (4,8)	4,15 <i>tl</i> (4,5)
H-4	5,92 <i>dd</i> (10,0; 4,8)	5,91 <i>dd</i> (10,5; 5,0)
H-4a	6,00 <i>d</i> (10,4)	6,11 <i>d</i> (10,5)
H-6 α	3,61 <i>d</i> (15,2)	3,64 <i>d</i> (15,0)
H-6 β	4,01 <i>d</i> (15,2)	4,06 <i>d</i> (15,0)
H-7	6,59 <i>d</i> (7,6)	6,57 <i>d</i> (8,0)
H-8	6,48 <i>d</i> (8,0)	6,52 <i>d</i> (8,0)
H-11 α	1,91-1,94 <i>m</i>	1,65 <i>m</i>
H-11 β	1,94-1,97 <i>m</i>	2,05 <i>m</i>
H-12 α	2,95-3,03 <i>m</i>	3,01 <i>m</i>
H-12 β	3,21 <i>tl</i> (13,2)	3,22 <i>tl</i> (12,5)
NMe	2,33 <i>s</i>	2,38 <i>s</i>

¹Mary et al. (1998), CD_3OD , 250 MHz.

A constante de acoplamento $J_{3,4}$ próxima a 5 Hz (4,8 Hz) demonstra que a estereoquímica do substituinte em C-3 é pseudoaxial.

O deslocamento químico de H-1, em 4,53 ppm, é resultado da desblindagem pelo anel furano.

5.2.5. Esqueleto haemantamina

O alcaloide **11-hidroxitatina** foi isolado apenas na espécie *Habranthus itaobinus*, sendo devidamente identificado por RMN de ^1H . A análise inicial dos extratos por CG-EM de ambas as espécies não revelou a presença do mesmo.

O espectro de RMN de ^1H do esqueleto haemantamina apresenta algumas características, tais como:

- dois singletos referentes aos hidrogênios aromáticos *para*-orientados, com deslocamento químico em torno de 6,4 e 7,0 ppm;
- usando CDCl_3 como solvente, a magnitude da constante de acoplamento entre cada próton olefínico (H-1 e H-2) e H-3 fornece informação sobre a configuração do substituinte em C-3. Nos alcaloides em que a ponte (C-11 e C-12) é *cis* em relação ao substituinte em C-3, H-1 mostra um acoplamento alílico com H-3 ($J_{1,3} \sim 1\text{-}2$ Hz) e H-2

mostra um pequeno acoplamento com H-3 ($J_{2,3} \sim 0-1,5$ Hz), como ocorre na crinamina. Do contrário, como acontece com a haemantamina, uma constante de acoplamento de maior intensidade entre H-2 e H-3 ($J_{2,3} = 5$ Hz) é revelada, e o acoplamento entre H-1 e H-3 não é detectado;

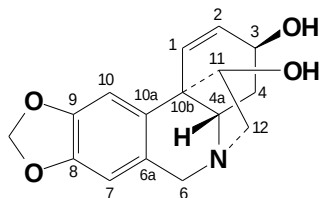
c) acoplamento de H-2 com H-4 β equatorial por um mecanismo em W, enquanto H-4 α apresenta uma constante de acoplamento grande com H-4a ($J_{4\alpha,4a} \sim 13$ Hz) devido a sua disposição *trans*-diaxial;

d) dois dubletos formando um sistema AB correspondente aos hidrogênios benzílicos da posição C-6 (RHAMAN, 1999; BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

O composto **11-hidroxitatina** foi obtido na subfração HIAC-4D3, apresentando-se como um sólido branco. O composto foi solubilizado em CDCl_3 para análise de RMN de ^1H e, as principais características são apresentadas na Tabela 8. Os resultados estão de acordo com os encontrados por Evidente (1986).

O espectro obtido é apresentado no Anexo III (III.25).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H do composto **11-hidroxitatina** (CDCl_3 , 400 MHz) em comparação com a literatura.



Posição	δ_{H} (J em Hz) 11-hidroxitatina	δ_{H} (J em Hz) Literatura ¹
H-1	6,39 <i>d</i> (10,0)	6,41 <i>d</i> (9,9)
H-2	6,34 <i>dd</i> (10,0; 4,4)	6,19 <i>dd</i> (9,9; 4,8)
H-3	4,38 <i>td</i> (4,4; 1,6)	4,28 <i>ddd</i> (4,8; 4,8; 1,5)
H-4 α	2,20-2,30 <i>m</i>	2,28 <i>ddd</i> (13,6; 13,6; 4,8)
H-4 β	1,92 <i>ddd</i> (14,0; 4,8; 1,6)	1,85 <i>ddd</i> (13,6; 4,8; 1,5)
H-4a	3,34-3,44 <i>m</i>	3,47 <i>dd</i> (13,6; 4,8)
H-6 α	3,69 <i>d</i> (16,8)	3,84 <i>d</i> (16,9)
H-6 β	4,32 <i>d</i> (16,8)	4,35 <i>d</i> (16,9)
H-7	6,46 <i>s</i>	6,56 <i>s</i>
H-10	6,83 <i>s</i>	6,94 <i>s</i>
H-11	3,99 <i>ddd</i> (6,8; 4,4; 1,2)	3,98 <i>dd</i> (7,0; 3,7)
H-12 <i>endo</i>	3,26 <i>dd</i> (14,0; 3,2)	3,20 <i>dd</i> (13,6; 3,7)
H-12 <i>exo</i>	3,34-3,44 <i>m</i>	3,50 <i>dd</i> (13,6; 7,0)
OCH ₂ O	5,89 <i>dd</i> (3,6; 1,6)	5,89 <i>s</i>

¹Evidente (1986), CD_3OD , 270 MHz.

A constante de acoplamento entre H-2 e H-3 ($J_{2,3} = 4,4$ Hz), e a ausência de acoplamento entre H-1 e H-3, confirma a relação *trans* da ponte (C-11 e C-12) em relação ao substituinte em C-3.

Estas características são compatíveis com os dados de RMN de ^1H dos alcaloides com esqueleto haemantamina ou crinina, que diferem entre si apenas na orientação da ponte (OVERMAN; SHIM, 1993).

Para identificação correta é necessária a análise por dicroísmo circular, uma ferramenta muito utilizada em análises stereoquímicas, incluindo aspectos conformacionais e configuracionais de compostos opticamente ativos. Os espectros de DC diferem em formato, amplitude e sinal.

O espectro de DC de alcaloides de Amaryllidaceae tem sua forma dependente da stereoquímica do carbono benzílico opticamente ativo em sistemas policíclicos rígidos (Figura 57a), como o C-10b de alcaloides do tipo crinano (DEANGELIS; WILDMAN, 1969).

A configuração do carbono cabeça de ponte é resultante do tipo de fusão dos anéis B e C. Os alcaloides da série 5,10b-etanofenantridina são formados a partir da fusão *trans* dos anéis B e C, podendo ocorrer de duas formas possíveis (Figura 57b) (WAGNER; PHAM; DÖPKE, 1996):

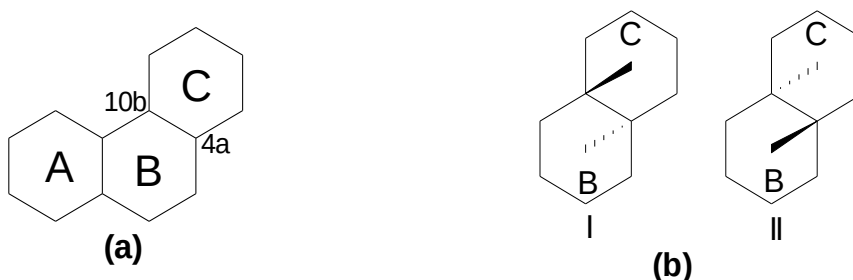


Figura 57. Processo de junção dos anéis B e C dos alcaloides de Amaryllidaceae: **(a)** fusão *cis* dos anéis B e C **(b)** fusão *trans* dos anéis B e C.

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

Os espectros de DC destes alcaloides sendo caracterizados por duas bandas de DC antipodais em cerca de 245 e 294 nm, ambas correspondentes aos valores máximos observados no UV (WAGNER; PHAM; DÖPKE, 1996).

O composto em questão apresentou um espectro de DC (Figura 58) com efeito cotton negativo em 244 nm e efeito cotton positivo em 293 nm, confirmando a orientação da ponte em *alfa* e o esqueleto do tipo haemantamina, conforme descrito por Deangelis e Wildman (1969) para os compostos com este esqueleto. Os dados de RMN de ^1H juntamente com a informação do DC são compatíveis com o alcaloide **11-hidroxitatina**.

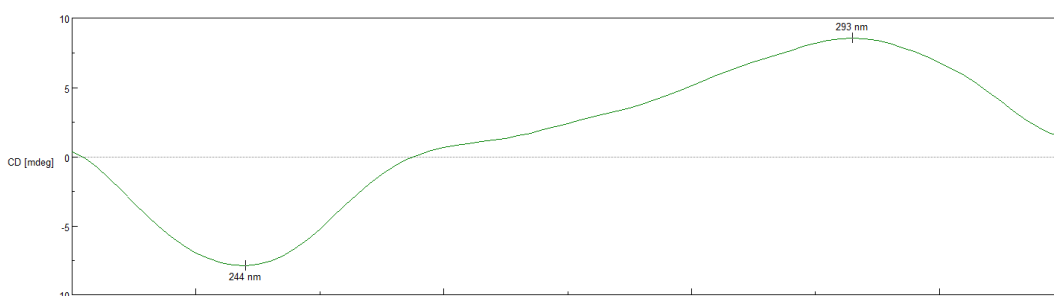


Figura 58. Resultado do teste de Dicroísmo Circular do composto **11-hidroxitatina**.

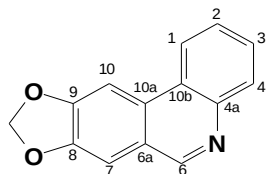
5.2.6. Outro tipo de esqueleto (*miscellaneous*)

O alcaloide **trisfaeridina** foi isolado em ambas as espécies, sendo também devidamente identificado por RMN de ^1H . A análise inicial dos extratos de *Habranthus itaobinus* por CG-EM já havia acusado a sua presença (fração Hex), mas não em *Griffinia gardneriana*. Vale lembrar que estudos de CG-EM a partir das frações enriquecidas em alcaloides podem não apresentar a sensibilidade necessária para detectar compostos minoritários.

Conforme já mencionado, trata-se de um produto do catabolismo do esqueleto crinano e, por isso, não classificada em nenhum tipo de esqueleto.

O composto **trisfaeridina** foi obtido nas subfrações GGHex-4A3d, HIHex-1C e HIAC-1D. Este se apresentou como um sólido de coloração castanho clara, de fácil solubilização em CDCl_3 para análise de RMN de ^1H , além de RMN de ^{13}C e RMN bidimensional para completa elucidação estrutural, sendo as principais características do espectro, apresentadas na Tabela 9, condizentes com o descrito por Suau; Gómez; Rico (1990) e Viladomat et al. (1997).

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gNOESY, gHSQC e gHMBC do composto **trisfaeridina** (CDCl_3 , 400 MHz).



Posição	δ_{H} (J em Hz) trisfaeridina	δ_{H} (J em Hz) Literatura ¹	gCOSY	gNOESY	^{13}C /gHSQC	δ_{C} (J em Hz) Literatura ²	gHMBC
1	8,38 <i>dd</i> (8,0; 1,2)	8,36 <i>dddd</i> (8,0; 1,8; 1,0; 1,0)	H-2, H-3	H-2, H-10	122,2 <i>d</i>	122,0	C-3, C-4, C-4a
2	7,63 <i>ddd</i> (8,0; 7,0; 1,2)	7,61 <i>ddd</i> (8,0; 7,0; 1,7)	H-1, H-3, H-4	H-1	126,8 <i>d</i>	126,7	C-4, C-6a
3	7,69 <i>ddd</i> (8,0; 7,0; 1,2)	7,67 <i>ddd</i> (7,0; 7,0; 1,8)	H-1, H-2, H-4	H-4	128,2 <i>d</i>	128,1	C-4a
4	8,14 <i>dd</i> (8,0; 1,2)	8,11 <i>ddd</i> (7,0; 1,7; 1,0)	H-2, H-3	H-3	130,2 <i>d</i>	129,9	C-2, C-10b
4a					144,3 <i>s</i>	143,8	
6	9,10 <i>s</i>	9,09 <i>s</i>	H-7, H-10	H-7	151,9 <i>d</i>	151,8	C-1, C-4, C-4a
6a					123,2 <i>s</i>	123,1	
7	7,34 <i>s</i>	7,34 <i>s</i>	H-6	H-6	105,7 <i>d</i>	105,5	C-6, C-8, C-9, C-10a
8					148,4 <i>s</i>	148,1	
9					151,7 <i>s</i>	148,2	
10	7,92 <i>s</i>	7,92 <i>s</i>	H-6	H-1	100,1 <i>d</i>	99,9	C-6, C-6a, C-8, C-9
10a					130,4 <i>s</i>	130,3	
10b					124,4 <i>s</i>	124,3	
OCH ₂ O	6,18 <i>s</i>	6,17 <i>s</i>			102,1 <i>t</i>	101,9	C-6, C-8, C-9

¹Suau; Gómez; Rico (1990), CDCl_3 , 200 MHz.

²Viladomat et al. (1997), CDCl_3 , 50 MHz.

Os espectros obtidos são apresentados no Anexo III (III.26 a III.31).

5.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR

5.3.1. Método colorimétrico do MTT – Frações enriquecidas em alcaloides

Todas as frações enriquecidas apresentaram ação citotóxica pelo método do MTT, conforme a Tabela 10, com as respectivas Cl_{50} :

Tabela 10. Avaliação da citotoxicidade, através do método do MTT, das frações enriquecidas de *Griffinia gardneriana* e *Habranthus itaobinus* frente a 3 linhagens celulares diferentes. Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio-padrão de três experimentos independentes.

<i>Griffinia gardneriana</i>			
AMOSTRAS	Linhagens (CI₅₀, $\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	OVCAR3	J774	L929
Fração Hex	31,31 (1,20)	12,40 (1,54)	14,30 (0,66)
Fração AcOEt	38,02 (0,98)	12,40 (0,85)	13,57 (1,35)
Fração AcOEt/MeOH (3:1)	45,52 (1,75)	12,40 (0,90)	12,40 (1,86)
<i>Habranthus itaobinus</i>			
AMOSTRAS	Linhagens (CI₅₀, $\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	OVCAR3	J774	L929
Fração Hex	16,46 (0,77)	12,40 (1,63)	12,40 (1,36)
Fração AcOEt	22,42 (1,25)	12,40 (0,86)	12,40 (0,93)
Fração AcOEt/MeOH (3:1)	61,50 (2,10)	28,40 (1,53)	12,40 (1,46)
CONTROLES	Linhagens (% de viabilidade)		
	OVCAR3	J774	L929
Negativo: DMSO 5%	77,00 (2,02)	77,00 (3,26)	77,00 (2,56)
Positivo: Camptotecina 10 μM	33,00 (1,25)	33,00 (1,67)	33,00 (1,89)

Verifica-se que as frações AcOEt/MeOH (3:1) das duas espécies vegetais apresentaram ação citotóxica, ainda que não tenham sido detectados alcaloides de Amaryllidaceae na análise por CG-EM, e o resultado com os reagentes de Dragendorff e Mayer tenham sido negativos. É provável que a ação citotóxica destas frações esteja relacionada a outros compostos, não alcaloídicos, presentes nas mesmas.

O NCI realiza *screenings in vitro* com o intuito de selecionar substâncias com potencial antineoplásico, onde, para uma droga ter potencial citotóxico, esta deve apresentar CI₅₀ abaixo de 10 μM (MATSUBARA; FERREIRA, 2005). Diz ainda que para um extrato vegetal bruto ser considerado citotóxico, deve apresentar CI₅₀ menor que 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em caso de compostos puros (GERAN et al., 1972).

Verifica-se que a maior parte dos resultados obtidos no ensaio, conforme a Tabela 11, mostram-se coerentes com as recomendações do NCI, ainda que não seja possível relacionar um composto específico à citotoxicidade verificada.

5.3.2. Método colorimétrico do MTT – Alcaloides isolados

Os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade dos alcaloides isolados, pelo método do MTT, são apresentados na Tabela 11:

Tabela 11. Ensaio do MTT (48h) – Testes preliminares para determinação de curva de ação e células susceptíveis aos alcaloides isolados. Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três experimentos independentes.

Alcaloide	Linhagem Celular		
	L929	HepG2	MCF-7
	CI ₅₀ $\pm$ DP (μ M)	CI ₅₀ $\pm$ DP (μ M)	CI ₅₀ $\pm$ DP (μ M)
Licorina	8,80 $\pm$ 4,20	>174,02	28,89 $\pm$ 7,59
Pretazetina	0,78 $\pm$ 2,93	>150,89	38,02 $\pm$ 8,41
11-hidroxivitatina	>174,22	>174,22	>174,22
2- α -7-dimetoxihomolicorina	>132,92	>132,92	>132,92
Tazetina	240,19 $\pm$ 9,84	>150,89	>150,89
Trisfaeridina	248,22 $\pm$ 8,45	>223,98	>223,98
Sanguinina	91,10 $\pm$ 4,61	>182,92	>182,92
Controle positivo (Camptotecina 10 μ M)	15% viabilidade celular	15% viabilidade celular	15% viabilidade celular
Controle negativo (DMSO 0,5%)	100% viabilidade celular	100% viabilidade celular	100% viabilidade celular

Os alcaloides 11-hidroxivitatina e 2- α -7-dimetoxihomolicorina não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens celulares, na concentração máxima utilizada. Os alcaloides licorina e pretazetina são pelo menos 10 a 30 vezes mais citotóxicos que os alcaloides que apresentaram citotoxicidade contra a linhagem de fibroblastos. Por outro lado, frente às linhagens cancerosas, os alcaloides tazetina, trisfaeridina e sanguinina não apresentaram citotoxicidade, enquanto, licorina e pretazetina foram citotóxicas com CI₅₀ para células cancerosas de 28,89 e 38,02 μ M, respectivamente, sendo selecionadas para estudo de mecanismo de morte celular com as linhagens celulares A549 e MCF-7, sendo repetido o MTT, agora com um período de incubação de 72h. A Tabela 12 resume os resultados obtidos para CI₅₀ com 72h de teste:

Tabela 12. Ensaio do MTT (72h) – Teste com os alcaloides licorina e pretazetina ativos para morte celular, selecionados no ensaio preliminar do MTT (48h). Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três experimentos independentes, juntamente com o coeficiente de determinação (R²).

Alcaloide	A549	MCF-7
	CI ₅₀ $\pm$ DP (μ M)	CI ₅₀ $\pm$ DP (μ M)
Licorina	1,15 $\pm$ 0,49 R ² =0,999999843	4,38 $\pm$ 0,80 R ² =0,999909
Pretazetina	4,95 $\pm$ 0,51 R ² =0,999989665	7,03 $\pm$ 0,99 R ² =0,999969374
Controle positivo (Camptotecina 10 μ M)	13% viabilidade celular	13% viabilidade celular
Controle negativo (DMSO 0,5%)	100% viabilidade celular	100% viabilidade celular

Desta forma, os 7 alcaloides isolados das espécies *G. gardneriana* e *H. itaobinus* apresentaram perfis bem distintos com relação ao perfil citotóxico.

A 2- α -7-dimetoxihomolicorina não se apresentou citotóxica na concentração máxima testada. A literatura não traz nenhum relato de estudo biológico deste alcaloide; tal carência de estudos de bioatividade é compartilhada com muitos dos compostos do tipo homolicorina (DE ANDRADE et al., 2012).

Ainda assim, os alcaloides da série homolicorina apresentam relatos em literatura de efeitos citotóxicos contra células não tumorais, como a linhagem de fibroblastos LMTK (WENINGER et al., 1995), mostrando-se moderadamente ativos, inibindo o crescimento celular *in vitro* e *in vivo*, de diferentes linhagens tumorais, como Molt-4 (linfoma), HepG2 (hepatoma humano), LNCaP (câncer de próstata humano) e HT (adenocarcinoma de cólon) (ANTOUN; MENDOZA; RIOS, 1993; WENINGER et al., 1995; FENNEL; VAN STADEN, 2001).

O mesmo resultado é compartilhado pela 11-hidroxivitatina, cujos resultados foram negativos na concentração máxima testada, apesar dos alcaloides do tipo crinano apresentarem um histórico de atividades biológicas, ocupando uma posição interessante para estudos de citotoxicidade (VILADOMAT et al., 1997; NAIR; VAN STADEN, 2013).

Entretanto, a 11-hidroxivitatina é contemplada em poucos destes estudos. Os relatos em literatura estão direcionados em grande parte ao isolamento do composto em espécies de Amaryllidaceae (CABEZAS et al., 2007; CABEZAS et al., 2009; RIBEIRO; JUNIOR, 2016).

Em estudo realizado por Abou-Donia et al. (2002) com linhagem celular NCI-60 (60 linhagens celulares de câncer do NCI) o composto mostrou-se inativo. Resultado desfavorável também foi obtido por Evidente et al. (2009) ao avaliar a viabilidade das linhagens HeLa e VERO frente a diferentes alcaloides do tipo crinano, exibindo modesta atividade no ensaio do MTT e ausência de indução de apoptose. Kornienko; Evidente (2008) obtiveram resultados positivos, porém em estudos com outro foco: a avaliação da atividade antibacteriana do composto contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A geometria da ponte 5,10b-etano parece desempenhar um papel importante na potência de compostos ativos (BASTIDA; LAVILLA, VILADOMAT, 2006; BASTIDA et al., 2011; CEDRÓN et al., 2015; NAIR; VAN STADEN; BASTIDA, 2016b), sendo a orientação α relacionada a propriedades citotóxicas. Porém, uma análise mais

detalhada requer que se leve em consideração outras características estruturais, com o substituinte em C-3 com certo grau de liberdade (McNULTY et al., 2009).

A trisfaeridina apresenta resultados que divergem quanto ao seu potencial citotóxico, com alguns autores mostrando inatividade da mesma (BRINE et al., 2002; LUO et al., 2012) enquanto outros revelam a habilidade de indução de apoptose em células HeLa (ZUPKÓ et al., 2009), assim como citotoxicidade contra linhagens de fibroblastos LMTK e linfoma Molt-4 (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006). Os ensaios realizados (Tabela 11) mostraram que este alcaloide é citotóxico apenas contra a linhagem L929.

Este fato repete-se frente ao alcaloide tazetina, que se mostrou ativo apenas contra a linhagem L929. Na literatura é possível encontrar estudos de citotoxicidade com resposta positiva para este composto (FURUSAWA et al., 1976; FURUSAWA et al., 1980; ANTOUN; MENDOZA; RIOS, 1993; WENINGER et al., 1995; LUO et al., 2012), enquanto outros revelam insucesso no resultado desta propriedade (EVIDENTE et al., 2009; GASPARINI et al., 2017).

Sanguinina, um derivado de galantamina com grupo hidroxila em C-9 ao invés de metoxila, promissor enquanto inibidor da acetilcolinesterase (para emprego no Mal de Alzheimer) (COSTA; De MELO, 2013) apresenta seus estudos muito focados nesta proposta (BORES et al., 1996; LÓPEZ et al., 2002; RASKIND, 2003; VIEGAS JÚNIOR et al., 2004; HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; ADEWUSI; FOUCHE; STEENKAMP, 2012; CAMPOS et al., 2016; CASTILLO; PACHON; TAKAHASHI, 2016; ZHAN et al., 2016; KAYA et al., 2017), onde tem se mostrado cerca de 10 vezes mais ativa que a galantamina (BERKOV; CODINA; BASTIDA, 2012), porém sem trabalhos com foco em citotoxicidade. Os resultados de citotoxicidade foram positivos apenas contra a linhagem L929.

A licorina, o mais abundante dos alcaloides de Amaryllidaceae, está presente em praticamente todas as espécies da família (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006; McNULTY et al., 2009). O potencial terapêutico dos alcaloides do grupo licorina como agentes citotóxicos vem ganhando força nas últimas décadas graças ao seu marcado potencial antiproliferativo e a seletividade para células cancerosas, conforme verificado em diferentes estudos (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; McNULTY et al., 2009; LUO et al., 2012; NAIR; VAN STADEN, 2014).

Trata-se de um potente inibidor do crescimento celular, da divisão celular e da organogênese em plantas superiores, algas e leveduras (ARRIGONI et al., 1994; ARRIGONI et al., 1997; CÓRDOBA-PEDREGOSA et al., 1997; DEL GIUDICE et al., 1997). Apresenta atividade citotóxica (HUA; SAHA; TAKEMOTO, 1997; YUI et al., 1998), *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se ativa contra diferentes linhagens celulares: BL6 (melanoma), carcinoma pulmonar de Lewis e HeLa (câncer cervical) (GHOSAL et al., 1985; GHOSAL; SAINI; RAZDAN, 1985; LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; CAMPBELL et al., 1998; NAIR et al., 1998), S-180 (sarcoma) (GHOSAL et al., 1985), carcinoma epidermoide KB, BCA-1 (câncer de mama) (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993), COL-2 (câncer de cólon) (LIN et al., 1995), fibroblastos LMTK, Molt-4, HepG2 (WENINGER et al., 1995), HL60S (leucemia sensível a adriamicina), HL60R (leucemia resistente a adriamicina), L1210 (leucemia linfocítica) (HUA; SAHA; TAKEMOTO, 1997; LIU et al., 2004), Meth-A (sarcoma), LLC (carcinoma de pulmão) (MIN et al., 2001), L5178 (linfoma), L5178mdr (linhagem multirresistente à drogas) (HOHMANN et al., 2002), HL60 (leucemia promielocítica) (LIU et al., 2004; LIU et al., 2009), KM3 (mieloma) (LI et al., 2007), K562 (leucemia mieloide crônica), K562/G0, U937 (linfoma histiocítico), 6T-CEM (leucemia linfocítica aguda) (LIU et al., 2004), células VERO (EVIDENTE; KORNIENKO, 2009; EVIDENTE et al., 2009), células jurkat (leucemia) (EVIDENTE; KORNIENKO, 2009; EVIDENTE et al., 2009; McNULTY et al., 2009), A549 (carcinoma de pulmão), OE21 (carcinoma de células escamosas), Hs683 (oligodendroglioma anaplástico), U373 (glioblastoma), SK-MEL (melanoma), B16F10 (melanoma murino), SMMC-7721 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (câncer de mama), W480 (câncer de cólon), HT29 (carcinoma de cólon), G361 (melanoma), DLD-1 (adenocarcinoma colorretal), N2A (neuroblastoma), CEM (leucemia linfoblástica) (LAMORAL-THEYS et al., 2009; VAN GOIETSENOVEN et al., 2010; FENG et al., 2011; LUO et al., 2012; HE et al., 2012; MA et al., 2013; NAIR et al., 2015).

Da mesma forma, a pretazetina tem potencial citotóxico bem documentado na literatura, com resultados positivos contra linhagem celular fibroblástica LMTK, além de inibir o crescimento de células HeLa (câncer cervical), sendo terapeuticamente ativa contra leucemia Rauscher em estágio avançado, carcinoma ascítico de Ehrlich, leucemia linfocítica espontânea AKR e carcinoma pulmonar de Lewis (FURUSAWA; LUM; FURUSAWA, 1981; FURUSAWA; FURUSAWA; SOKUGAWA, 1983; FURUSAWA; FURUSAWA, 1986; FURUSAWA; FURUSAWA, 1988), sendo um dos

alcaloides de Amaryllidaceae mais ativos contra a linhagem celular Molt-4 (WENINGER et al., 1995). Promove inibição da glicoproteína-P, uma das envolvidas no mecanismo de resistência à ação das drogas; desta forma, aumenta a eficácia de agentes citotóxicos na terapia do câncer (HABLI et al., 2017) – este efeito não foi verificado para a licorina e tazetina em estudo realizado por Hohmann et al. (2002).

Os resultados experimentais obtidos corroboram a ação citotóxica da licorina e pretazetina, porém não foi verificada seletividade nesta ação, uma vez que as mesmas se mostraram ativas contra todas as linhagens testadas, cancerosas ou não. No caso da linhagem HepG2 o valor da CI_{50} está bem acima do preconizado pelo NCI para um candidato a agente anticâncer.

Outro ponto de destaque é o fato de o potencial citotóxico destes compostos revelar-se tempo-dependente, conforme pode ser verificado pela CI_{50} que passa de 28,89 e 38,02 μM , em 48h (Tabela 11), para 4,38 e 7,03 μM , em 72h (Tabela 12), para a licorina e pretazetina, respectivamente (considerando a linhagem celular MCF-7).

Assim, além da dose, o tempo de permanência do composto nas células influenciou o mecanismo de morte celular. Quanto maior tempo as células foram expostas à toxicidade do composto, maior citotoxicidade foi observada. Em geral, a citotoxicidade é diretamente proporcional à concentração da amostra e ao tempo de exposição (KUMAR et al., 2009).

5.3.3. Avaliação das mutações cromossômicas pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese

O uso indiscriminado de plantas medicinais e a falta de conhecimento acerca das mesmas pela população representam riscos potenciais para a saúde, visto que substâncias químicas presentes nas espécies vegetais podem ser tóxicas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas quando ingeridas sem restrições e indiscriminadamente (VERRI; MOURA; MOURA, 2017).

Desta forma, são necessários estudos que avaliem o potencial mutagênico (citotóxico e genotóxico), bem como os eventuais danos causados ao organismo humano, principalmente os relacionados com o aumento da taxa de mutações do material genético em níveis basais (VERRI; MOURA; MOURA, 2017). Por outro lado, estes mesmos ensaios nos fornecem indícios da possibilidade de utilização destes compostos em terapias antineoplásicas.

Compostos isolados de plantas, como a quercetina, os alcaloides de furoquinolinas e os isotiocianatos, p.ex., são considerados mutagênicos (SRIVIDYA; DHANABAL; VISHNUVARTHAN, 2002).

Assim, a genotoxicidade dos alcaloides licorina e pretazetina foi verificada através da avaliação da formação de micronúcleo (OECD 2010), sendo os resultados apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Determinação de genotoxicidade em células de ovário de hamster (CHO-1-15) expostas aos alcaloides licorina e pretazetina. Os resultados são expressos como a média (%) $\pm$ desvio-padrão (DP) de três experimentos independentes.

Agente	Binucleadas	MN (Média $\pm$ DP)	NBUDs (Média $\pm$ DP)	NPBs (Média $\pm$ DP)	Multinucleadas (Média $\pm$ DP)	Índice de replicação	Citotoxicidade relativa (%)
Licorina (1,15 $\pm$ 0,49 μ M)	20,00 $\pm$ 7,07 ^a	7,50 $\pm$ 3,54 ^a	5,00 $\pm$ 2,83 ^b	8,50 $\pm$ 0,71 ^a	6,00 $\pm$ 2,83 ^b	36,32	63,68 ^b
Pretazetina (4,95 $\pm$ 0,51 μ M)	31,33 $\pm$ 3,06 ^a	10,00 $\pm$ 1,73 ^a	7,33 $\pm$ 1,15 ^b	4,67 $\pm$ 1,00 ^b	12,00 $\pm$ 0,00 ^{b,c}	50,90	49,10 ^b
Mitomicina C 2,99 μ M (Controle positivo)	49,33 $\pm$ 6,66 ^a	12,00 $\pm$ 3,61 ^a	3,00 $\pm$ 1,00 ^a	6,67 $\pm$ 4,04 ^{a,b}	4,00 $\pm$ 1,00 ^a	*40,00	60,00 ^a
PBS (Controle negativo)	87,00 $\pm$ 31,00 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Resultado determinado para 1.10³ células. Diferentes letras significam diferenças entre os danos genotóxicos [ANOVA, Tukey (p<0,05)]. Índice de replicação: número relativo de MN nas culturas tratadas comparadas com controle. *Mitomicina não se usa Cyt B, calcula-se o Aumento relativo de contagem celular – RICC (OECD, 2010).

No tocante à citotoxicidade relativa, calculada de acordo com Fowler et al. (2010) modificado, pretazetina apresentou índice relativo de citotoxicidade (49,10%) comparado à mitomicina C (60,00%), enquanto licorina teve uma ação mais eficiente que a pretazetina e mitomicina C, apresentando índice relativo de toxicidade de 63,68%. Este resultado está coerente com os testes de citotoxicidade do MTT (Tabela 11).

A mitomicina C é um antibiótico que tem sua atividade antitumoral demonstrada em estudos pré-clínicos e clínicos e é amplamente usada no tratamento de vários tipos de câncer. Sua ação é conhecida por possuir efeito genotóxico induzindo a formação do micronúcleo (FOWLER et al., 2010) e ativar a apoptose (CHENG et al., 2012).

Para a análise das características de formação de micronúcleo, pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares, foi possível observar que o número de micronúcleos (MNs) para licorina, pretazetina e mitomicina C foram estatisticamente equivalentes. Em relação ao número de pontes (NPBs), licorina e pretazetina

apresentaram resultados estatisticamente equivalentes aos da mitomicina C, enquanto para os brotamentos (NBUDs) as duas mostraram-se equivalentes entre si, e superiores à mitomicina C.

Na análise de formação de células binucleadas, licorina, pretazetina e mitomicina C apresentaram resultados estatisticamente equivalentes, enquanto para células multinucleadas os resultados de pretazetina e licorina foram superiores aos da mitomicina C, sendo que para pretazetina a frequência de células multinucleadas foi duas vezes maior que para licorina. Este último resultado é reforçado pelo índice de replicação calculado, utilizado para determinar citotoxicidade, onde pretazetina (50,90) apresentou resultado superior à licorina (36,32) e mitomicina C (40,00).

Os alcaloides mostraram-se capazes de aumentar os níveis de todos os marcadores de genotoxicidade (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotamentos nucleares, células bi e multinucleadas).

5.3.4. Estudos de *docking* molecular

Para avaliar o potencial farmacológico dos alcalóides isolados, foram realizados estudos de ancoragem molecular (*docking*) a fim de realizar uma análise *in silico* da interação receptor-ligante entre os compostos isolados e o alvo molecular caspase-3 (1PAU), que contém o ligante cristalográfico tetrapeptídeo utilizado como comparativo no estudo de modelagem molecular (Figura 59).

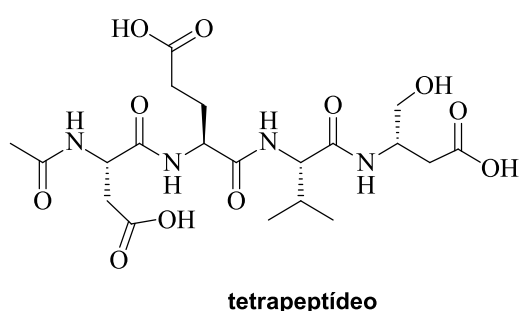


Figura 59. Ligante cristalográfico tetrapeptídeo utilizado nos estudos de modelagem molecular com a caspase-3.

Inicialmente, a metodologia empregada foi validada através da redocagem do ligante tetrapeptídeo no sítio ativo da proteína caspase-3, a fim de alcançar os melhores parâmetros conformacionais para as moléculas alvo em relação àquele do ligante cristalográfico original na predição da melhor interação entre o receptor-ligante no sítio ativo da proteína. Posteriormente, os alcaloides foram submetidos aos estudos

de *docking* no sítio de ligação da caspase-3 utilizando o método previamente validado para fornecer a energia da interação proteína-ligante, comparando com o valor obtido para o tetrapeptídeo (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados da modelagem molecular utilizando o *software* AutoDock Vina para a interação proteína-ligante realizada no sítio ativo da caspase-3.

Ligante	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Afinidade de ligação (kcal.mol ⁻¹)	K _i (μM)
tetrapeptídeo	504,49	- 6.0	39.95
licorina	287,32	- 6.4	20.34
2-α-7-dimetoxihomolicorina	374,42	- 5.9	47.30
11-hidroxivitatina	287,32	- 6.8	10.35
pretazetina	331,37	- 6.9	8.74
tazetina	331,37	- 6.8	10.35
sanguinina	273,33	- 6.1	33.75
trisfaeridina	223,23	- 6.0	39.95

Os resultados de afinidade de interação proteína-ligante foram avaliados através dos valores das energias obtidas no *docking* molecular e indicam uma melhor energia de interação para a maioria dos alcaloides em comparação ao tetrapeptídeo, destacando a licorina, a tazetina, a 11-hidroxivitatina e a pretazetina (Figura 60A). O alcaloide 11-hidroxivitatina mostrou-se inativo contra as linhagens celulares testadas, apesar de sua constante de inibição calculada, K_i, ter apresentado um valor na mesma magnitude daqueles observados para os alcaloides ativos. Mais estudos são necessários para justificar estes resultados. Os resultados de afinidade de interação, no geral, são consistentes com os valores de K_i calculados, corroborando com os dados obtidos nos ensaios do MTT, nos quais os compostos pretazetina e licorina foram os de maior potencial citotóxico. Estes resultados indicam que a proteína caspase-3 pode ser um potencial alvo terapêutico para esses medicamentos fitoterápicos.

A fim de avaliar a característica das interações intermoleculares do complexo proteína-ligante no sítio ativo da caspase-3, os alcaloides pretazetina e licorina foram escolhidos como ligantes modelo (Figuras 60B e 60B).

As representações esquemáticas em 3D e 2D do complexo pretazetina-1PAU, assim como os respectivos sítios de interação, são mostrados nas Figuras 60C e 60D, respectivamente. A partir da análise das figuras, podemos observar que os grupos hidroxila e metoxila do ligante são capazes de interagir com o resíduo de arginina da proteína por uma ligação de hidrogênio (convencional), enquanto a porção estrutural

do alcaloide referente ao 1,3-benzodioxol possibilita a realização de interações apolares do tipo π - π com diferentes resíduos de aminoácidos.

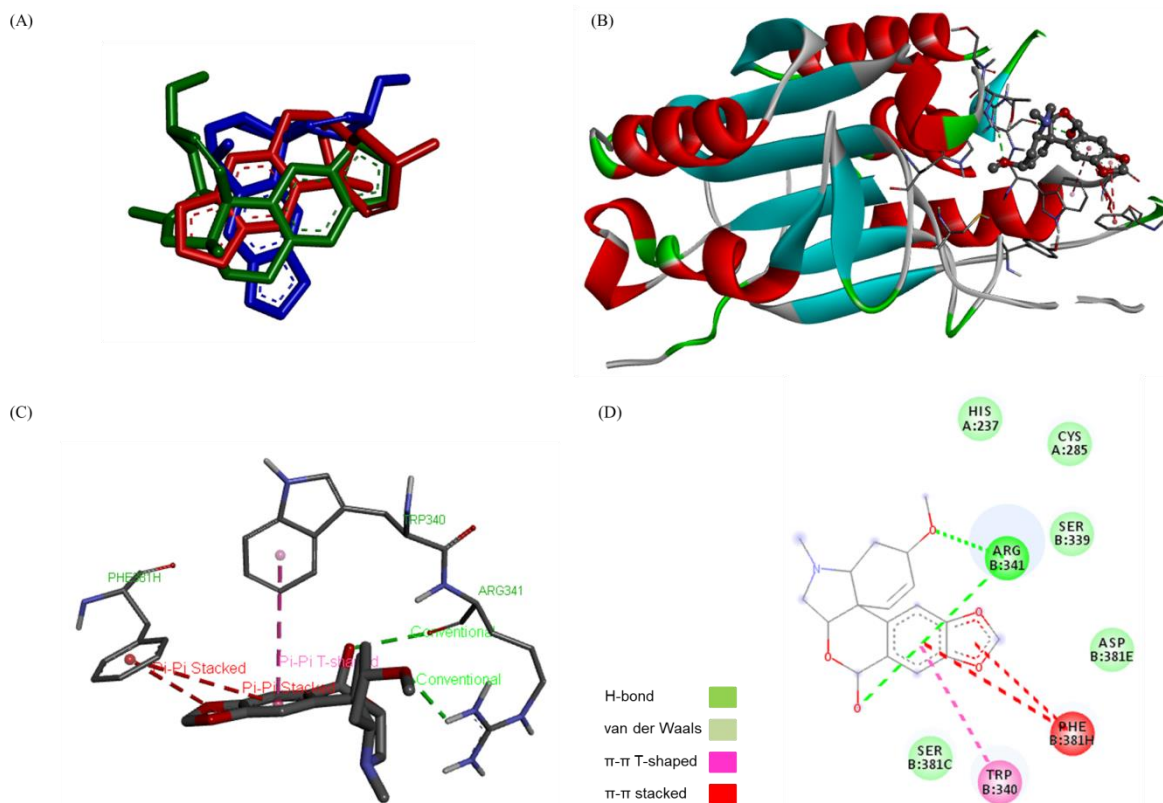


Figura 60. Resultados de *docking* entre os ligantes e 1PAU. (A) aglomerado formado pelos alcaloides tazetina (verde), 11-hidroxitatina (vermelho) e pretazetina (azul); (B) representação 3D do complexo pretazetina-1PAU; (C) interações intermoleculares entre pretazetina e 1PAU com resíduos de aminoácidos em 3D; (D) diagrama de interações intermoleculares 2D entre a pretazetina e 1PAU. Os átomos de hidrogênio foram omitidos nessas representações para uma melhor visualização.

A análise das representações em 3D e 2D do complexo licorina-1PAU e de seus sítios de interação são mostrados nas Figuras 61C e 61D, respectivamente. Como podemos observar, a hidroxila alílica é capaz de interagir com ambos os resíduos de arginina e serina através de ligação de hidrogênio (convencional), assim como uma porção do grupamento metilenodióxi que realiza a interação *via* ligação de hidrogênio (convencional) com outro resíduo de serina.

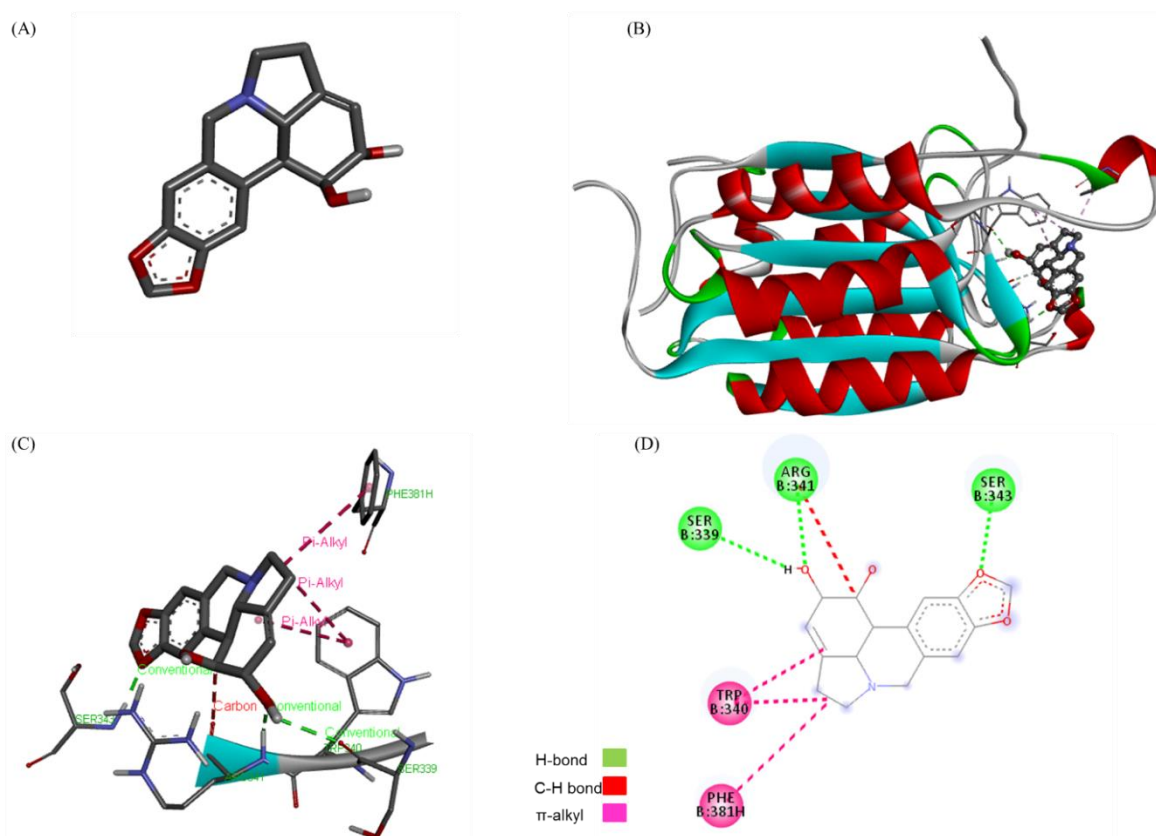


Figura 61. Resultados de *docking* entre os ligantes e 1PAU. (A) estrutura da licorina otimizada; (B) representação 3D do complexo licorina-1PAU; (C) interações intermoleculares entre licorina e 1PAU com resíduos de aminoácidos em 3D; (D) diagrama de interações intermoleculares 2D entre a licorina e 1PAU. Os átomos de hidrogênio foram omitidos nessas representações para uma melhor visualização.

Ainda, as superfícies hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio foram avaliadas no sítio ativo da proteína caspase-3, a fim de direcionar futuras modificações na estrutura química do ligante vislumbrando potencializar os efeitos biológicos (Figuras 62 e 63). O perfil hidrofóbico (Figuras 62A e 63A) mostrou uma ampla superfície de interações hidrofílicas em torno das porções polares dos alcaloides, enquanto a região próxima do grupamento 1,3-benzodioxol indicou um caráter mais hidrofóbico em ambos os casos. Similarmente, o mapa de superfície de ligação de hidrogênio exibiu uma maior superfície aceptora e doadora no lado oposto da porção hidrofóbica (Figuras 62B e 63B). Em geral, grupos polares doadores e aceptores capazes de realizar ligações de hidrogênio no lado contrário da porção 1,3-benzodioxol podem ser capazes de melhorar a atividade biológica.

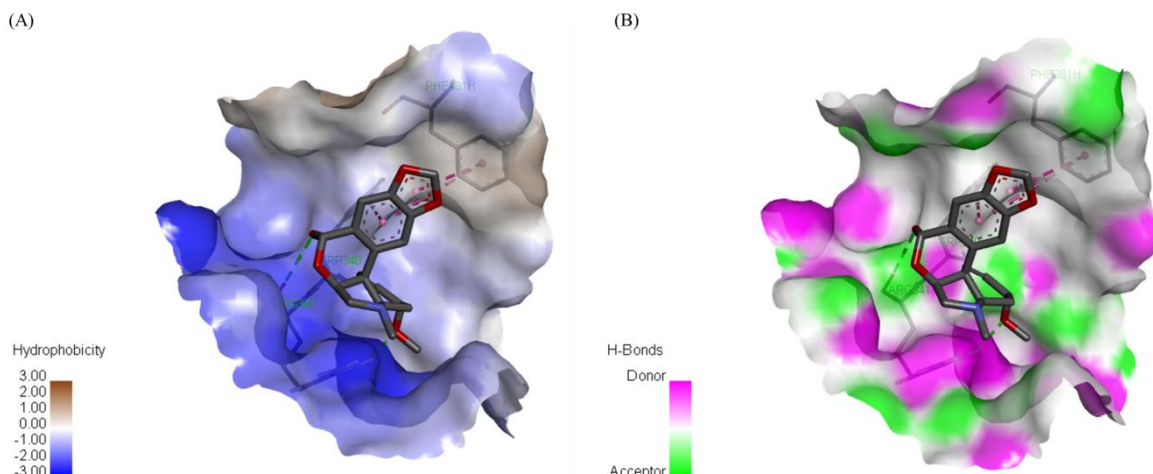


Figura 62. Mapa de superfícies de avaliação do caráter hidrofóbico (A) e de interações de hidrogênio (B) do complexo pretazetina-1PAU.

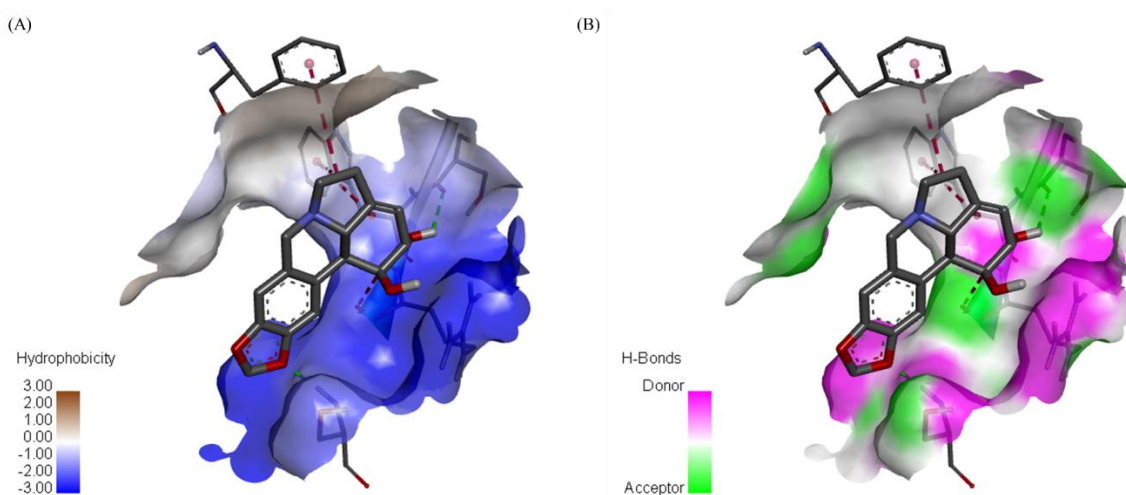


Figura 63. Mapa de superfícies de avaliação do caráter hidrofóbico (A) e de interações de hidrogênio (B) do complexo licorina-1PAU.

Do ponto de vista estrutural, a literatura relaciona os seguintes aspectos do esqueleto licorina relacionados à citotoxicidade:

- **Anel A:** presença de grupo metilenodioxifenila como parte do farmacóforo;
- **Anel B:** a oxidação da posição C-6 benzílica e quaternização do átomo de nitrogênio apresentam resultado negativo na ação biológica dos compostos. Já a derivatização para cloridrato produz compostos marcadamente ativos, enquanto a formação de *N*-óxidos produz resultados negativos;
- **Anel C:** substituintes oxigenados nas posições C-1 e C-2 são requeridos para uma potente ação citotóxica. Em geral, a acilação destas posições resulta em perda de atividade, da mesma forma que a alquilação. A presença de ligação dupla é crítica para a ação citotóxica. Aromatização do anel produz efeitos diversificados, com

redução de atividade em alguns compostos, enquanto em outros resulta em incremento da mesma. As posições C-11 e C-12 exibem influência na citotoxicidade dos compostos, e estudos com modificação destas posições resultaram em perda de atividade, corroborando para a importância do anel D intacto para o farmacóforo. Entretanto, tal fato não é conclusivo, visto que alguns compostos sem este anel D apresentam-se entre os mais potentes do grupo (como narciclasina e pancratistatina) (NAIR; VAN STADEN; BASTIDA, 2016b).

Existe uma forte relação entre o aumento da lipofilicidade do composto e atividade anticâncer, e desta forma, derivados C-1 e C-2 do tipo éster têm sido estudados dentro desta perspectiva (porém não os metil éteres) (HE et al., 2015).

No caso dos compostos do tipo tazetina, ao se avaliar os aspectos estruturais, tem-se que a presença do grupo hidroxila em C-6, como ocorre na pretazetina, parece desempenhar um importante papel para a atividade anticâncer (justificando também a baixa atividade da tazetina, visto que ela não apresenta tal substituinte). A estereoquímica do grupo lactona assim como sua acetilação não afetam esta propriedade biológica (MASI et al., 2015).

5.3.5. Avaliação do nível de apoptose

Os resultados obtidos no *docking* molecular foram então confrontados com o experimento de avaliação da expressão da caspase-3.

Para o ensaio da caspase-3 foi utilizada a linhagem A549 e não a MCF-7, utilizada no ensaio do MTT, visto que esta última não expressa caspase-3 (SIMSTEIN et al., 2003; JÄNICKE, 2009). Estudos demonstraram que a fragmentação de DNA em MCF-7 ocorreria através de mecanismos independentes de caspases ou executada por outras caspases, que podem ser as responsáveis por essa alteração morfológica, na ausência de caspase-3 (MC GEE et al., 2002).

A indução da apoptose via ativação da caspase-3 nas células de câncer de pulmão A549 expostas aos alcaloides isolados, licorina ($1,15 \pm 0,49 \mu\text{M}$) e pretazetina ($4,95 \pm 0,51 \mu\text{M}$), demonstrou-se eficiente mesmo em uma baixa concentração dos alcaloides (Figura 64).

A caspase-3 tem sido associada como a protease efetora do processo de morte programada e é, portanto, um importante marcador do ponto de entrada da célula na via de sinalização apoptótica (NICHOLSON et al., 1995; SUTHEESOPHON et al.,

2004; WU et al., 2016). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca de apoptose convergem em ativação da caspase-3 e resultam na fragmentação do DNA, degradação das proteínas nucleares e do citoesqueleto, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocitárias e finalmente captação por células fagocíticas (ELMORE, 2007).

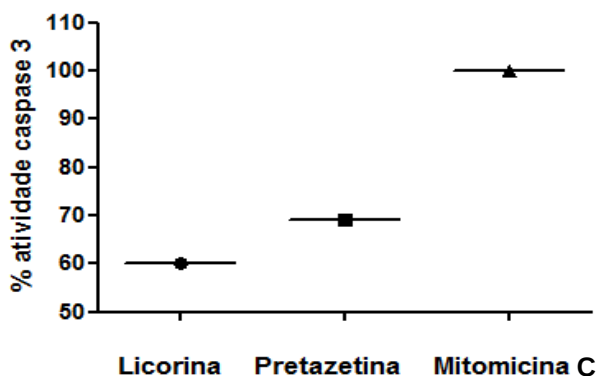


Figura 64. Resultados do ensaio da caspase-3 com os alcaloides licorina e pretazetina.

Estes resultados obtidos para a licorina e pretazetina mostram-se coerentes com os obtidos no estudo de *docking* molecular, visto que estes dois compostos se figuraram entre os de maior afinidade de ligação com a caspase-3, sendo, portanto, ótimos candidatos à estudos de modificação molecular a fim de encontrar derivados com alta afinidade por esta proteína, para posterior trabalho de síntese em laboratório.

A maioria das terapias anticâncer tem como objetivo a indução de apoptose como mecanismo para eliminação das células malignas (MOHAMMAD et al., 2015). Os produtos naturais têm sido associados à indução de apoptose, como a vimblastina e a vincristina, alcaloides usados no tratamento clínico do câncer por induzirem ativação da caspase-3 (NOBLE, 1990; SIMIZU et. al., 1998), o extrato de própolis, um indutor da via das caspases (KHACHA-ANANDA et al., 2016) e, a evodiamina e o glabridin (obtido do extrato de alcaçuz), dotados de efeito ativador do processo apoptótico (WEI; JIN; LI, 2016; HSIEH et al., 2016), qualificando, desta forma, os produtos naturais como significativos na busca de novos produtos para o combate ao câncer.

Os estudos relacionam diferentes mecanismos de ação para os alcaloides do tipo licorina, como a inibição da síntese proteica em nível ribossomal (FURUSAWA et al., 1980; HUA; SAHA; TAKEMOTO, 1997; YUI et al., 1998). Entretanto, outros

mecanismos apontados para o grupo incluem: interação com o DNA (KARADENIZ et al., 2003), interferência na biossíntese celular de vitamina C (ARRIGONI; ARRIGONI; CALABRESE, 1975), inibição da enzima óxido nítrico sintase (ABDEL-HALIM et al., 2004; KANG et al., 2012), *upregulation* da COX-2 (KANG et al., 2012), inibição da produção do TNF- α (PAUL; GOHIL; BHUTANI, 2006), habilidade de induzir apoptose, aumentando os níveis de caspases, reduzindo a expressão de BCL-2 e aumentando a razão BAX:BCL-2 (YUI et al., 1998; LIU et al., 2004), indução de autofagia (YU et al., 2017), dentre outros.

Com relação à pretazetina, esta inibe fortemente a atividade da transcriptase reversa de vários vírus oncogênicos por ligação à enzima. Além disso, apresenta uma atividade pronunciada de ligação ao DNA (BASTIDA et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

As análises dos extratos brutos por CG-EM demonstraram apenas a presença de licorina para *G. gardneriana*, enquanto um número maior de alcaloides foi identificado em *H. itaobinus*, sendo estes licorina, tazetina, ismina, trisfaeridina e galantindol.

O fracionamento da fração Hex dos bulbos de *G. gardneriana* levou ao isolamento de dois alcaloides, licorina e trisfaeridina, assim como na fração AcOEt, onde foram isolados licorina e sanguinina. Na fração AcOEt ácido foram isolados licorina e pretazetina.

O fracionamento da fração Hex dos bulbos de *H. itaobinus* levou ao isolamento de quatro alcaloides: trisfaeridina, tazetina, pretazetina e 2- α -7-dimetoxihomolicorina; enquanto na fração AcOEt foram isolados trisfaeridina, tazetina, pretazetina e 11-hidroxivitatina.

Todos os alcaloides isolados, nas duas espécies, já estão devidamente identificados e caracterizados na literatura.

Com relação aos ensaios de citotoxicidade, os valores de CI_{50} obtidos para todas as frações enriquecidas, das duas espécies, caracterizam as mesmas como biologicamente ativas (capazes de induzir citotoxicidade). No caso da fração AcOEt/MeOH (3:1) é provável que a ação citotóxica esteja relacionada a algum outro composto presente, de natureza não-alcaloídica, uma vez que nem a análise preliminar por CG-EM nem os inúmeros testes com os reagentes de Dragendorff e de Mayer acusaram a presença de alcaloides.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram licorina e pretazetina como os alcaloides mais ativos contra as diferentes linhagens celulares testadas, exibindo ação tempo- e concentração-dependente, além de se mostrarem genotóxicos e capazes de induzir apoptose pela via da caspase-3, resultado este condizente com os estudos de *docking* molecular, onde estes compostos se apresentaram entre os de maior afinidade de ligação e coerentes com os valores K_i calculados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; ASTER, E. V.; COTRAN, R. S.; FAUSTO, N.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins & Cotran Patologia**. Bases patológicas das doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- ABDEL-HALIM, O. B.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. New crinine-type alkaloids with inhibitory effect on induction of inducible nitric oxide synthase from *Crinum yemense*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1119-1124, 2004.
- ABOU-DONIA, A. H.; AMER, M. E.; DARWISH, F. A.; KASSEM, F. F.; MAMMODA, H. M.; ABDEL-KADER, M. S.; ZHOU, B-N., KINGSTON, D. G. I. Two new alkaloids of the crinane series from *Pancratium sickenbergeri*. **Planta Medica**, v. 68, p. 379-381, 2002.
- ADEWUSI, E. A.; FOUCHE, G.; STEENKAMP, V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 572-578, 2012.
- ADRAIN, C.; MURPHY, B. M.; MARTIN, S. J. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4663-4673, 2005.
- AHMAD, K.; BALARAMNAVAR, V. M.; BAIG, M. H.; SRIVASTAVA, A. K.; KHAN, S.; KAMAL, M. A. Identification of potent caspase-3 inhibitors for treatment of multi-neurodegenerative diseases using pharmacophore modeling and docking approaches. **CNS & Neurological Disorders – Drug Targets**, v. 13, n. 8, p. 1346-53, 2014.
- ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: **Plantas Medicinais** [online]. 3.ed. Salvador: EDUFBA, 2011, p. 34-66.
- ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A.; REINA, L. Del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.
- ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.
- ALVES-ARAÚJO, A. **Morfologia de Amaryllidaceae S.S. nativas do Nordeste Brasileiro**. 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.

AMARAL, A. C. **Amaryllidaceae Jaume St.-Hil.:** levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação *in vitro*. 2007. 114p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. C. *Habranthus* (Amaryllidaceae) do Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 203-220, 2015.

ANTHONY, D. A.; ANDREWS, D. M.; WATT, S. V.; TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. **Immunological Reviews**, v. 235, n. 1, p. 73-92, 2010.

ANTOUN, M. D.; MENDOZA, N. T.; RIOS, Y. R. Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 8, p. 1423-1425, 1993.

ARRIGONI, J. Ascorbate system in plant development. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 4, p. 407-419, 1994.

ARRIGONI, O.; ARRIGONI, L. R.; CALABRESE, G. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. **Nature**, v. 256, p. 513-514, 1975.

ARRIGONI, O.; CALABRESE, G.; De GARA, L.; BITONTI, M. B.; LISO, R. Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, p. 302-308, 1997.

Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software (AMDIS ver. 2.64.) (2005): National Institute of Standards and Technology (NIST), Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD (USA).

BASTIDA, J.; BERKOV, S.; TORRAS, L.; PIGNI, N. B.; ANDRADE, J. P.; MARTÍNEZ, V.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**. Índia: Diego Muñoz-Torrero, 2011. p. 65-100.

BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 63, p. 87-179, 2006.

BERKOV, S.; CODINA, C.; BASTIDA, J. The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds. In: RAO, V. (Ed.). **Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health**. InTech, p. 235-254, 2012.

BHADRA, K.; KUMAR, G. S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 31, p. 821-862, 2011.

BIELSKA, E.; LUCAS, X.; CZERWONIEC, A.; KASPRZAK, J. M.; KAMINSKA, K. H.; BUJNICKI, J. M.; Virtual screening strategies in drug design – methods and applications, **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 3, p. 249-264, 2011.

BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725-731, 2003.

BORES, G. M.; HUGER, F. P.; PETKO, W.; MUTLIB, A. E.; CAMACHO, F.; RUSH, D. K.; SELK, D. E.; WOLF, V.; KOSLEY, R. W.; DAVIS, L.; VARGAS, H. M. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 227, n. 2, p. 728-738, 1996.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Câncer. Bases do Tratamento do Câncer – Capítulo 6. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Instituto Nacional de Câncer. 3.ed. atual. amp. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31).

BRASIL. **Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

BRENT AND BECKYS BULBS. ***Lycoris radiata***. Disponível em: <<https://www.brentandbeckysbulbs.com/Lycoris/radiata/Spider-or-Hurricane-Lily>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

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

BU'LOCK, J. D. **The Biosynthesis of Natural Products**. McGraw-Hill: London. p.185, 1965.

CABEZAS, F.; ARGOTI, J.; MARTINEZ, S.; CODINAT, C.; BASTIDA, J.; VILADOMAT F. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. **Scientia et Technica**, v. 33, p. 237-241, 2007.

- CABEZAS, F.; CODINA, C.; BASTIDAS, J.; VILADOMAT, F. Algunas especies colombianas de Amaryllidaceae como fuentes potenciales de inhibidores de enzimas. **Universidad del Cauca**, Departamento de Química, p. 1-3, 2009.
- CAMPBELL, W. E.; NAIR, J. J.; GAMMON, D. W.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P. J.; ALBRECHT, C. F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v. 64, p. 91-93, 1998.
- CAMPOS, C.; ROCHA, N. B.; VIEIRA, R. T.; ROCHA, S. A.; TELLES-CORREIA, D.; PAES, F.; YUAN, T.; NARDI, A. E.; ARIAS-CARRIÓN, O.; MACHADO, S.; CAIXETA, L. Treatment of cognitive deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. **Psiquiatria Danubina**, v. 28, p. 2-12, 2016.
- CARVALHO, K. R.; SILVA, A. B.; TORRES, M. C. M.; PINTO, F. C. L.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. D.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Cytotoxic Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 1976-1980, 2015.
- CASTILLO, W. O.; ARISTIZABAL-PACHON, A. F.; TAKAHASHI, C. Amaryllidaceae perspectives in Alzheimer's disease. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 6, n. 7, p. 27-33, 2016.
- CEDRÓN, J. C.; GITIÉRREZ, D.; FLORES, N.; RAVELO, Á. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 20, p. 5464-5472, 2012.
- CHENG, H.; HONG, B.; ZHOU, L.; ALLEN, J. E.; TAI, G.; HUMPHREYS, R.; DICKER, D. T.; LIU, Y. Y.; EL-DEIRY, W. S. Mitomycin C potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent upregulation of death receptors: evidence for the role of c-Jun N-terminal kinase activation. **Cell Cycle**, v. 11, p. 3312-3323, 2012.
- CNCFlora. *Griffinia gardneriana*. In: **Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2**. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/porta/pt-br/profile/Griffinia gardneriana](http://cncflora.jbrj.gov.br/porta/pt-br/profile/Griffinia_gardneriana)>. Acesso em: 14 fev. 2018.
- COHEN, G. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 326, n. 1, p. 1-16, 1997.
- CÓRDOBA-PEDREGOSA, M. C.; GONZÁLEZ-REYES, J. A.; CAÑADILLAS, M. S.; NAVAS, P.; CÓRDOBA, F. Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1119-1125, 1996.
- COSTA, S. S.; DE MELO, G. O. Produtos Naturais para o tratamento da doença de Alzheimer: Promessa e Desafio. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, p. 41-47, 2013.
- CRAIN, W. O.; WILDMAN, W. C.; ROBERTS, J. D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of nicotine, quinine, and some Amaryllidaceae alkaloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 4, p. 990-994, 1971.

CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**, v. 193, p. 10-21, 2003.

Dassault Systèmes BIOVIA. **BIOVIA Discovery Studio Visualizer**. Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.

DE ANDRADE, J. P. **Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)**. 2014. 190p. Tese (Doutorado) – Universidade de Barcelona, Barcelona, 2014.

DE ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; GUOU, Y.; BERKOV, S.; REYES-CHILPAC, R.; AMRANI, A. E.; ZUANAZZI, J. A.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 40, n. 2, p. 83-98, 2012.

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

DEL GIUDICE, A.; MASSARDO, D. R.; MANNA, F.; KOLTOVAYA, N.; HARTINGS, H.; DEL GIUDICE, L.; WOLF, K. Correlation of resistance to the alkaloid lycorine with the degree of suppressiveness in petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 382-384, 1997.

DELLA TORRE, A.; ALBUQUERQUE, L. B. L.; FARRAPO, N. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; SANTOS, M. G.; TAVARES, R. V. S.; RODAS, A. C. D.; DAL BELO, C. A.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; GROPPPO, F. C.; LOPES, P. S. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 190-198, 2011.

DING, Y.; QU, D.; ZHANG, K. M.; CANG, X. X.; KOU, Z. N.; XIAO, W.; ZHU, J. B. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 1, p. 53-100, 2017.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.

DUTILH, J. H. A. Amaryllidaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; MARTINS, S. E.; KIRIZAWA, M.; GIULIETTI, A. M. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 4, p. 244-256, 2005.

DUTILH, J. H. A. **Revisão manuscrita da família Alliaceae, Amaryllidaceae**. APNE-CNIP, Recife, Pernambuco, 2003.

DUTILH, J. H.; FERNANDEZ, E. P.; PENEDO, T. S. A.; MORAES, M. M. V.; MESSINA, T. **Livro Vermelho Flora do Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100p.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENGEL, T. B. J. **Estudos cariotípicos em *Griffinia* Ker Gawl. e espécies relacionadas (Amaryllidaceae)**. 2014. 63p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

EHRMAN, J. K.; GORDON, P. M.; VISICH, P. S.; KETAYIAN, S. J. **Fisiologia do exercício clínico**. 3.ed. São Paulo: Phorte, 2013.

EVIDENTE, A. Identification of 11-Hydroxyvittatine in *Sternbergia lutea*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 168-169, 1986.

EVIDENTE, A.; KIREEV, A. S.; JENKINS, A. R.; ROMERO, A. E.; STEELANT, W. F. A.; SLAMBROUCK, S. V.; KORNIENKO, A. Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. **Planta Medica**, v. 75, p. 501-507, 2009.

EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 449-459, 2009.

EVIANNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FENG, T.; WANG, Y. Y.; SU, J.; LI, Y.; CAI, X. H.; LUO, X. D. Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 1, p. 178-183, 2011.

FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 15-26, 2001.

FILGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de caminha. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

FOWLER, P.; WHITWELL, J.; JEFFREY, L.; YOUNG, J.; SMITH, K.; KIRKLAND, D. Etoposide; colchicine; mitomycin C and cyclophosphamide tested in the *in vitro* mammalian cell micronucleus test (MNvit) in Chinese hamster lung (CHL) cells at Covance laboratories; Harrogate UK in support of OECD draft Test Guideline 487. **Mutation Research**, v. 702, p. 175-80, 2010.

FRONZA, M.; MURILLO, R.; ŚLUSARCZYK, S.; ADAMS, M.; HAMBURGER, M.; HEINZMANN, B.; LAUFER, S.; MERFORT, I. *In vitro* cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 19, n. 16, p. 4876-4881, 2011.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, 2006.

FURUSAWA, E.; FURUSAWA, S. Effect of pretazettine and viva-natural, a dietary seaweed extract, on spontaneous AKR leukemia in comparison with standard drugs. **Oncology**, v. 45, n. 3, p. 180-186, 1988.

FURUSAWA, E.; FURUSAWA, S. Therapeutic potentials of pretazettine, standard anticancer drugs, and combinations on subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma. **Chemotherapy**, v. 32, n. 6, p. 521-529, 1986.

FURUSAWA, E.; FURUSAWA, S.; LEE, J. Y. B.; PATANAVANICH, S. Therapeutic activity of pretazettine, a narcissus alkaloid on Rauscher leukemia: Comparison with tazettine and streptonigrin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 152, p. 186-191, 1976.

FURUSAWA, E.; FURUSAWA, S.; SOKUGAWA, L. Therapeutic activity of pretazettine, standard drugs, and the combinations on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in mice. **Chemotherapy**, v. 29, n. 4, p. 294-302, 1983.

FURUSAWA, E.; IRIE, H.; COMBS, D.; WILDMAN, W. C. Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids. **Chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 36-45, 1980.

FURUSAWA, E.; LUM, M. K. M.; FURUSAWA, S. Therapeutic activity of pretazettine on Ehrlich ascites carcinoma: adjuvant effect on standard drugs in ABC regimen. **Chemotherapy**, v. 27, p. 277-286, 1981.

GASPARINI, L. S.; MACEDO, N. D.; PIMENTEL, E. F.; FRONZA, M.; LACERDA JUNIOR, V.; BORGES, W. S.; COLE, E. R.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; LENZ, D. *In vitro* cell viability by CellProfiler® software as equivalent to MTT assay. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, p. 365-369, 2017.

GERAN, R. I.; GREENBERG, N. H.; MCDONALD, M. M.; SCHUMACHER, A. M.; ABBOT, B. J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumour and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 3, n. 1, p. 17-19, 1972.

GHAVRE, M.; FROESE, J.; POUR, M.; HUDLICKY, T. Synthesis of Amaryllidaceae Constituents and Unnatural Derivatives. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 19, p. 5642-5691, 2016.

GHOSAL, S.; KUMAR, Y.; SINGH, S. Glucosyloxy alkaloids from *Pancratium biflorum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1167-1171, 1984.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2141-2156, 1985.

GHOSAL, S.; SHANTHY, A.; KUMAR, A.; KUMAR, Y. Palmilycorine and lycoride: acyloxy and acylglucosyloxy alkaloids from *Crinum asiaticum*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2703-2706, 1985.

GIORDANI, R. B.; DE ANDRADE, J. P.; VERLI, H.; DUTILH, J. H.; HENRIQUES, A. T.; BERKOV, S.; BASTIDA, J.; ZUANAZZIA, J. A. S. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem.(Amaryllidaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 668-672, 2011.

GOODARZI, M.; FREITAS, M. P.; FERREIRA, E. B. Influence of Changes in 2-D Chemical Structure Drawings and Image Formats on the Prediction of Biological Properties Using MIA-QSAR, **Qsar e Combinatorial Science**, v. 28, n. 4, p. 458-464, 2009.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HABLI, Z.; TOUMIEH, G.; FATFAT, M.; RAHAL, O. N.; GALI-MUHTASIB, H. Emerging cytotoxic alkaloids in the battle against cancer: overview of molecular mechanisms. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1-22, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 44, p. 646-674, 2011.

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017.

HARTWELL, J. L. Plants used against câncer: A survey. **Lloydia**, v. 30, p. 379-436, 1967.

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. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 2485-2492, 2012.

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

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES et al. (organiz.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2001. p. 651-666.

HERBERT, W. H. **Amaryllidaceae**. London: James Rid and Sons, 1837.

HOHMANN, J.; FORGO, P.; MOLNÁR, J.; WOLFARD, K.; MÓLNAR, A.; THALHAMMER, T.; MÁTHÉ, J.; SHARPES, D. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 454-457, 2002.

HOSHINO, O. The Amaryllidaceae alkaloids. In: CORDELL, G.A. **The Alkaloids: chemistry and biology**. London: Academic Press INC., v. 51, chap. 4, p. 323-417, 1998.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 181-199, 2006.

HSIEH, M. J.; CHEN, M. K.; CHEN, C. J.; HSIEH, M. C.; LO, Y. S.; CHUANG, Y. C.; CHIOU, H. L.; YANG, S. F. Glabridin induces apoptosis and autophagy through JNK1/2 pathway in human hepatoma cells. **Phytomedicine**, v. 23, p. 359-366, 2016.

HUA, D. H.; SAHA, S.; TAKEMOTO, D. J. Anticancer activities of 2,5,8,9-substituted 6-oxo-1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthridines on multi-drug-resistant phenotype cells. **Anticancer Research**, v. 17, n. 4A, p. 2435-2441, 1997.

HULCOVÁ, D.; BREITEROVÁ, K.; ZEMANOVÁ, L.; SIATKA, T.; ŠAFRATOVÁ, M.; VANĚČKOVÁ, N.; HOŠŤÁLKOVÁ, A.; WSÓL, V.; CAHLÍKOVÁ, L. AKR1C3 Inhibitory Potency of Naturally-occurring Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 2, p. 245-246, 2017.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **World Cancer Report 2014**. Lyon: IARC Press, 2014.

INCA (Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128p.

JACOBSON, T. K. B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, J. G.; KLIEMANN, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

JÄNICKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **Breast cancer research and treatment**, v. 117, n. 1, p. 219-221, 2009.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Effect of processing on the volatile composition of the clarified Fuji apple juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

JEFFS, P. W. The alkaloids of the Amaryllidaceae, Part X. Biosynthesis of haemantamina. **Proceeding of the Chemical Society**, p. 80-81, 1962.

JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Report**, v. 30, n. 6, p. 849-868, 2013.

KANG, J.; ZHANG, Y.; CAO, X.; FAN, J.; LI, G.; WANG, Q.; DIAO, Y.; ZHAO, Z.; LUO, L.; YIN, Z. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. **International Immunopharmacology**, v. 12, p. 249-256, 2012.

KARADENIZ, H.; GULMEZ, B.; SAHINCI, F.; ERDEM, A.; KAYA, G. I.; UNVER, N.; KIVCAK, B.; OZSOZ, M. Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, n. 2, p. 295-302, 2003.

KAYA, G. I.; UZUN, K.; BOZKURT, B.; ONUR, M. A.; SOMER, N. U.; GLATZEL, D. K.; FÜRST, R. Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: *Galanthus cilicicus*. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 256-260, 2017

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KHACHA-ANANDA, S.; TRAGOOLPUA, K.; CHANTAWANNAKUL, P.; TRAGOOLPUA, Y. Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. **Investigational New Drugs**, v. 34, p. 707-722, 2016.

KILGORE, M. B.; KUTCHAN, T. M. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme Discovery. **Phytochemistry Reviews**, v.15, p. 317-337, 2016.

KIM, Y. H.; PARK, E. J.; PARK, M. H.; BADARCH, U.; WOLDEMICHAEL, G. M.; BEUTLER, J. A. Crinamine from *Crinum asiaticum* var. japonicum inhibits hypoxia inducible factor-1 activity but not activity of hypoxia inducible factor-2. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2140-2142, 2006.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 1982-2014, 2008.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 1982-2014, 2008.

KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, p. 312-328, 2007.

KUMAR, M. R.; AITHAL, K.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO, B. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 2, p. 242-250, 2009.

KUMAR, S. P.; JHA, P. C. Multi-Pharmacophore Modeling of Caspase-3 Inhibitors using Crystal, Dock and Flexible Conformation Schemes. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 21, 2018.

KURINNA, M. S.; TSAO, C. C.; NICA, A. F.; JIFFAR, T.; RUVOLO, P. P. Ceramide promotes apoptosis in lung cancer-derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. **Cancer Research**, v. 64, n. 21, p. 7852-7856, 2004.

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 anti-tumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6244-6256, 2009.

LI, X.; ZHAO, T.; CHENG, D.; CHU, C.; TONG, S.; YAN, J.; LI, Q. Y. Synthesis and biological activity of some bile acid-based camptothecin analogues. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3761-3776, 2014.

LI, Y.; LIU, J.; TANG, L. J.; SHI, Y. W.; REN, W.; HU, W. X. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. **Oncology Reports**, v. 17, p. 377-384, 2007.

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

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

LIU, J.; HU, W. X.; HE, L. F.; YE, M.; LI, Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. **FEBS Letters**, v. 578, n. 3, p. 245-250, 2004.

LIU, J.; HU, W. X.; HE, L. F.; YE, M.; LI, Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. **FEBS Letters**, v. 578, p. 245-250, 2004.

LIU, X. S.; JIANG, J.; JIAO, X. Y.; WU, Y. E.; LIN, J. H.; CAI, Y. M. Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 274, p. 16-24, 2009.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 2521-2529, 2002.

LORGE, E.; HAYASHI, M.; ALBERTINI, S.; KIRKLAND, D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test 1. **Mutation Research**, v. 655, p. 1-3, 2008.

LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 147-154, 2002.

LUO, Z.; WANG, F.; ZHANG, J.; LI, X.; ZHANG, M.; HAO, X.; XUE, Y.; LI, Y.; HORGAN, F. D.; YAO, G.; ZHANG, Y. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2113-2120, 2012.

MA, T. C.; LANGLEY, B.; KO, B.; WEI, N.; GAZARYAN, I. G.; ZAREEN, N.; YAMASHIRO, D. J.; WILLS, D. E.; RATAN, R. R. A screen for inducers of p21(waf1/cip1) identifies HIF prolyl hydroxylase inhibitors as neuroprotective agents with antitumor properties. **Neurobiology of Disease**, v. 49, p. 13-21, 2013.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RONDONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAÍDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.

MARY, A.; RENKO, D. Z.; GUILLOU, C.; THAL, C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure–Activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 10, p. 1835-1850, 1998.

MASI, M.; FROLOVA, L. V.; YU, X.; MATHIEU, V.; CIMMINO, A.; DE CARVALHO, A.; KISS, R.; ROGELJ, S.; PERTSEMLIDIS, A.; KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla* quail, with activity against drug-resistant cancer. **Fitoterapia**, v. 102, p. 41-48, 2015.

MASSON, D.; TSCHOPP, J. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 16, p. 9069-9072, 1985.

MATSUBARA, L. S.; FERREIRA, A. L. Cardiomiopatia tóxicas. In: NOBRE, F.; SERRANO Jr., C. V. (Ed.). **Tratado de Cardiologia SOCESP**. Barueri: Manole, 2005.

MC GEE, M. M.; HYLAND, E.; CAMPIANI, G.; RAMUNNO, A.; NACCI, V.; ZISTERER, D. M. Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. **FEBS letters**, v. 515, n. 1, p. 66-70, 2002.

MCNULTY, J.; NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GRIFFIN, C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. **Phytochemistry**, v. 70, p. 913-919, 2009.

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

MEEROW, A. W. Alliaceae, Amaryllidaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. Wm.; HEALD, S. V. (Eds.). **Flowering plants of the Neotropics**. The New York Botanical Garden, New Jersey. p. 408-412. 2004.

MEEROW, A. W.; SNIJMAN, D. A. Amaryllidaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). **The families and genera of vascular plants**. Monocotyledons – Lilianae (except Orchidaceae). Springer-Verlag: Hamburg, 1998. p. 83-110.

MILLER, W. H. Perspective: Quantum or classical coherence? **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, p. 1-6, 2012.

MIN, B. S.; GAO, J. J.; NAKAMURA, N.; KIM, Y. H.; HATTORI, M. Cytotoxic alkaloids and a flavan from the bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 1217-1219, 2001.

MOHAMMAD, R. M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.; HSU, H. Y.; LIN, L. T.; SIEGELIN, M. D.; FIMOIGNARI, C.; KUMAR, N. B.; DOU, Q. P.; YANG, H.; SAMADI, A. K.; RUSSO, G. L.; SPAGNUOLO, C.; RAY, S. K.; CHAKRABARTI, M.; MORRE, J. D.; COLEY, H. M.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; HELFERICH, W. G.; YANG, X.; BOOSANI, C. S.; GUHA, G.; BHAKTA, D.; CIRIOLO, M. R.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; MOHAMMED, S. I.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; HALICKA, D.; NOWSHEEN, S.; AZMI, A. S. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S78-S103, 2015.

MOHAN, K.; DEEPA, R. J. Alkaloids as anticancer agents. **Annals of Phytomedicine**, v. 1, n. 1, p. 46-53, 2012.

MOL 3.0. **Tecido muscular**. Disponível em: <<http://mol.icb.usp.br/index.php/8-8-tecido-muscular/>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

MOSMANN, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

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

NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; VAN STADEN, J. Cytotoxic Agents of the Crinane Series of Amaryllidaceae Alkaloids. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 12, p. 1677-1688, 2012.

NAIR, J. J.; CAMPBELL, W. E.; GAMMON, D. W.; ALBRECHT, C. F.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Crinum delagoense*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2539-2543, 1998.

NAIR, J. J.; RÁROVÁ, L.; STRNAD, M.; BASTIDA, J.; VAN STADEN, J. Mechanistic insights to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 171-182, 2015.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 1193-1210, 2014.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 62, p. 262-275, 2013.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J.; BASTIDA, J. Apoptosis-Inducing Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 161-185, 2016a.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J.; BASTIDA, J. Cytotoxic alkaloids constituents of the Amaryllidaceae. In: RAHMAN, A.-U. **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016b; v. 49, p. 107-156.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-641, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NICHOLSON, D. W.; ALI, A.; THORNBERRY, N. A.; VAILLANCOURT, J. P.; DING, C. K.; GALLANT, M.; GAREAU, Y.; GRIFFIN, P. R.; LABELLE, M.; LAZEBNIK, Y. A.; MUNDAY, N. A.; RAJU, S. M.; SMULSON, M. E.; YAMIN, T.-T.; YU, V. L.; MILLER, D. K. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. **Nature**, v. 376, p. 37-43, 1995.

NOBLE, R. L. The discovery of the vinca alkaloids--chemotherapeutic agents against cancer. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 68, p. 1344-1351, 1990.

ODYSSEY BULBS. *Galanthus elwesii* "Polar Bear". Disponível em: <<https://odysseybulbs.com/iristomoraea.html>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

OECD (Guideline for the Testing of Chemicals). **Test N° 487: *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, 2010.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

OLIVEIRA, R. **Flora da Cadeia do Espinhaço: *Zephyranthes* Herb. & *Habranthus* Herb.** (Amaryllidaceae). 2006. 165p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, R. S.; ANTOINETTE, J. H. A.; SANO, P. T. *Habranthus* (Amaryllidaceae) da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 3, p. 491-503, 2010.

OVERMAN, L. E.; SHIM, J. Synthesis applications of cationic aza-cope rearrangements. 25. Total synthesis of Amaryllidaceae alkaloids of the 5,11-methanomorphanthridine type – efficient total syntheses of (-)-pancracine And (+ -)-pancracine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 4662-4672, 1993.

PACIFIC ESSENCES®. ***Narcissus pseudonarcissus***. Disponível em: <<https://www.pacificessences.com/narcissus>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

PAUL, A. T.; GOHIL, V. M.; BHUTANI, K. K. Modulating TNF- α signaling with natural products. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 725-732, 2006.

PEREIRA, R. H. de S. **Avicena – A viagem da alma**. São Paulo: Perspectiva, 2002.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PHILCHENKOV, A.; ZAVELEVICH, M.; KROCZAK, T.; LOS, M. Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. **Experimental Oncology**, v. 26, n. 2, p. 82-97, 2004

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suppl. 1, p. 45-61, 2002.

PIRNIA, F.; SCHNEIDER, E.; BETTICHER, D. C.; BORNER, M. M. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 9, p. 905-914, 2002.

PODACK, E. R.; YOUNG, J. D.; COHN, Z. A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 82, n. 24, p. 8629-8633, 1985.

RAHMAN, A. U. **Studies in Natural Products Chemistry: Structure and Chemistry (Part F)**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 1999.

RASKIND, M. A. Update on Alzheimer drugs (galantamine). **Neurologist**, v. 9, n. 5, p. 235-40, 2003.

RAVID, T.; TSABA, A.; GEE, P.; RASOOLY, R.; MEDINA, E. A.; GOLDKORN, T. Ceramide accumulation precedes caspase-3 activation during apoptosis of A549 human lung adenocarcinoma cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, n. 6, p. 1082-1092, 2003.

RIBEIRO, L. R.; SALVADOR, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1.ed. Canoas: Ulbra, 2003.

RIBEIRO, M. C. M.; JUNIOR, H. L. Uso tradicional terapêutico de espécies pertencentes ao gênero vegetal *Eucharis* Planchon & Linden (Amaryllidaceae). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, p. 13-22, 2016.

ROCHA NETO, A. C. **Estudos taxonômicos e morfológicos do gênero *Griffinia* Ker Gawl. (Amaryllidaceae)**. 2015. 228p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **INTERAÇÕES**, v. 17, n. 2, p. 267-277, 2016.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 201-223.

SANO, R.; REED, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3460-3470, 2013.

SANTOS, O. J.; TORRES, O. J. M. A evolução da fitoterapia na cicatrização em cirurgia. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 25, n. 3, 2012.

SILVA, A. F. S. da; de ANDRADE, J. P.; BEVILAQUA, L. R. M.; SOUZA, M. M. de; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 148-154, 2006.

SILVA, P. I. C.; DOMINGUES, R. J. S.; FREITAS, J. J. S.; KIETER, K. S.; LEAL, M. A. C.; DE LIMA, A. B.; BORGES, R. S.; BRITO, M. V. H.; SILVA, R. C.; CRUZ, L. J. N.; ARAGAO, E. A. A. **Manual Básico de Oncologia Experimental: Tumor de Ehrlich**. 1. ed. Belém: EDUEPA, 2017. v. 1. 61p.

SILVA, A. F.; ANDRADE, J. P.; MACHADO, K. R. B.; ROCHA, A. B.; APEL, M. A.; SOBRAL, M. E. G.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 882-885, 2008.

SILVEIRA, D. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Guia rápido para a utilização de algumas espécies vegetais. Projeto PPSUS, DF, UnB-Ceilândia Brasília, 2013. 74p.

SIMIZU, S.; TAKADA, M.; UMEZAWA, K.; IMOTO, M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 26900-7, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIMSTEIN, R.; BUROW, M.; PARKER, A.; WELDON, C.; BECKMAN, B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. **Experimental biology and medicine**, v. 228, n. 9, p. 995-1003, 2003.

SLEE, E. A.; HARTE, M. T.; KLUCK, R. M.; WOLF, B. B.; CASIANO, C. A.; NEWMAYER, D. D.; WANG, H. G.; REED, J. C.; NICHOLSON, D. W.; ALNEMRI, E. S.; GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 2, p. 281-292, 1999.

SNIJMAN, D. A.; LINDER, H. P. Phylogenetic relationships, seed characters, and dispersal system evolution in Amaryllideae (Amaryllidaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, p. 362-386, 1996.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

SUAU, R.; GÓMEZ, A. I.; RICO, R. Ismine and related alkaloids from *Lapiedra martinezii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1710-1712, 1990.

SUHADOLNIK, R. J.; FISCHER, A. G.; ZULALIAN, J. The biogenetic origin of the C₆-C₁ unit of lycorine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 22, 1962.

SUTHEESOPHON, K.; NISHIMURA, N.; KOBAYASHI, Y.; FURUKAWA, Y.; KAWANO, M.; ITOH, K.; KANO, Y.; ISHII, H.; FURUKAWA, Y. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). **Journal of Cellular Physiology**, v. 203, p. 387-397, 2005.

Table Curve 2D. **Table Curve 2D (Trial Version 5.01)**. Disponível em: <<http://www.sigmaplot.com/products/tablecurve2d/tablecurve2d.php>>. Acesso em: 01 jun. 2017.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

THE GARDENING BLOG. ***Leucojum aestivum***. Disponível em: <<https://www.thegardeningblog.co.za/plants/directory/bulbs/leucojum/>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

TUROLLA, M. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UNVER, N. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 125-135, 2007.

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

UNVER, N.; KAYA, G. I.; WERNER, C.; VERPOORTE, R.; GOZLER, T. Galanthindole: a new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* spp. *byzantus*. **Planta Medica**, v. 69, p. 869-871, 2003.

VAN GOIETSENOVEN, G.; ANDOLFI, A.; LALLEMAND, B.; CIMMINO, A.; LAMORAL-THEYS, D.; GRAS, T.; ABOU-DONIA, A.; DUBOIS, J.; LEFRANC, F.; MATHIEU, V.; KORNIEENKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroup display activity against apoptosis-resistant cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1223-1227, 2010.

VARGAS, N. R. C.; CEOLIN, T.; SOUZA, A. D. Z.; MENDIETA, M. C.; CEOLIN, S.; HECK, R. M. Plantas medicinais utilizadas na cicatrização de feridas por agricultores da região sul do RS. **Journal of Research: Fundamental Care Online**, v. 6, n. 2, p. 550-560, 2014.

VASCONCELOS, D. A.; LIMA, M. M. O.; ALCOFORADO, G. G. **Plantas medicinais de uso caseiro**: conhecimento popular na região do centro do município de Floriano/PI. V Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação, Maceió, 2010. Anais CONNEPI 2010, 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519- 528, 2005.

VERRI, A. M.; MOURA, A. A.; MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 30, n. 1, p. 55-61, 2017.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; NAIR, J. J.; CAMPBELL, W. E. In: PANDALI, S. G. (Ed.). **Recent Research Developments in Phytochemistry**. Trivandrum: Research Signpost Publishers, v. 1, p. 131-171, 1997.

VILADOMAT, F.; SELLE´S, M.; CODINA, C.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Narcissus asturiensis*. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 583, 1997.

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

WALKER, T. D. The medicines trade in the Portuguese Atlantic World: acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). In: **Social History of Medicine Advanced Access**. Oxford: Oxford University Press, 2013.

WCRF; AICR (World Cancer Research Fund; American Institute for Cancer Research). **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington DC: American Institute for Cancer Research, 2007.

WEI, L.; JIN, X.; CAO, Z.; LI, W. Evodiamine induces extrinsic and intrinsic apoptosis of ovarian cancer cells via the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathways. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 36, p. 353-359, 2016.

WENDT, J.; RADETZKI, S.; VON HAEFEN, C.; HEMMATI, P. G.; GUNER, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DORKEN, B.; DANIEL, P. T. Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. **Oncogene**, v. 25, n. 7, p. 972-980, 2006.

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

WHO (World Health Organization). Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 12, n. 5, p. 366-370, 2002.

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

WU, C. C.; LEE, S.; MALLADI, S.; CHEN, M. D.; MASTRANDREA, N. J.; ZHANG, Z.; BRATTON S. B. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-14, 2016.

YIN, X.; ZHOU, J.; JIE, C.; XING, D.; ZHANG, Y. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. **Life Sciences**, v. 75, n. 18, p. 2233-2244, 2004.

YU, H.; QIU, Y.; PANG, X.; LI, J.; WU, S.; YIN, S.; HAN, L.; ZHANG, Y.; JIN, C.; GAO, X.; HU, W.; WANG, T. Lycorine promotes autophagy and apoptosis via TCRP1/Akt/mTOR Axis inactivation in human hepatocellular carcinoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 12, p. 2711-2723, 2017.

YUI, S.; MIKAMI, M.; KITAHARA, M.; YAMAZAKI, M. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin. **Immunopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 151-162, 1998.

ZHAN, G.; ZHOU, J.; LIU, R.; LIU, T.; GUO, G.; WANG, J.; XIANG, M.; XUE, Y.; LUO, Z.; ZHANG, Y.; YAO, G. Galanthamine, plicamine, and secoplicamine alkaloids from *Zephyranthes candida* and their anti-acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 760-766, 2016.

ZHANG, F. M.; TU, Y. Q.; LIU, J. D.; FAN, X. H.; SHI, L.; HU, X. D.; WANG, S. H.; ZHANG, Y. Q. A general approach to crinine-type Amaryllidaceae alkaloids: total syntheses of (±)-haemanthidine, (±)-pretazettine, (±)-tazettine, and (±)-crinamine. **Tetrahedron**, v. 62, p. 9446-9455, 2006.

ZIMMERMANN, K. C.; GREEN, D. R. How cells die: apoptosis pathways. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 4, p. 99-103, 2001.

ZUPKO, I.; RETHY, B.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, J.; OCSOVSZKI, I.; FALKAY, G. Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. **In vivo**, v. 23, p. 41-48, 2009.

ANEXOS

Anexo I. Autorização para atividades com finalidade científica.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42164-1	Data da Emissão: 02/04/2015 11:10	Data para Revalidação*: 01/05/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Warley de Souza Borges	CPF: 847.577.601-91
Título do Projeto: Estudo de Produtos Naturais Oriundos de plantas do Cerrado e Mata Atlântica: conhecimento químico-biológico aliado a preservação	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta botânica	03/2015	03/2018
2	Estudo químico	03/2015	03/2018

Anexo II. Gradiente de polaridade utilizado na CLV aplicada à fração GGHex.

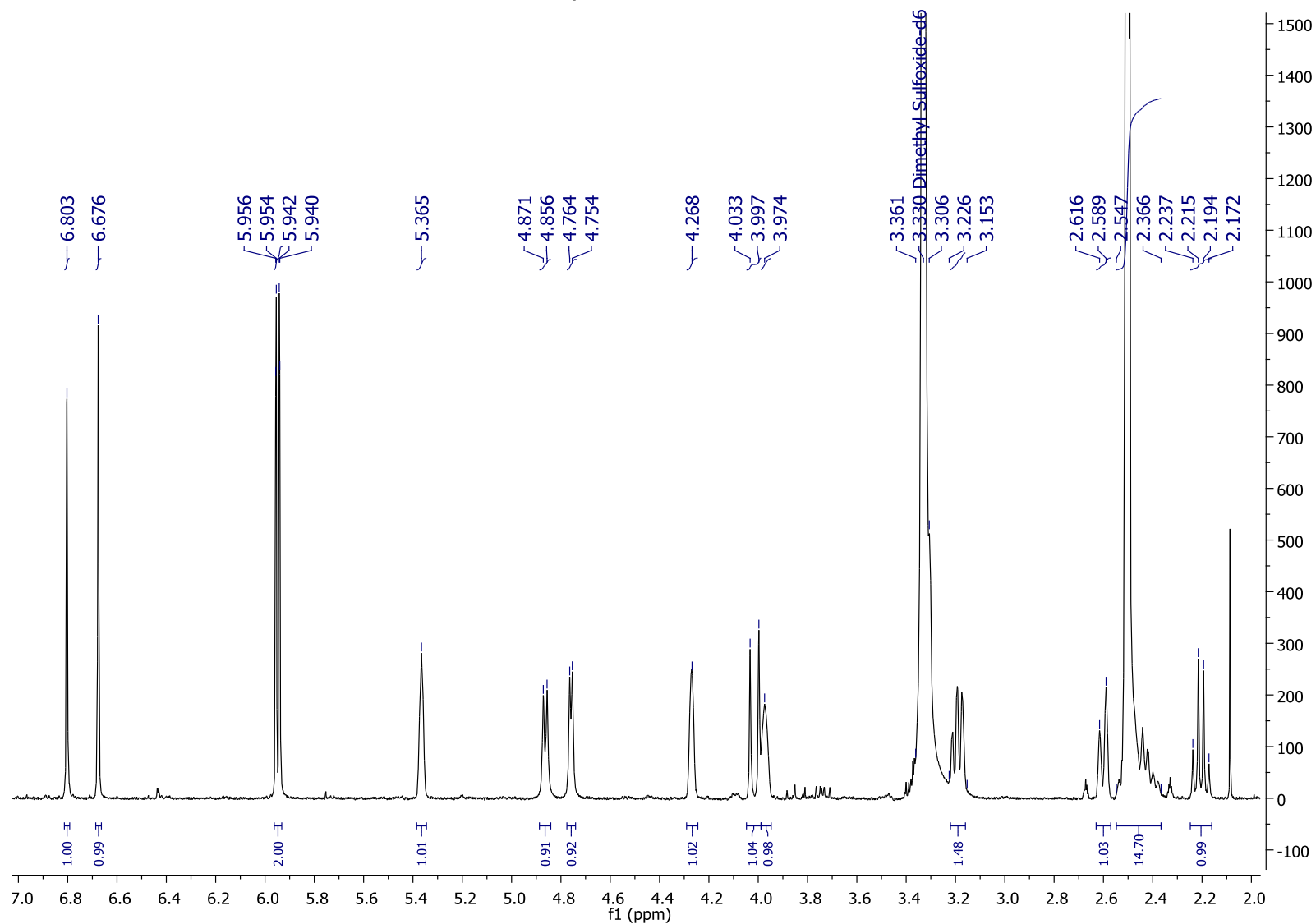
TUBOS	SISTEMA SOLVENTE	
	Hex	AcOEt
1 – 4	100	0
5 – 8	90	10
9 – 12	80	20
13 – 16	70	30
17 – 20	65	35
21 – 24	60	40
25 – 28	55	45
29 – 32	50	50

TUBOS	SISTEMA SOLVENTE		
	<i>n</i> -hexano	<i>n</i> -hexano	CHCl ₃
33 – 36	49	50	1
37 – 40	48	50	2
41 – 44	46	50	4
45 – 48	44	50	6
49 – 52	40	50	10
53 – 56	37	50	13
57 – 60	32	50	18
61 – 64	29	50	21
65 – 68	26	50	24
69 – 72	20	50	30
73 – 76	16	50	34
77 – 80	10	50	40
81 – 84	5	50	45
85 – 88	0	50	50

TUBOS	SISTEMA SOLVENTE	
	AcOEt	MeOH
89 – 92	99	1
93 – 96	98	2
97 – 100	97	3
101 – 104	96	4
105 – 108	95	5
109 – 112	94	6
113 – 116	93	7
117 – 120	92	8
121 – 124	91	9
125 – 128	90	10
129 – 132	85	15
133 – 136	80	20
137 – 140	70	30
141 – 144	50	50

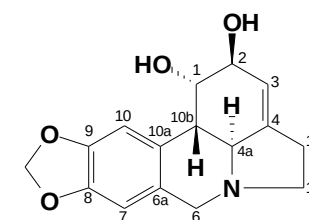
TUBOS	SISTEMA SOLVENTE		
	AcOEt	CH ₂ Cl ₂	MeOH
145 – 161	25	25	50

Anexo III. Espectros de RMN 1D e 2D dos alcaloides isolados.



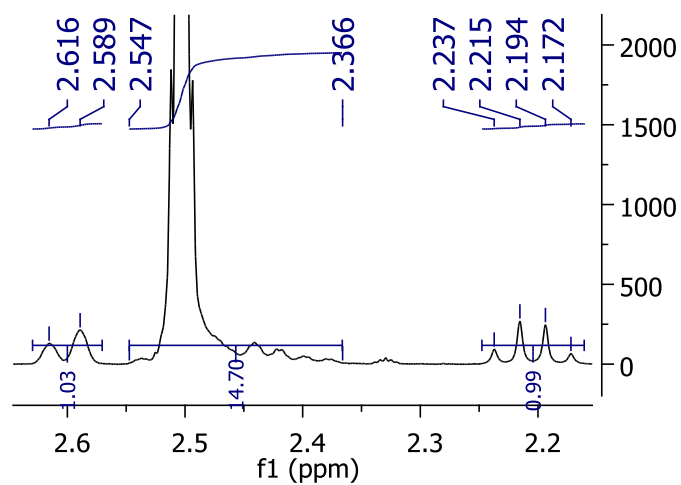
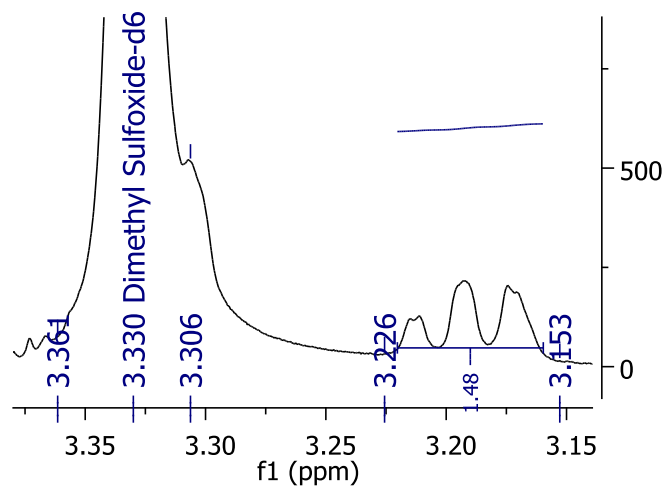
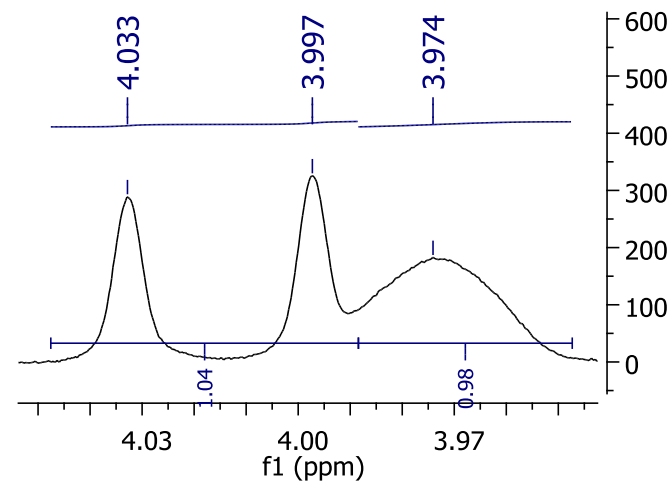
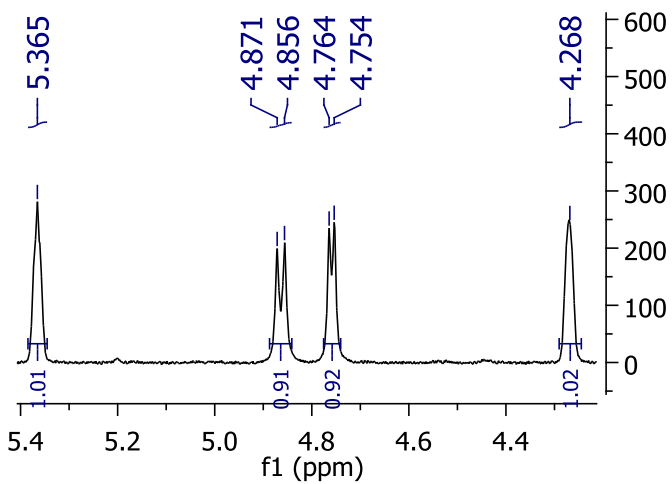
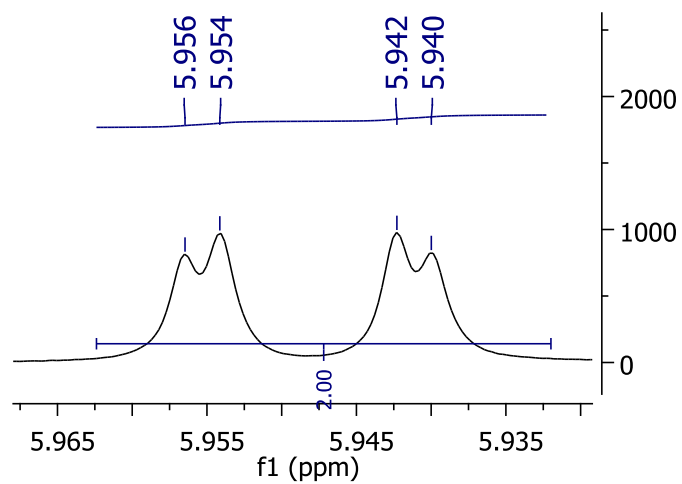
Parâmetros:

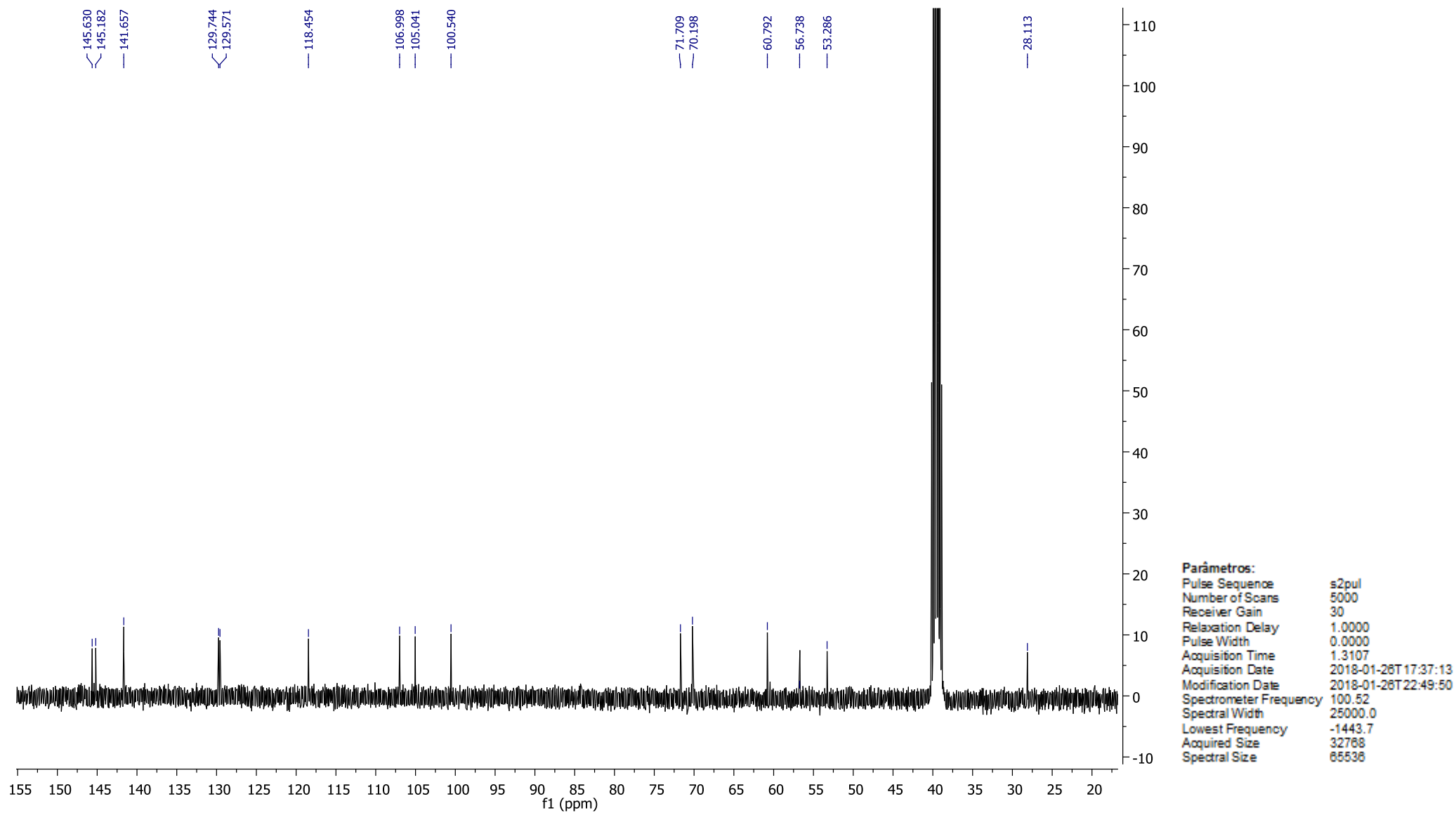
Pulse Sequence	s2pul
Number of Scans	258
Receiver Gain	50
Relaxation Delay	1.1881
Pulse Width	0.0000
Acquisition Time	3.8339
Acquisition Date	2018-01-26T17:15:36
Modification Date	2018-01-26T19:37:02
Spectrometer Frequency	399.73
Spectral Width	6410.3
Lowest Frequency	-806.8
Acquired Size	24578
Spectral Size	65536



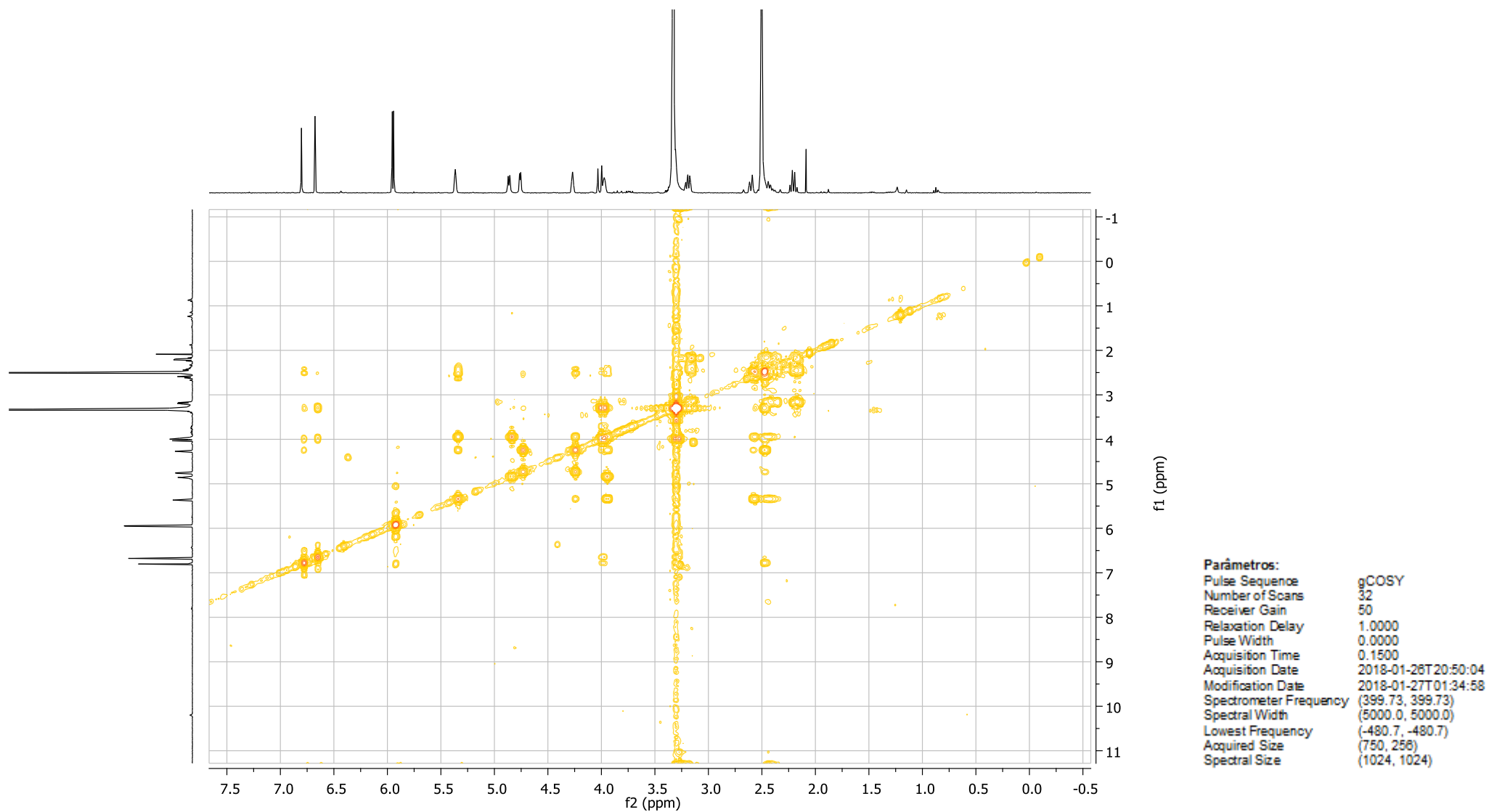
III.1. Espectro de RMN de ^1H do composto licorina (DMSO- d_6 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.

Expansões:

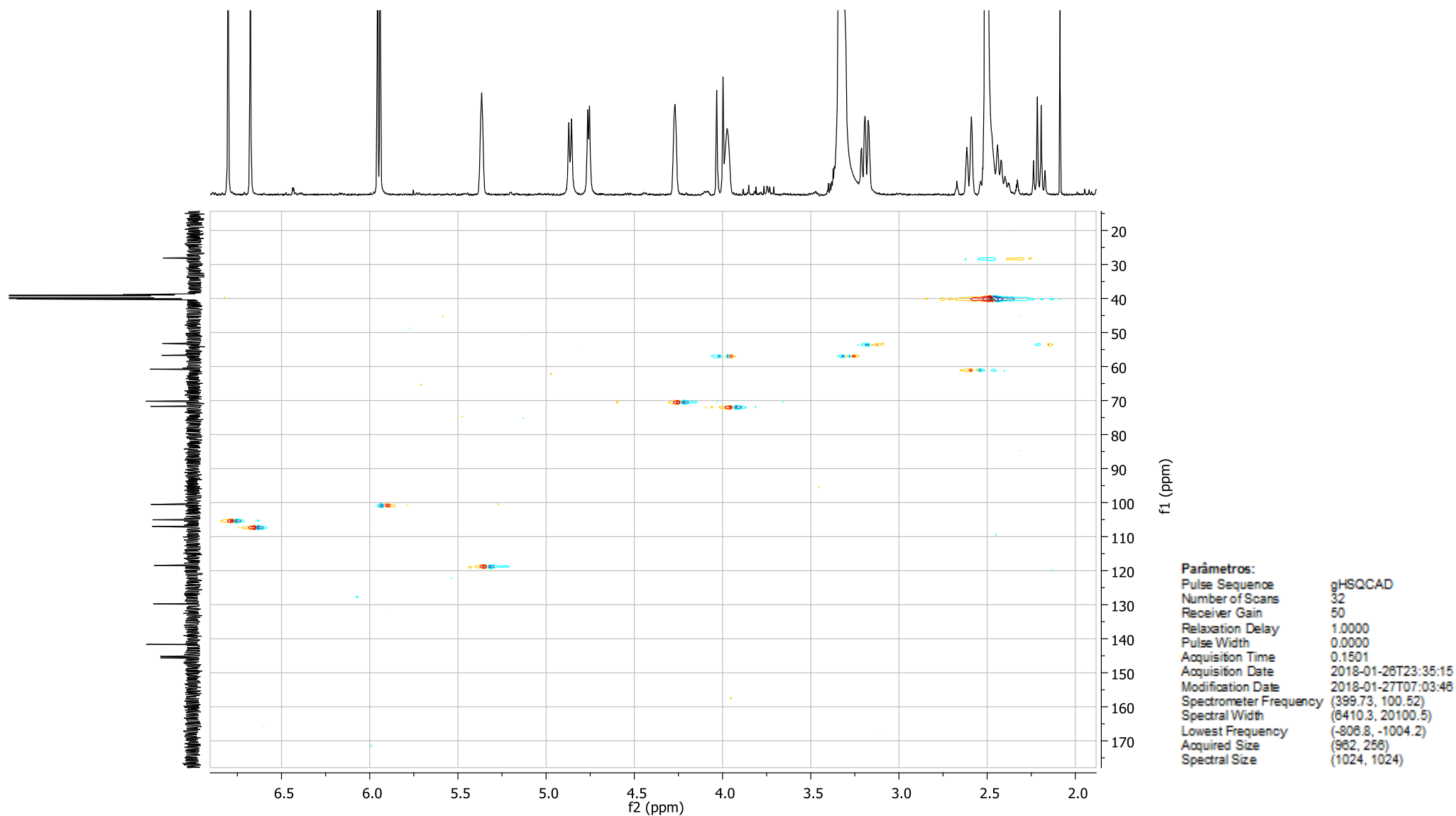




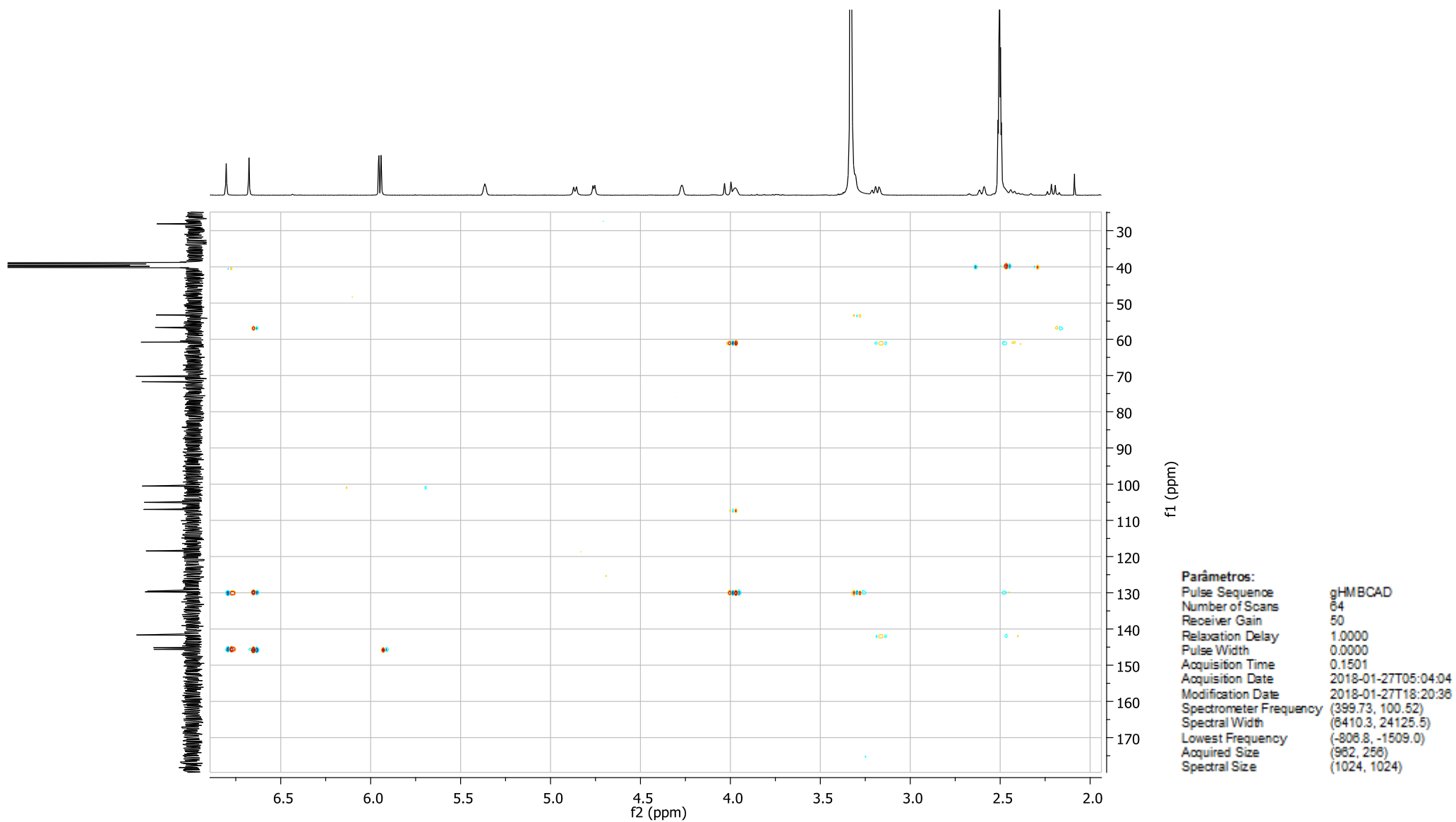
III.2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **licorina** (DMSO- d_6 , 400 MHz, 26°C).



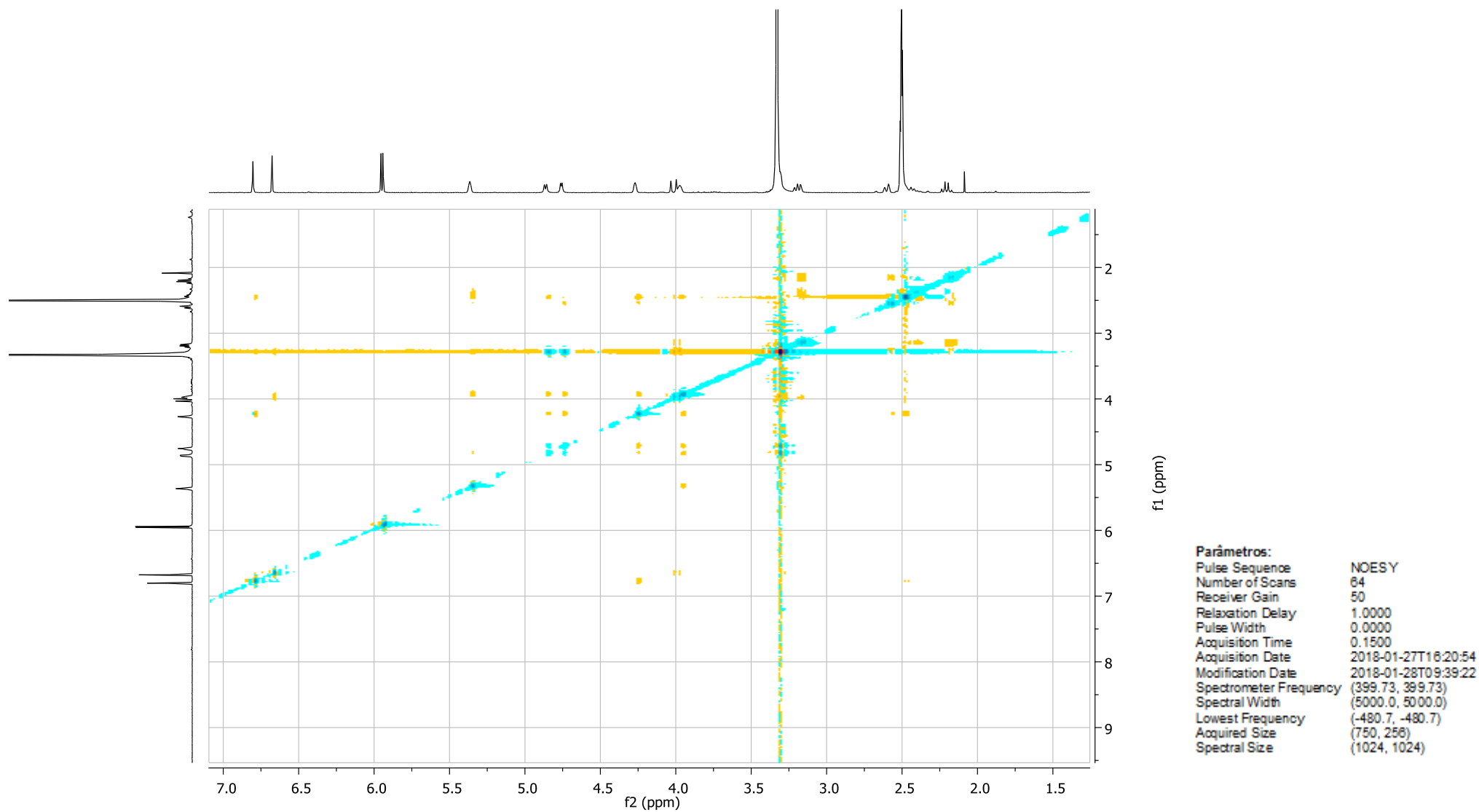
III.3. Espectro de gCOSY do composto **licorina** (DMSO-d₆, 400 MHz, 26°C).



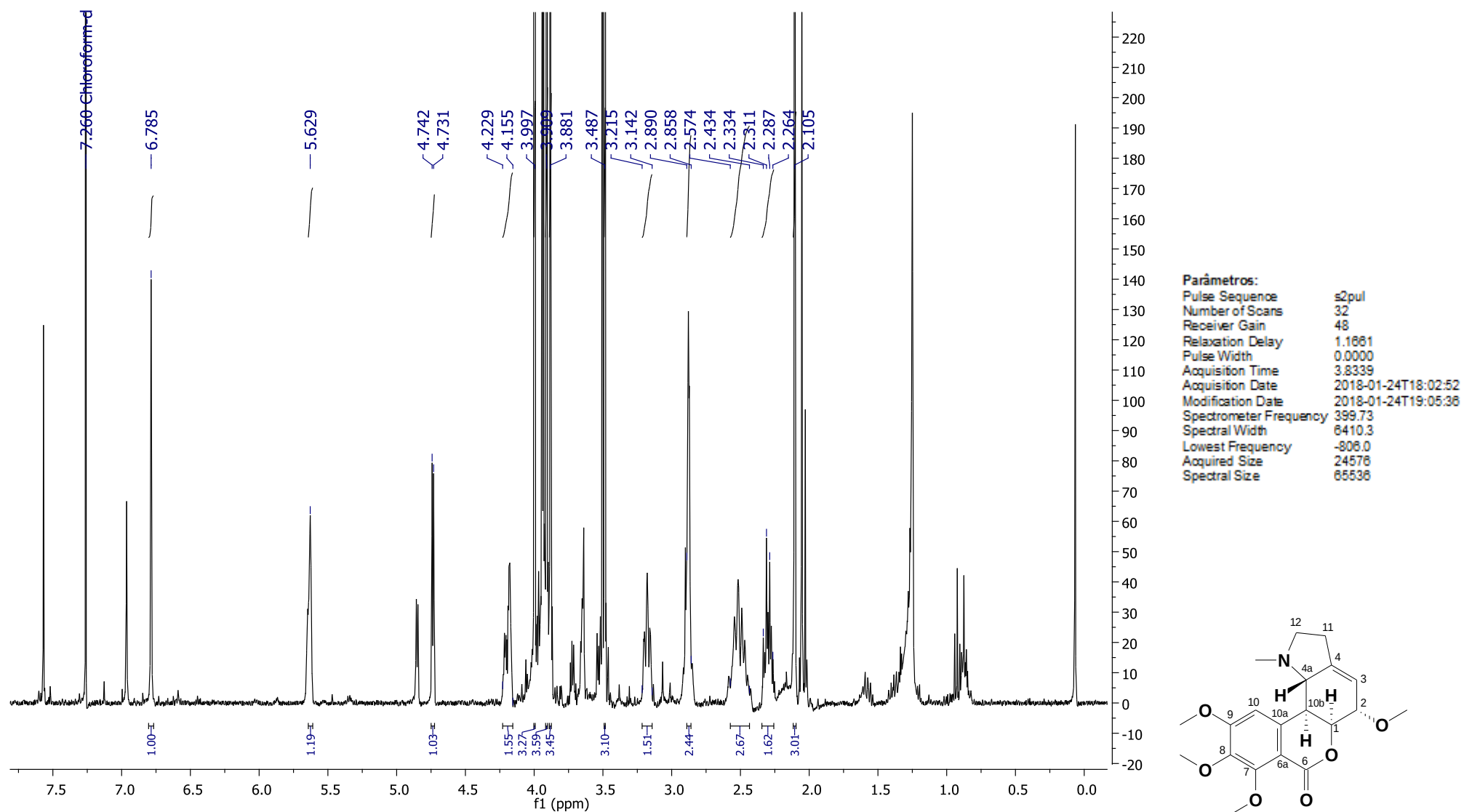
III.4. Mapa de Contornos gHSQC do composto **licorina** (DMSO-d₆, 400 MHz, 26°C).



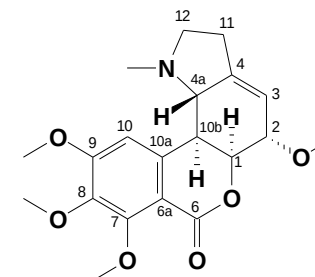
III.5. Mapa de Contornos gHMBC do composto **licorina** (DMSO-d₆, 400 MHz, 26°C).



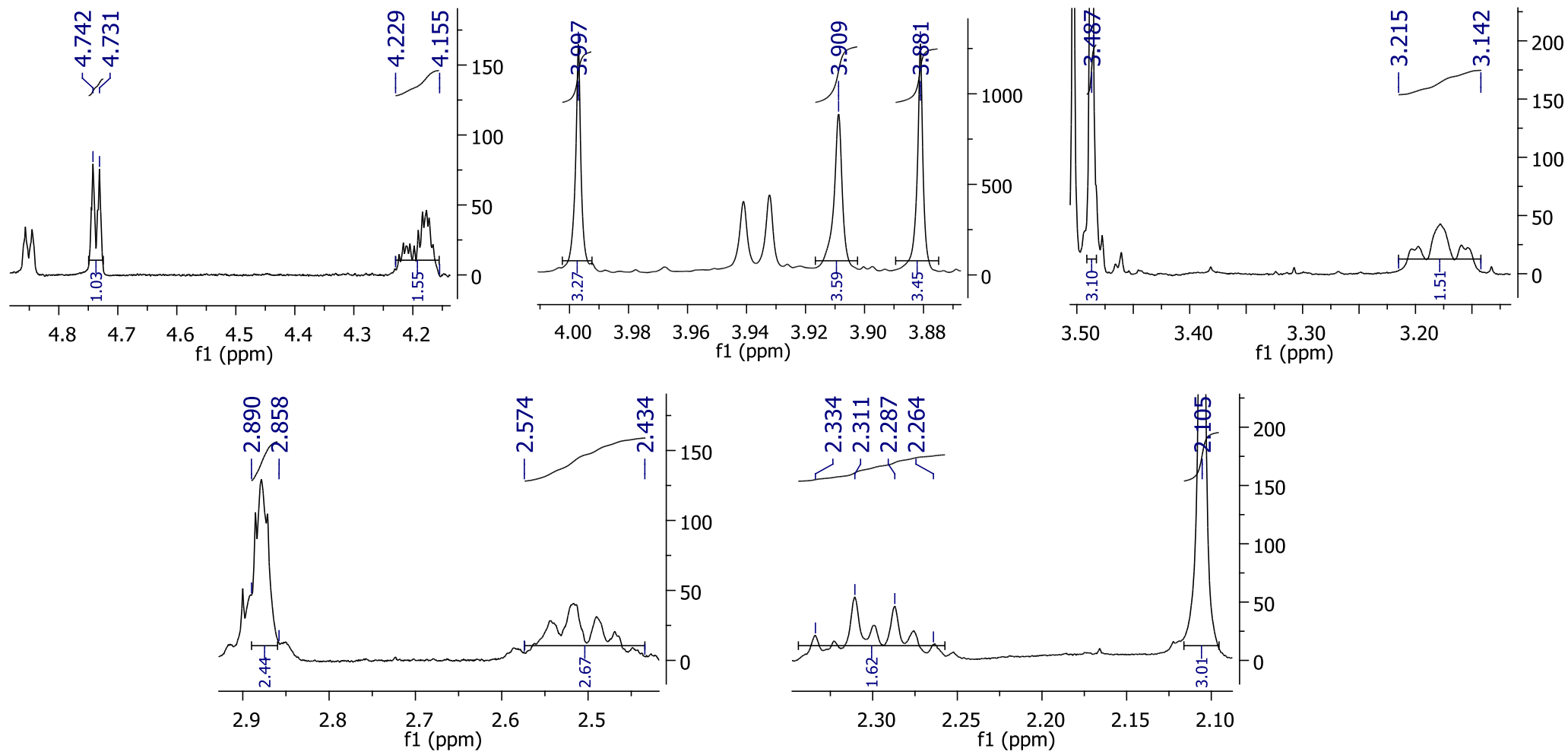
III.6. Espectro de gNOESY do composto **licorina** (DMSO-d₆, 400 MHz, 26°C).

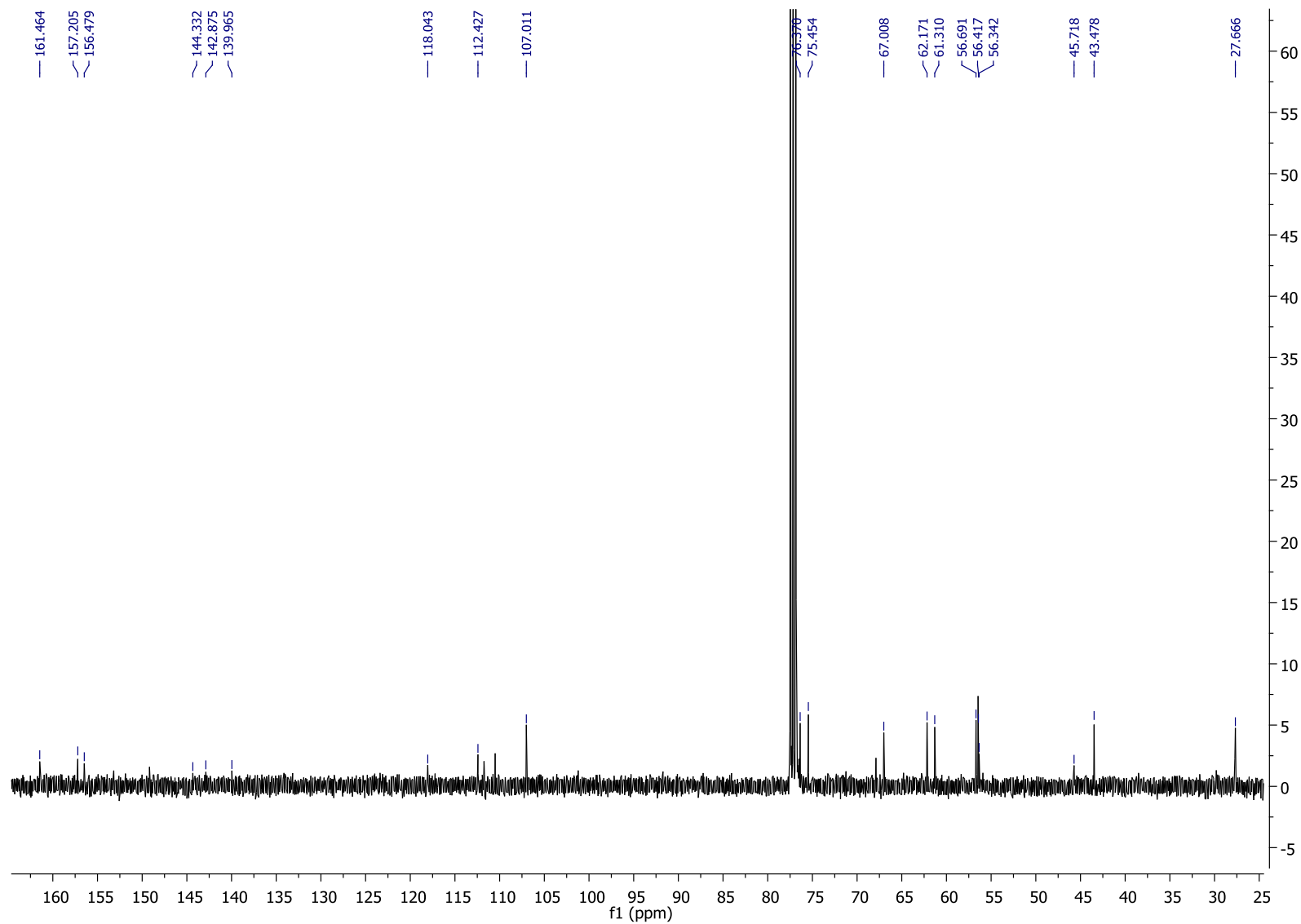


III.7. Espectro de RMN de ^1H do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.



Expansões:

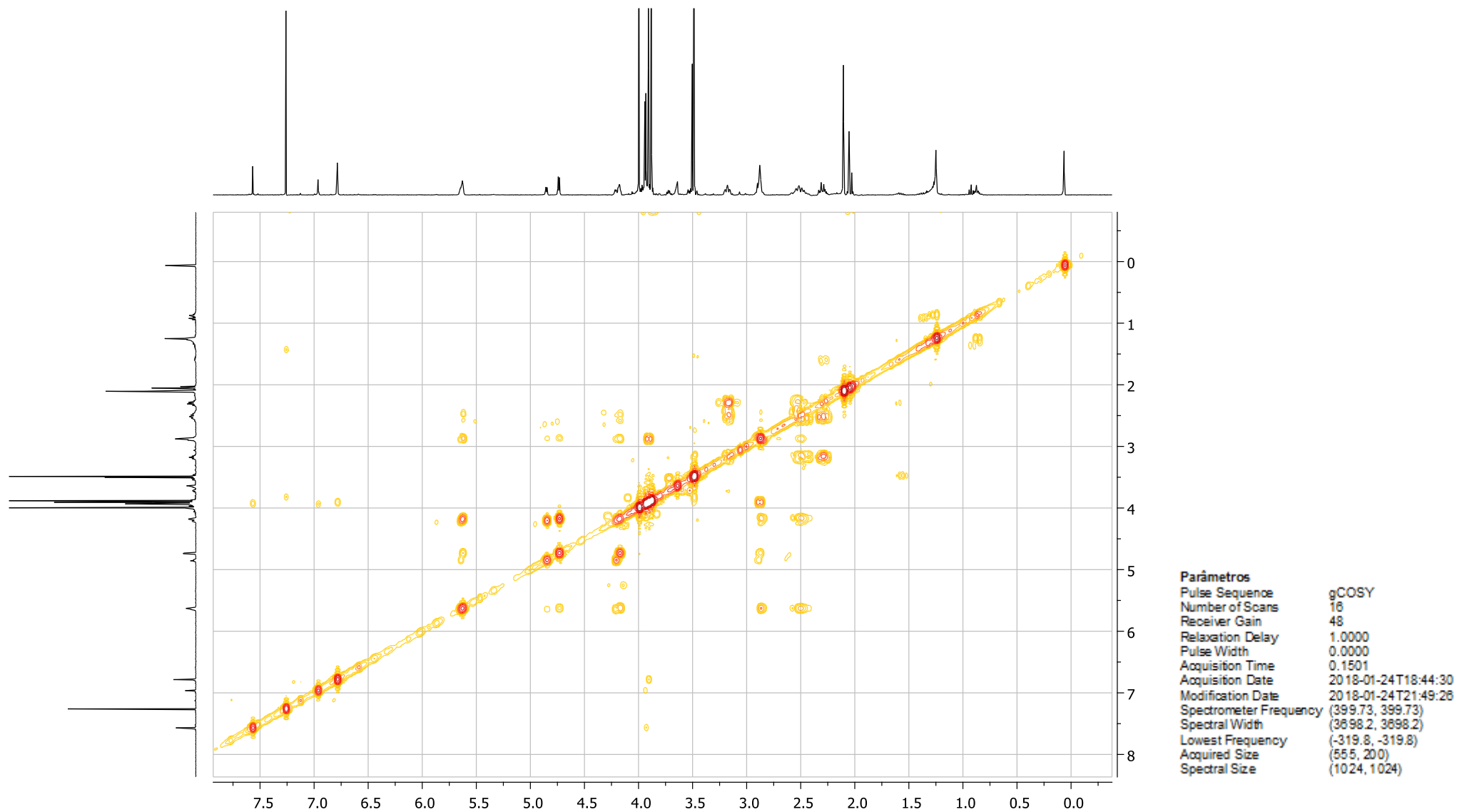




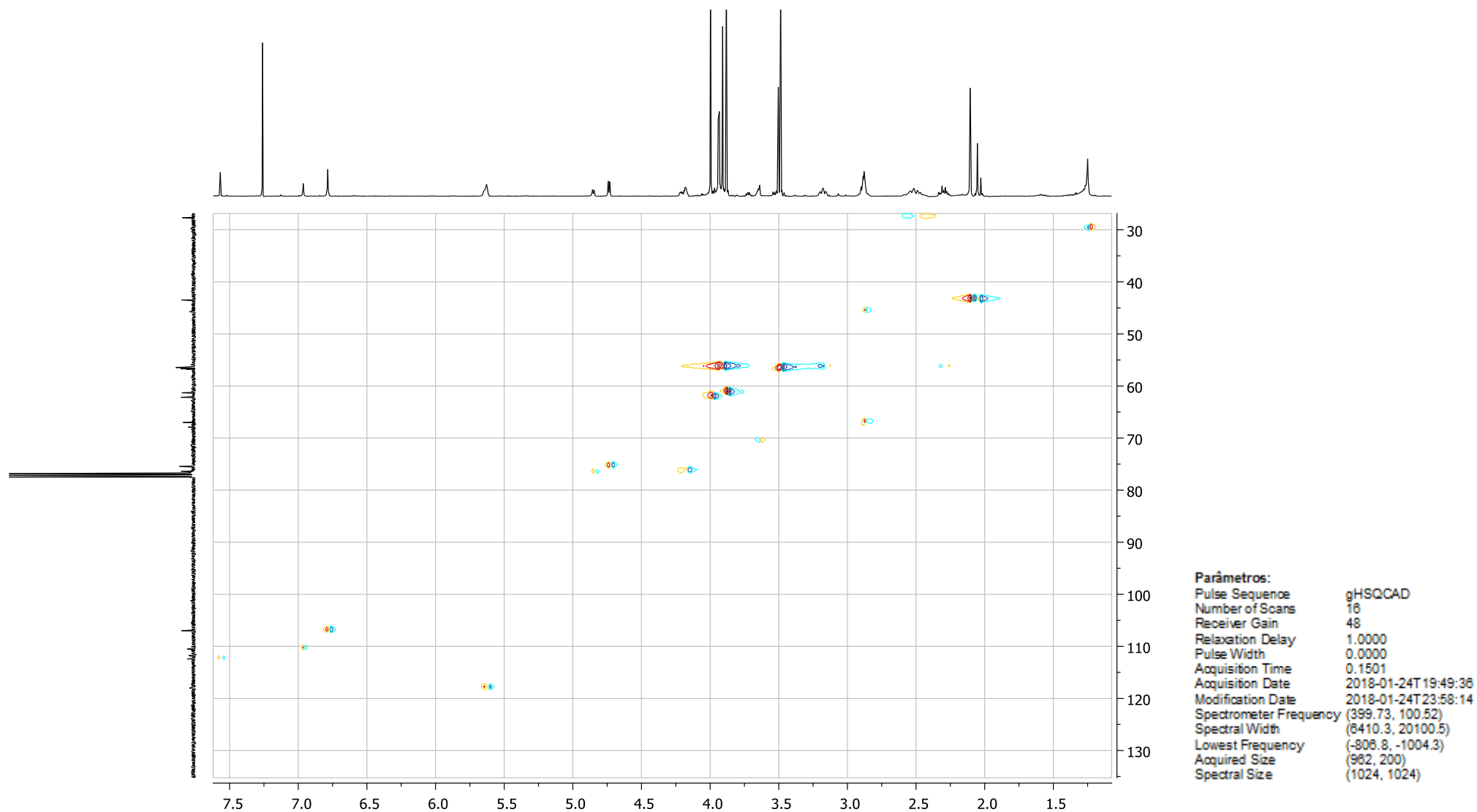
Parâmetros:

Pulse Sequence	s2pul
Number of Scans	1000
Receiver Gain	30
Relaxation Delay	1.0000
Pulse Width	0.0000
Acquisition Time	1.3107
Acquisition Date	2018-01-24T18:05:44
Modification Date	2018-01-24T20:44:18
Spectrometer Frequency	100.52
Spectral Width	25000.0
Lowest Frequency	-1426.6
Acquired Size	32768
Spectral Size	65536

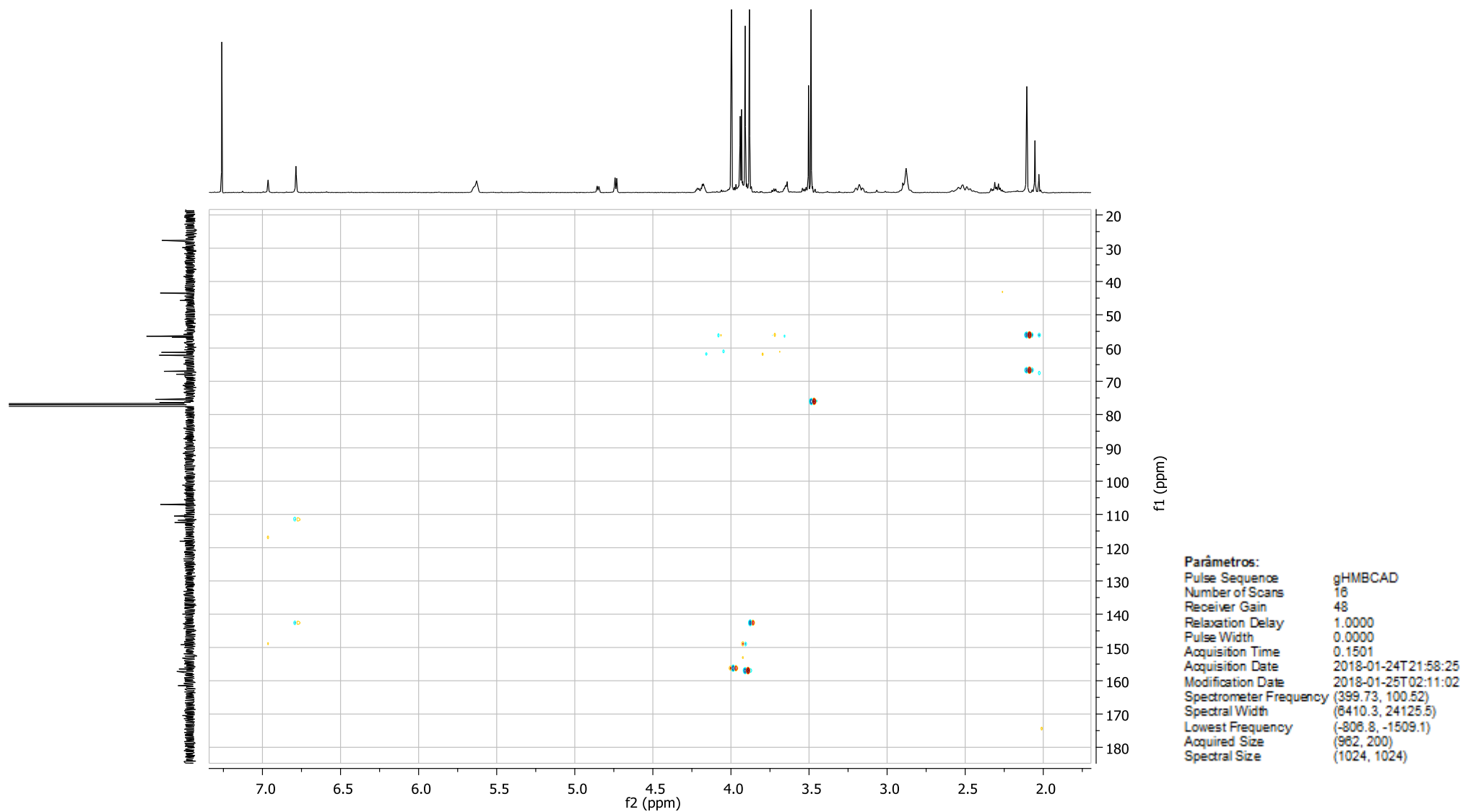
III.8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



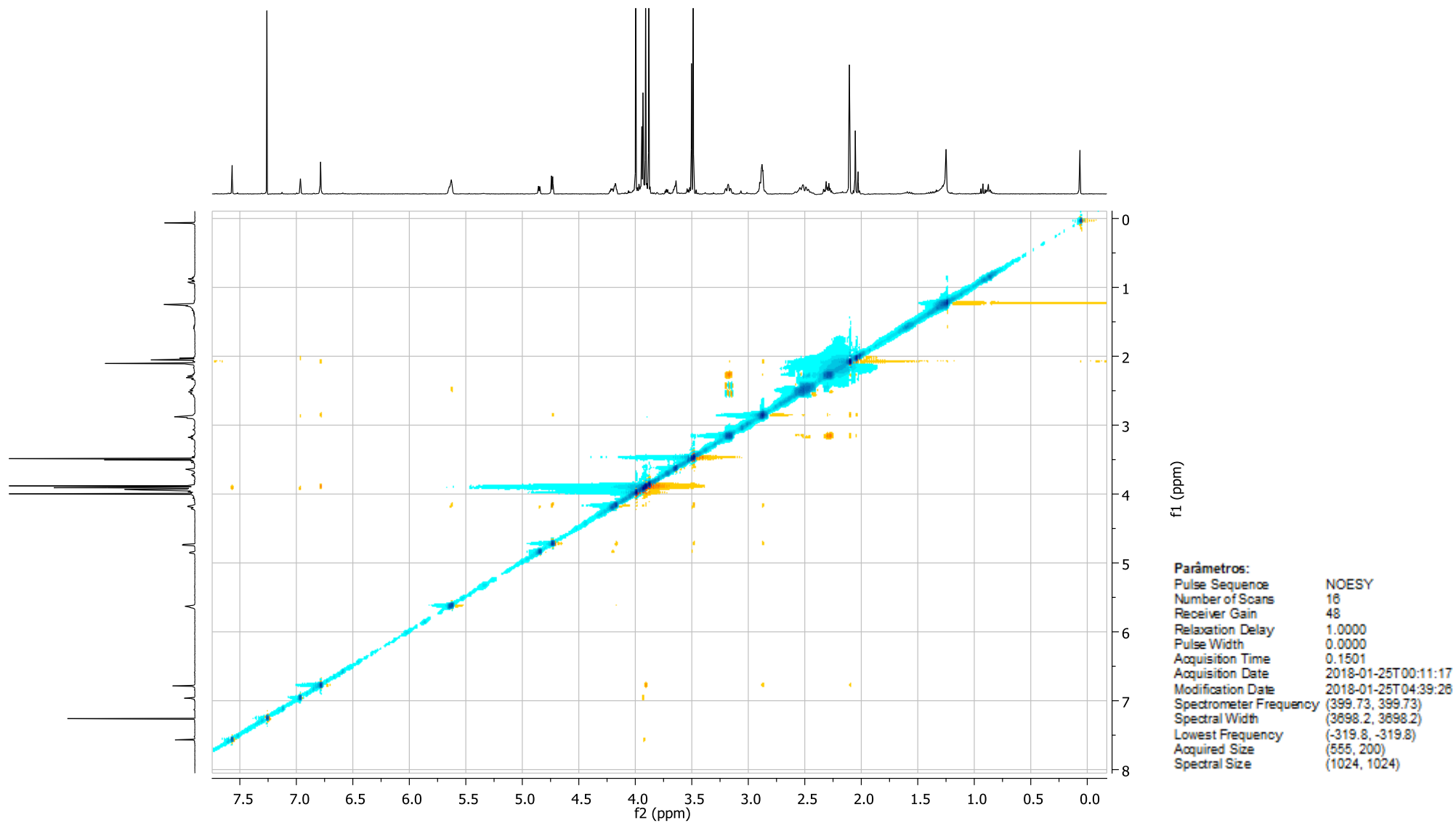
III.9. Espectro de gCOSY do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



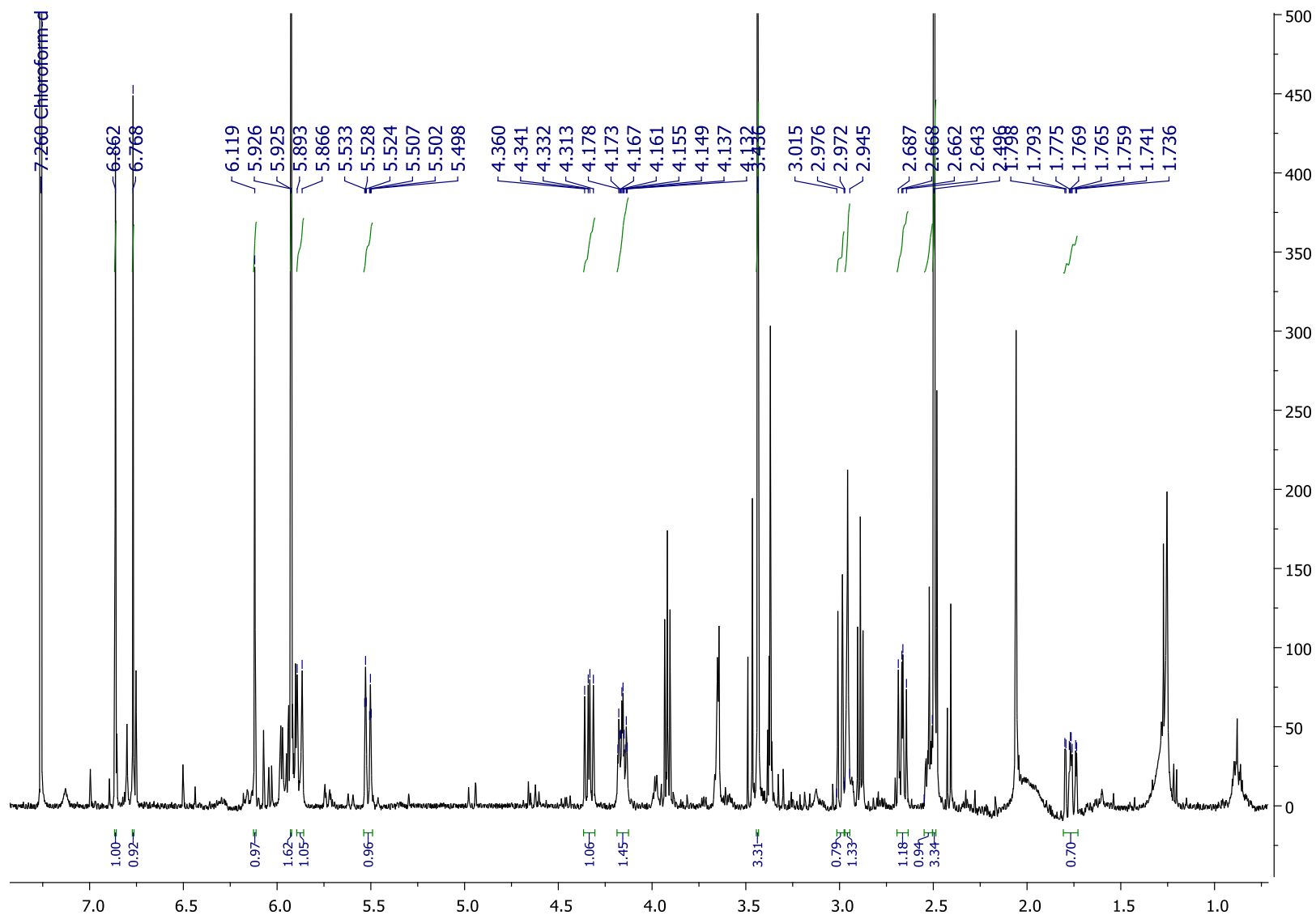
III.10. Mapa de Contornos gHSQC do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).



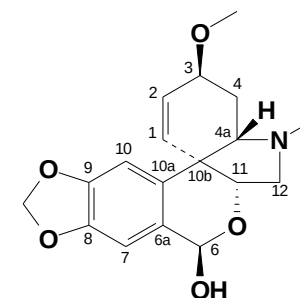
III.11. Mapa de Contornos gHMBC do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).



III.12. Espectro de gNOESY do composto **2- α -7-dimetoxihomolicorina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).

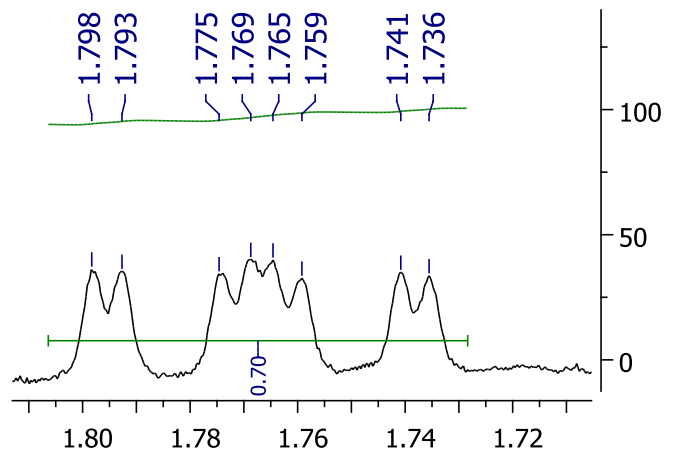
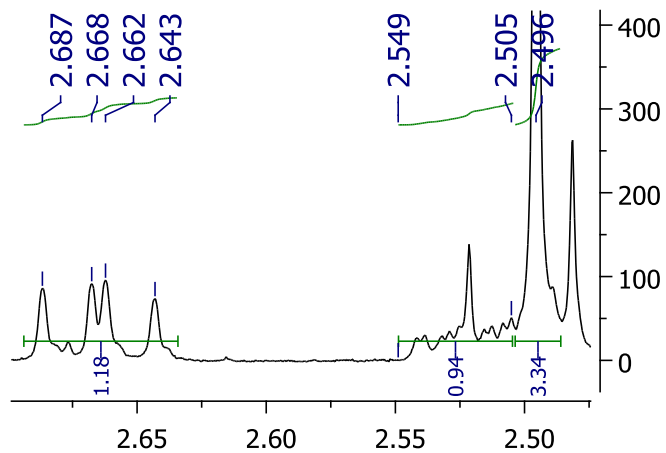
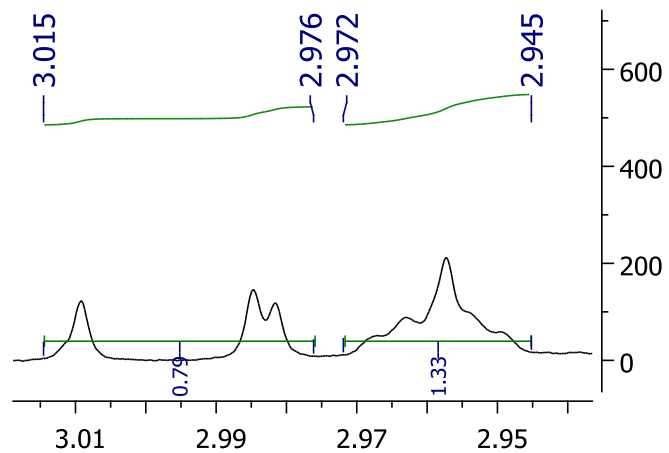
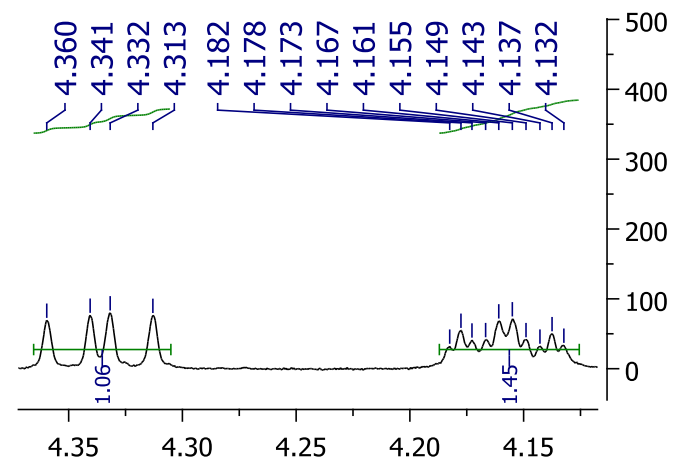
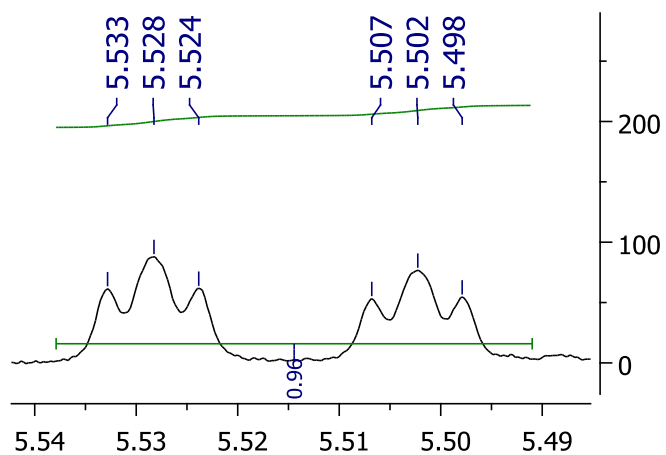
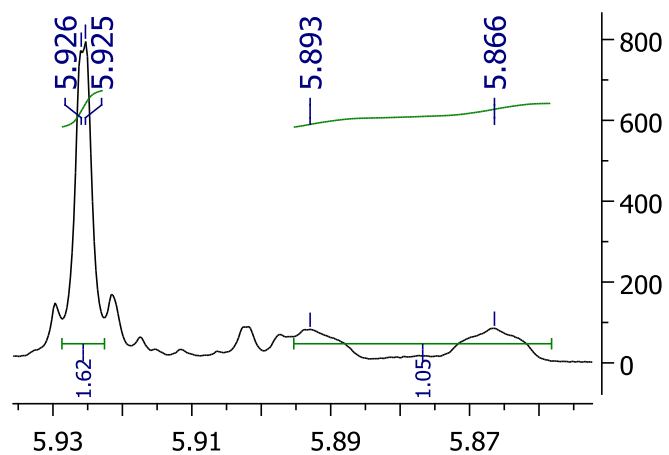


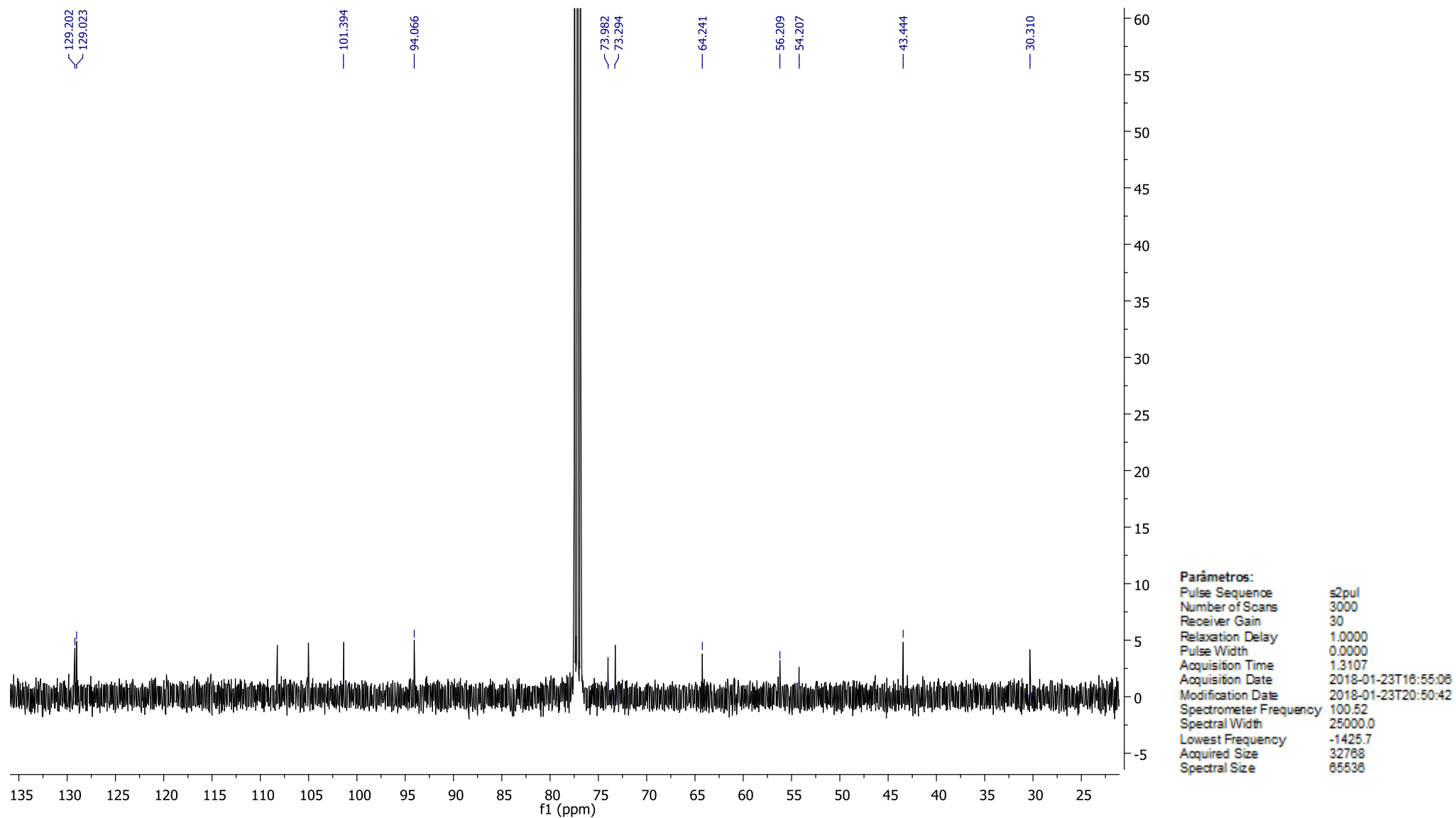
Parâmetros:
Pulse Sequence s2pul
Number of Scans 256
Receiver Gain 48
Relaxation Delay 1.1681
Pulse Width 0.0000
Acquisition Time 3.8339
Acquisition Date 2018-01-23T16:33:31
Modification Date 2018-01-23T17:54:56
Spectrometer Frequency 399.73
Spectral Width 6410.3
Lowest Frequency -806.0
Acquired Size 24576
Spectral Size 65536



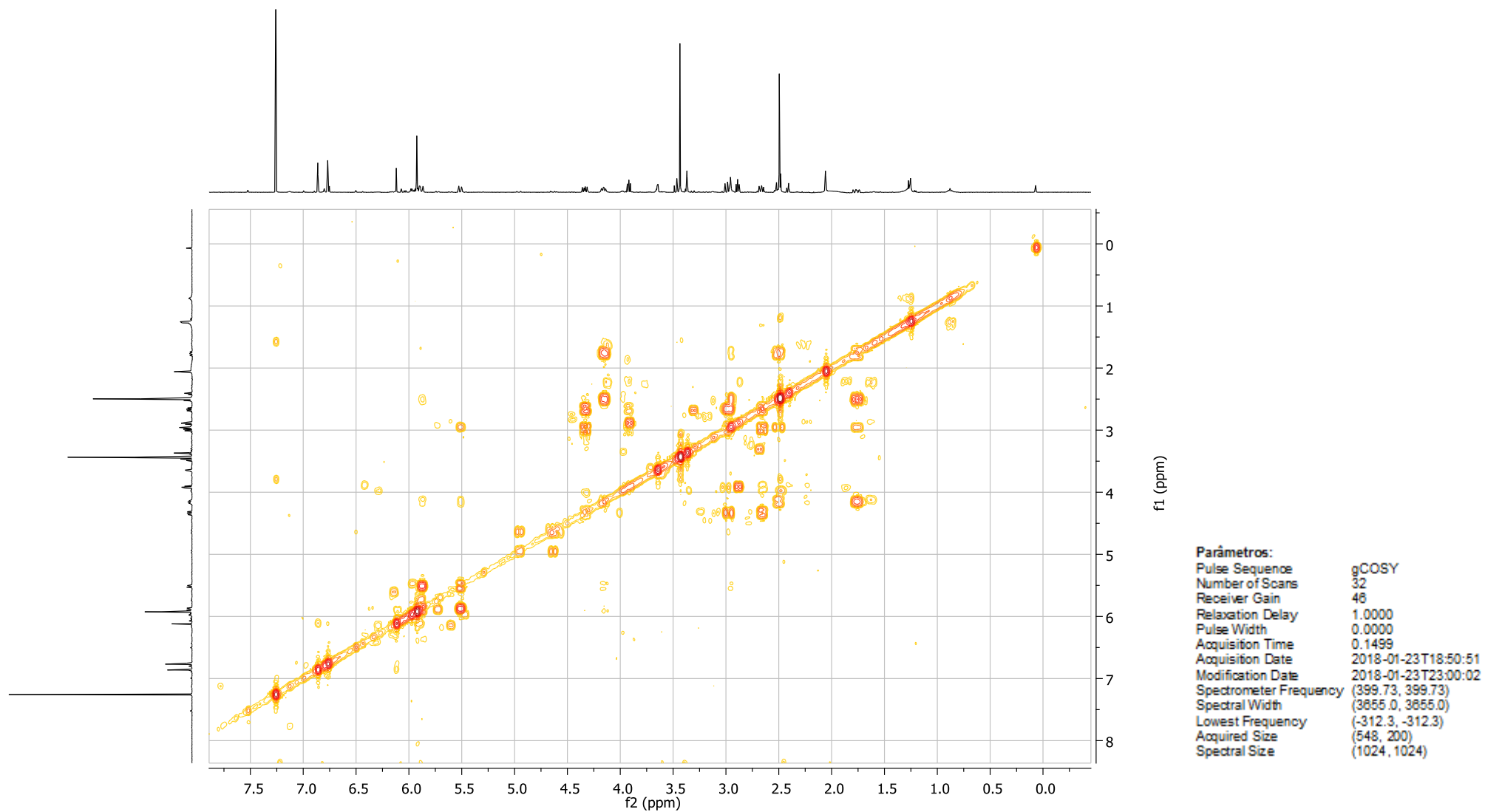
III.13. Espectro de RMN de ^1H do composto **pretazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.

Expansões:

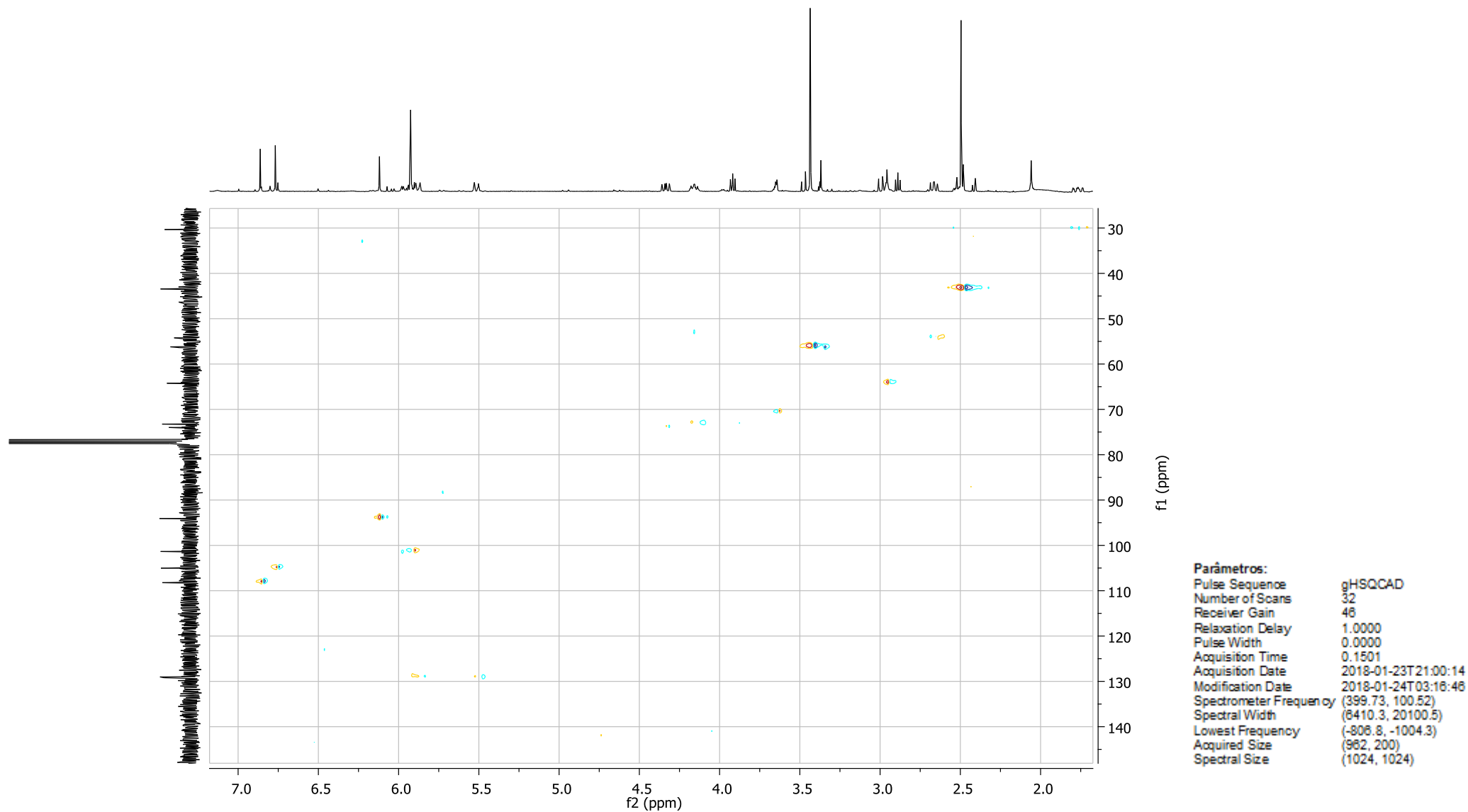




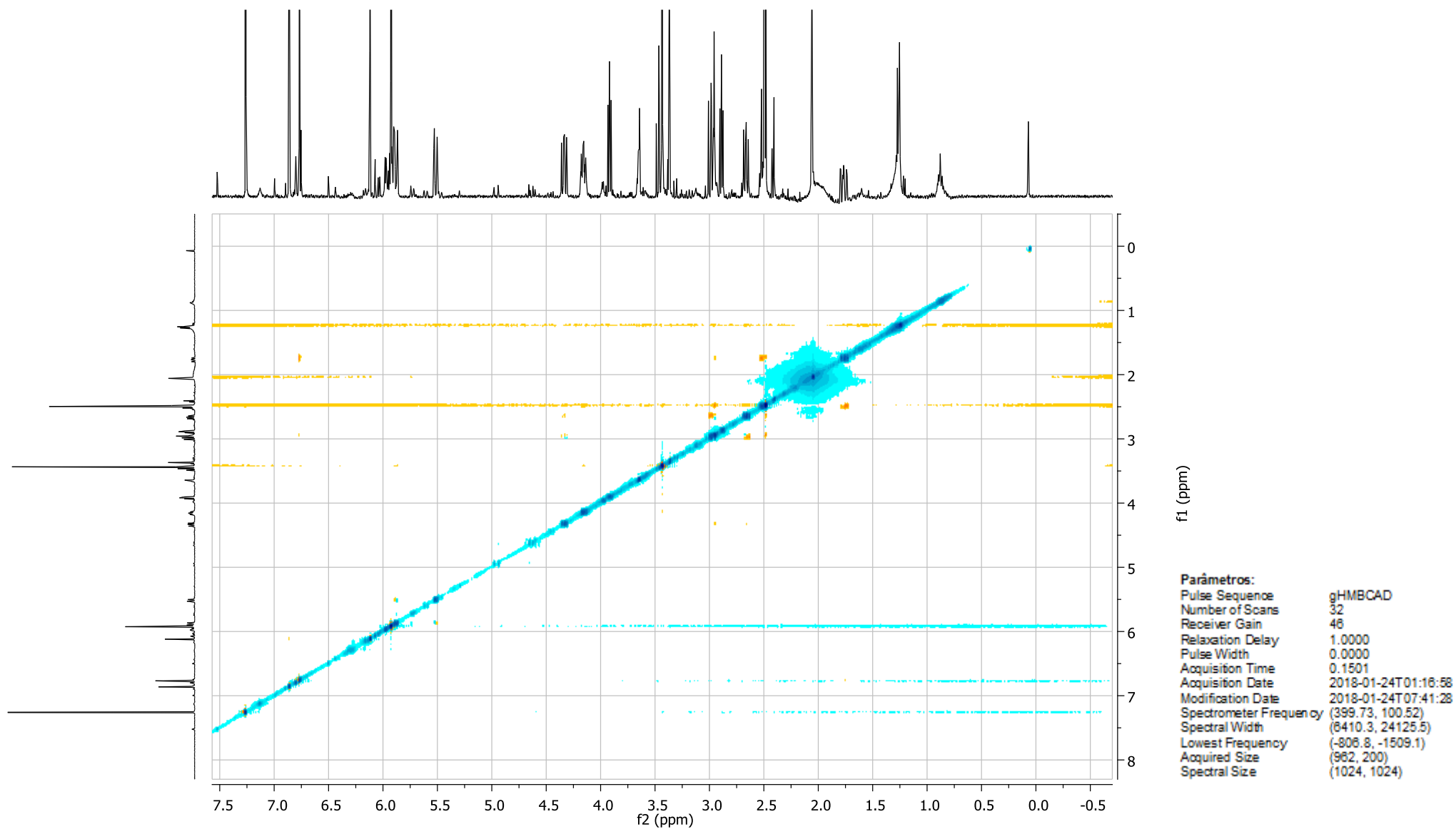
III.14. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **pretazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



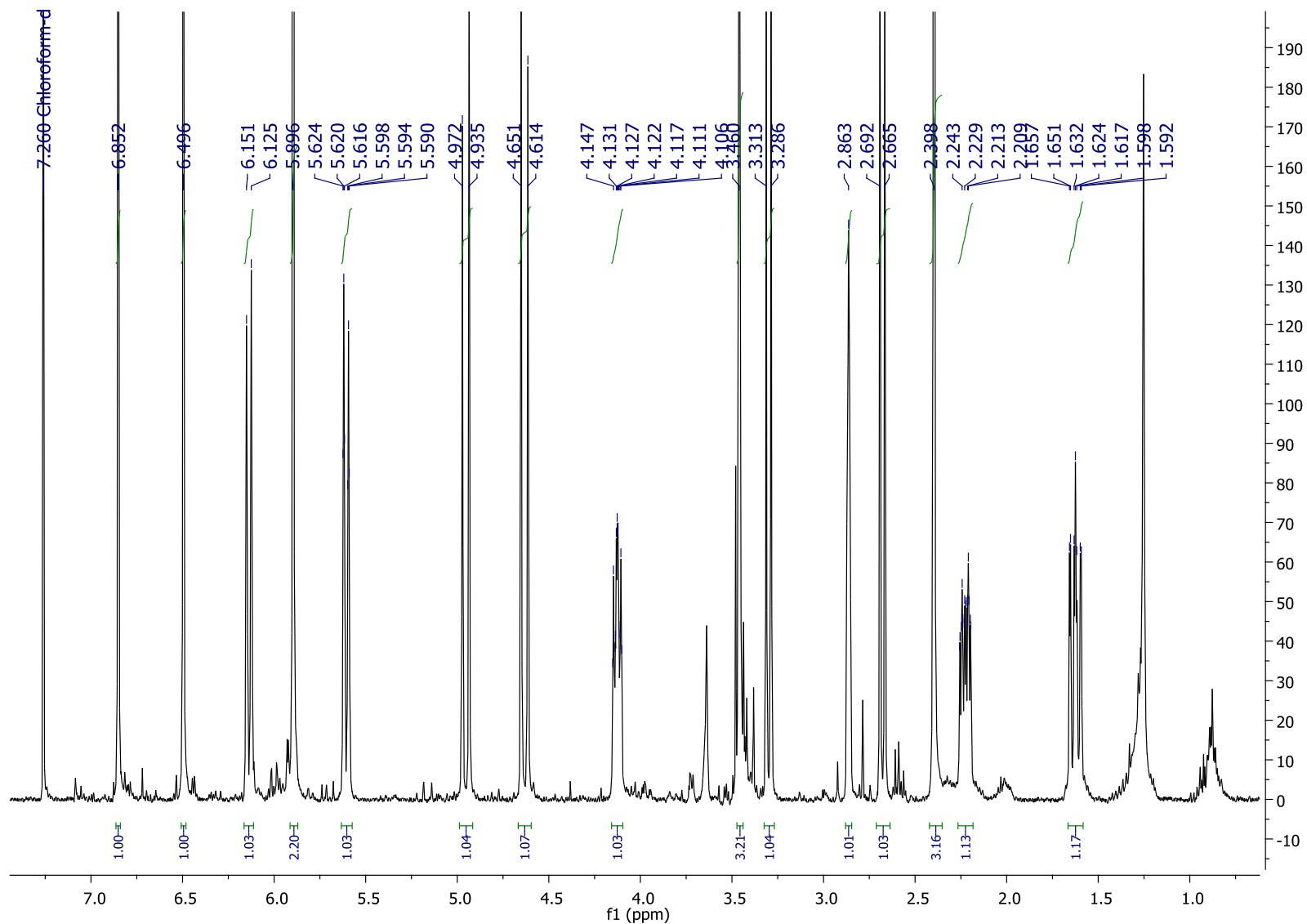
III.15. Espectro de gCOSY do composto **pretazetina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).



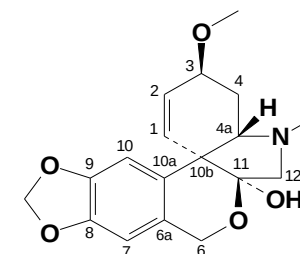
III.16. Mapa de Contornos gHSQC do composto **pretazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



III.17. Espectro de gNOESY do composto **pretazetina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).

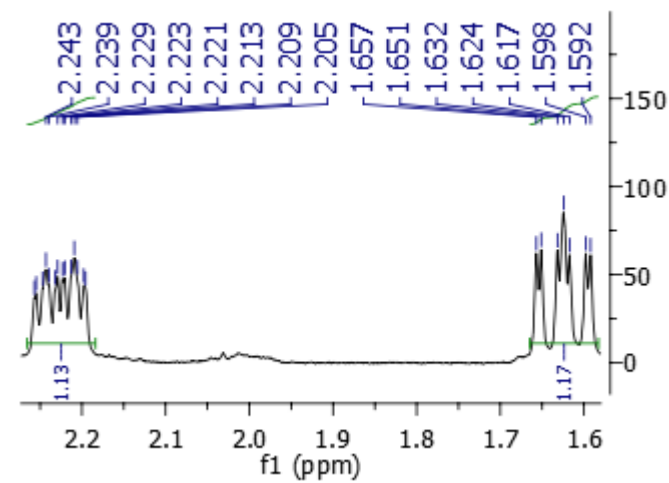
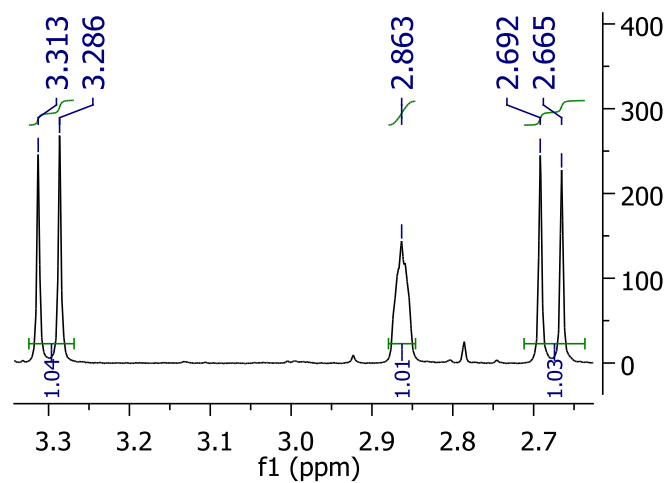
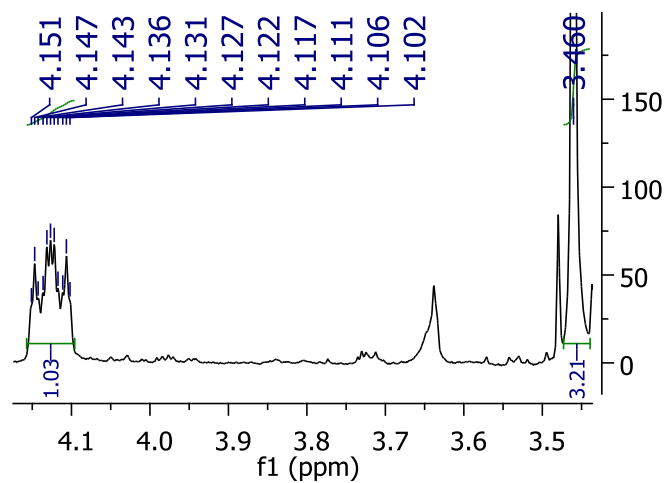
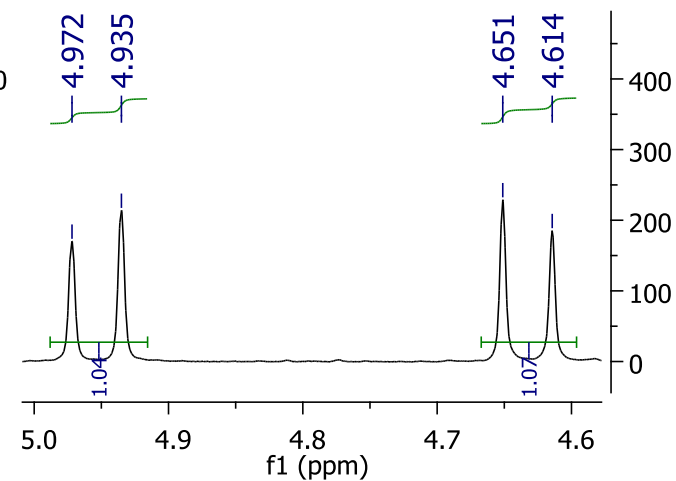
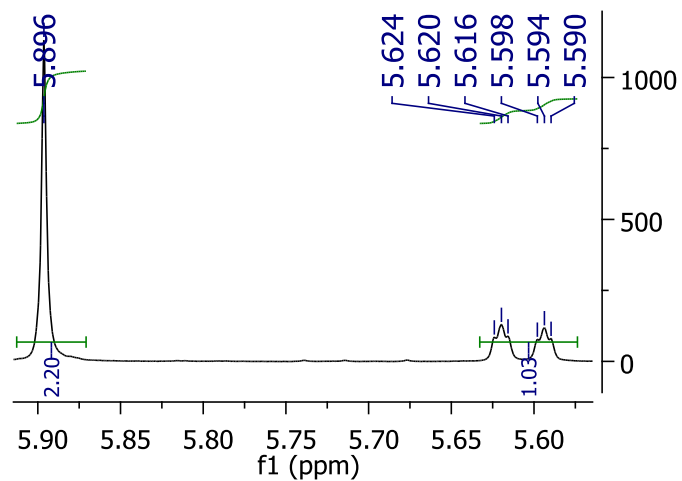
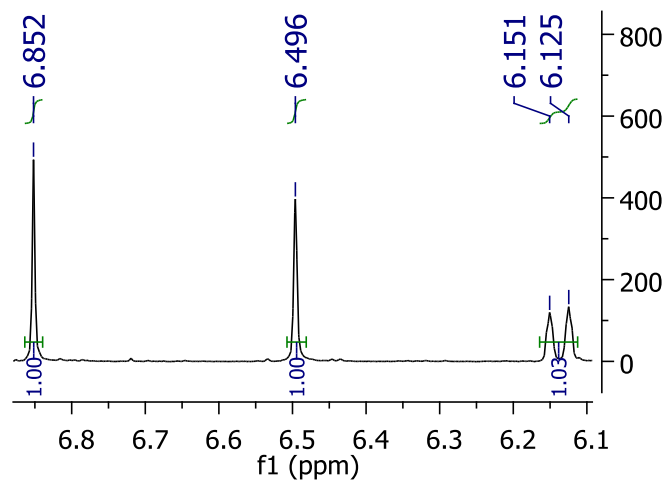


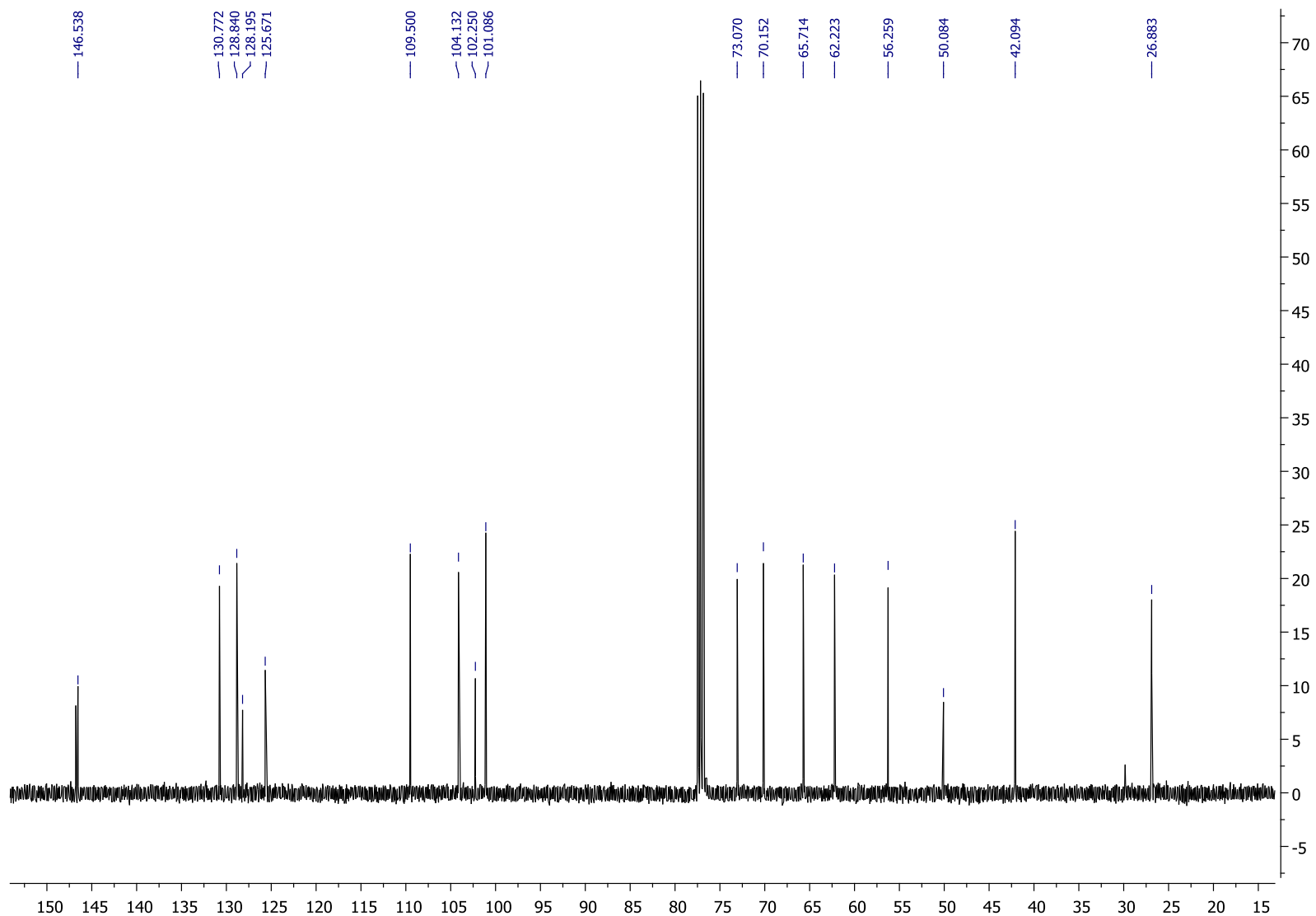
Parâmetros:
Pulse Sequence s2pul
Number of Scans 32
Receiver Gain 44
Relaxation Delay 1.1681
Pulse Width 0.0000
Acquisition Time 3.8339
Acquisition Date 2018-01-25T21:12:50
Modification Date 2018-01-25T22:15:34
Spectrometer Frequency 399.73
Spectral Width 6410.3
Lowest Frequency -808.0
Acquired Size 24576
Spectral Size 65536



III.18. Espectro de RMN de ^1H do composto **tazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.

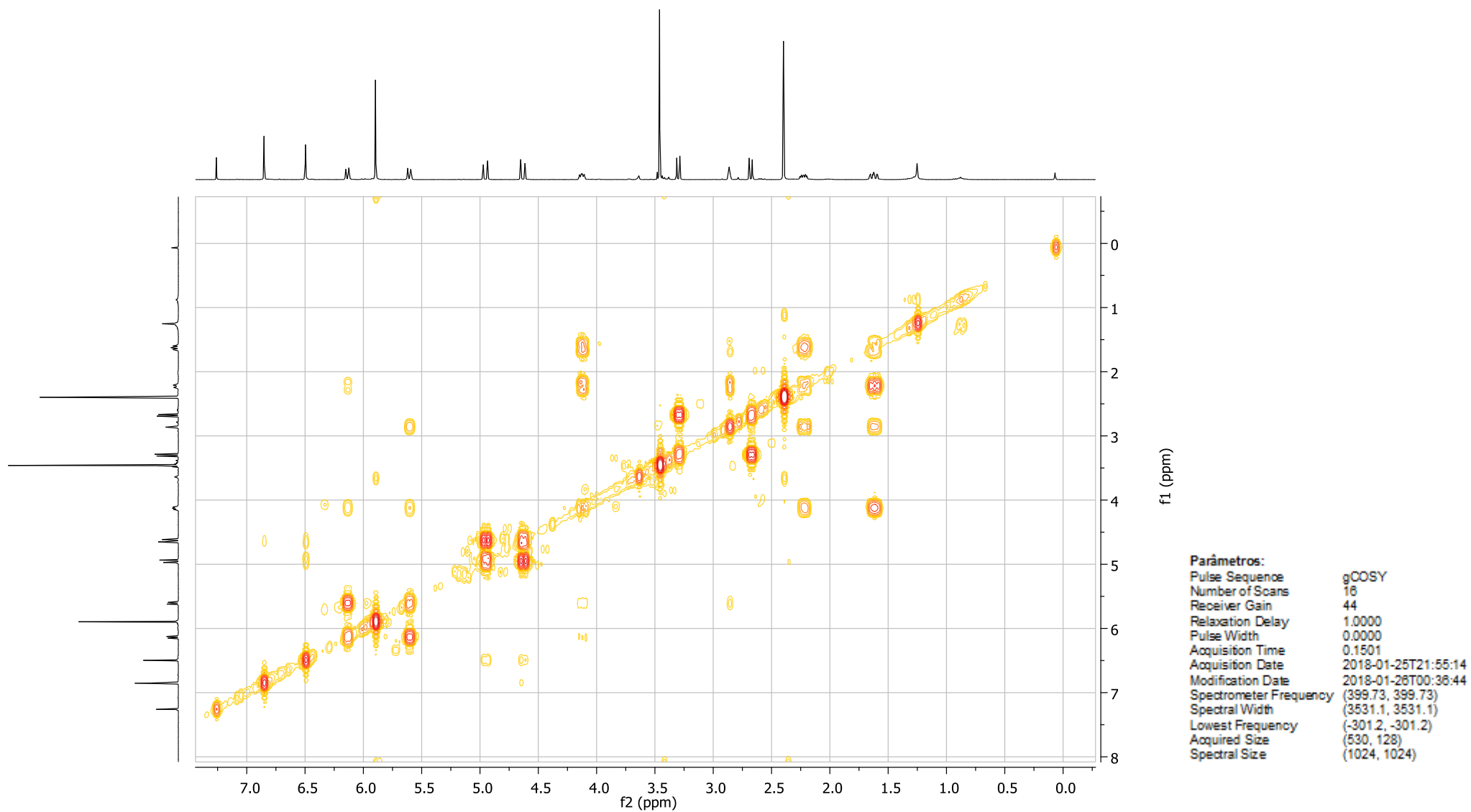
Expansões:



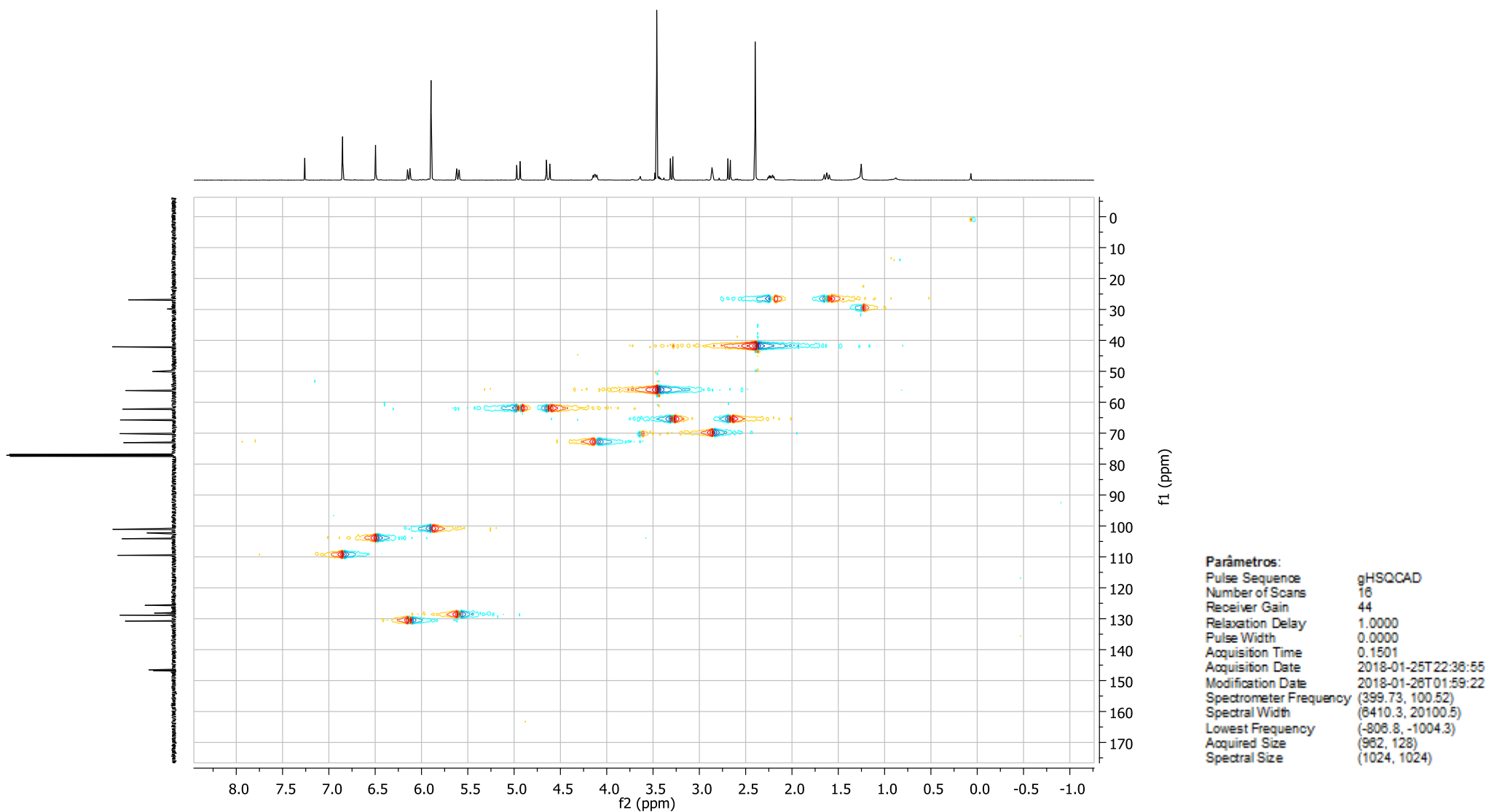


Parâmetros:
 Pulse Sequence s2pul
 Number of Scans 1000
 Receiver Gain 30
 Relaxation Delay 1.0000
 Pulse Width 0.0000
 Acquisition Time 1.3107
 Acquisition Date 2018-01-25T21:15:41
 Modification Date 2018-01-25T23:54:14
 Spectrometer Frequency 100.62
 Spectral Width 25000.0
 Lowest Frequency -1426.7
 Acquired Size 32768
 Spectral Size 65536

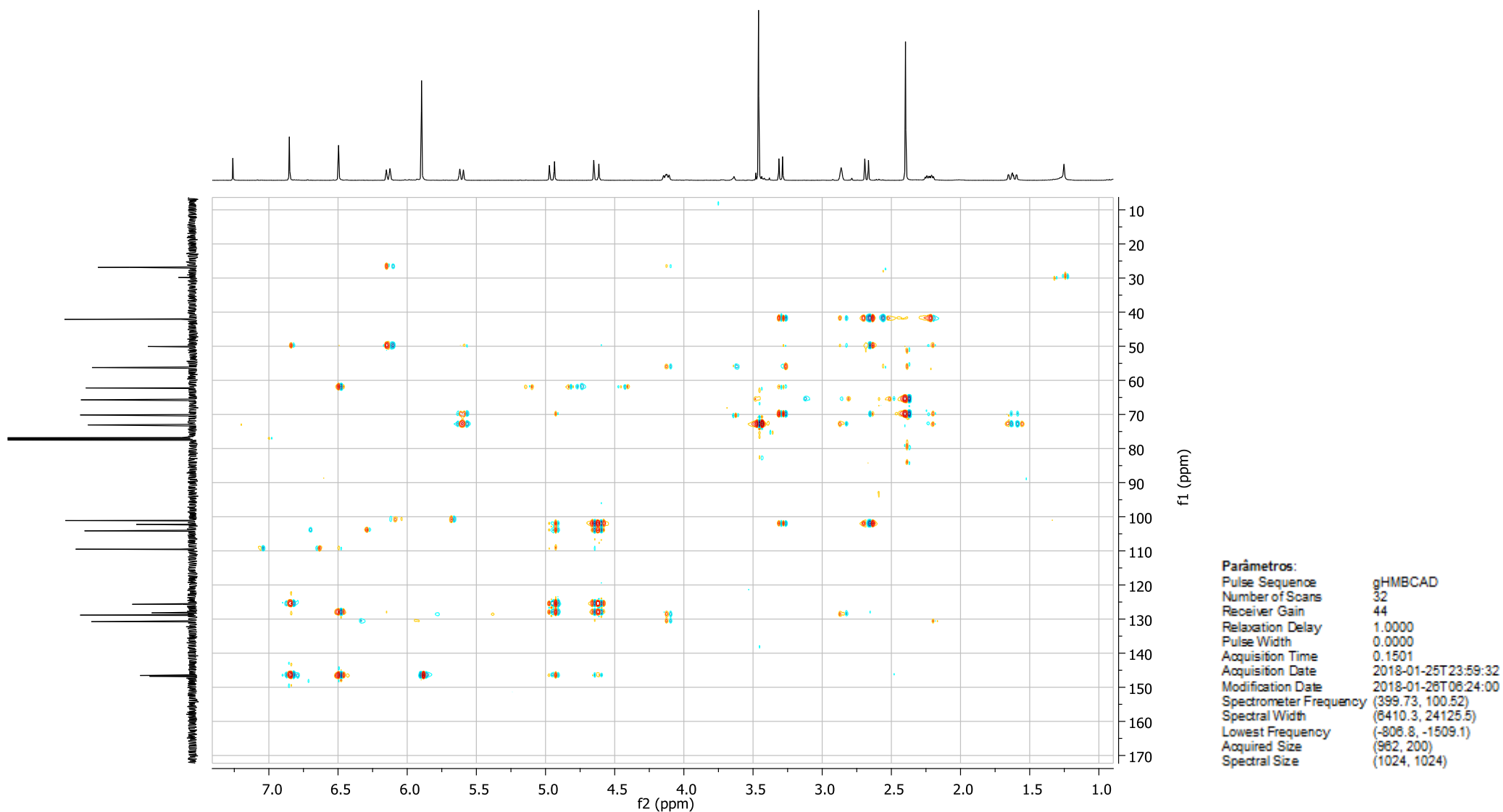
III.19. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **tazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



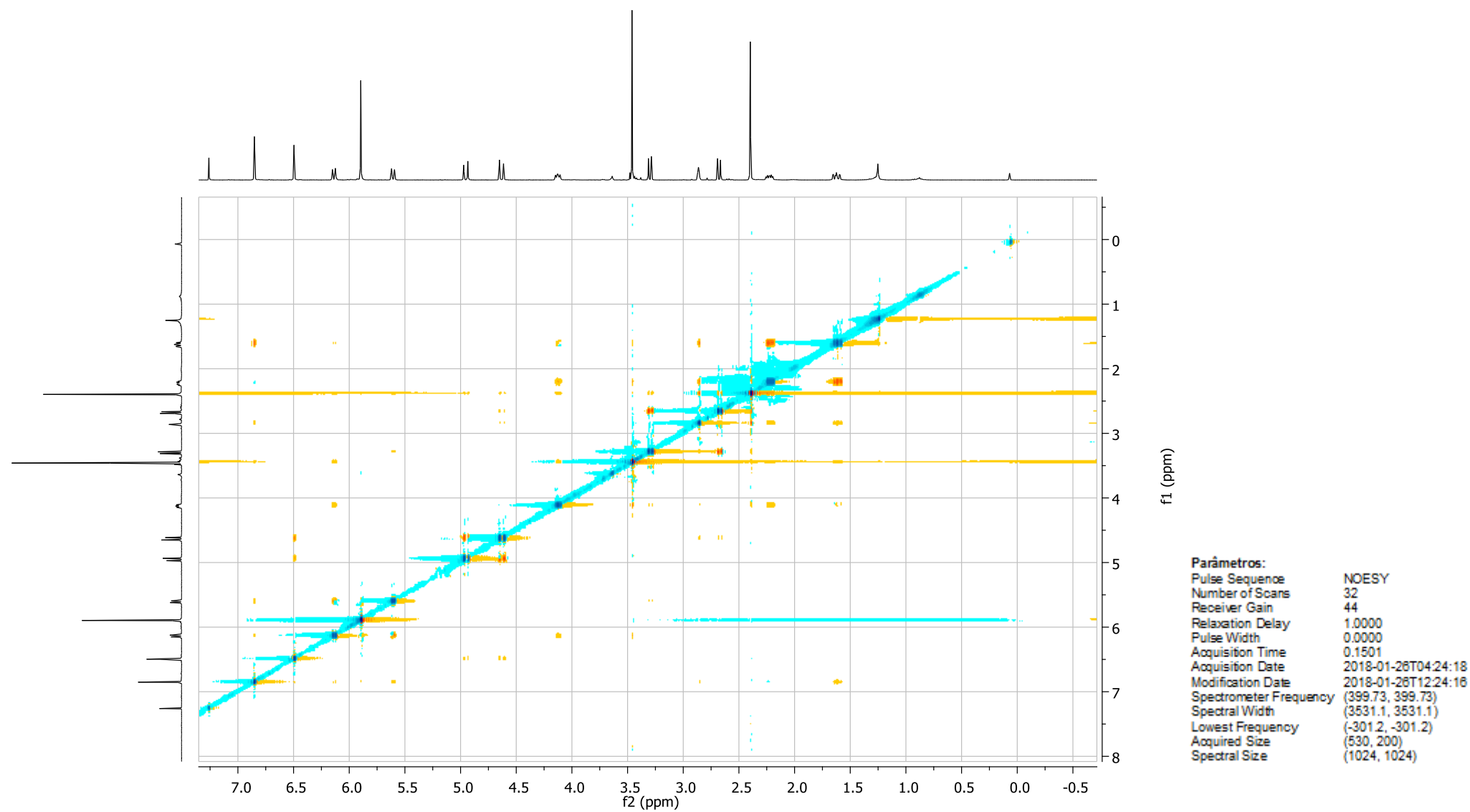
III.20. Espectro de gCOSY do composto **tazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



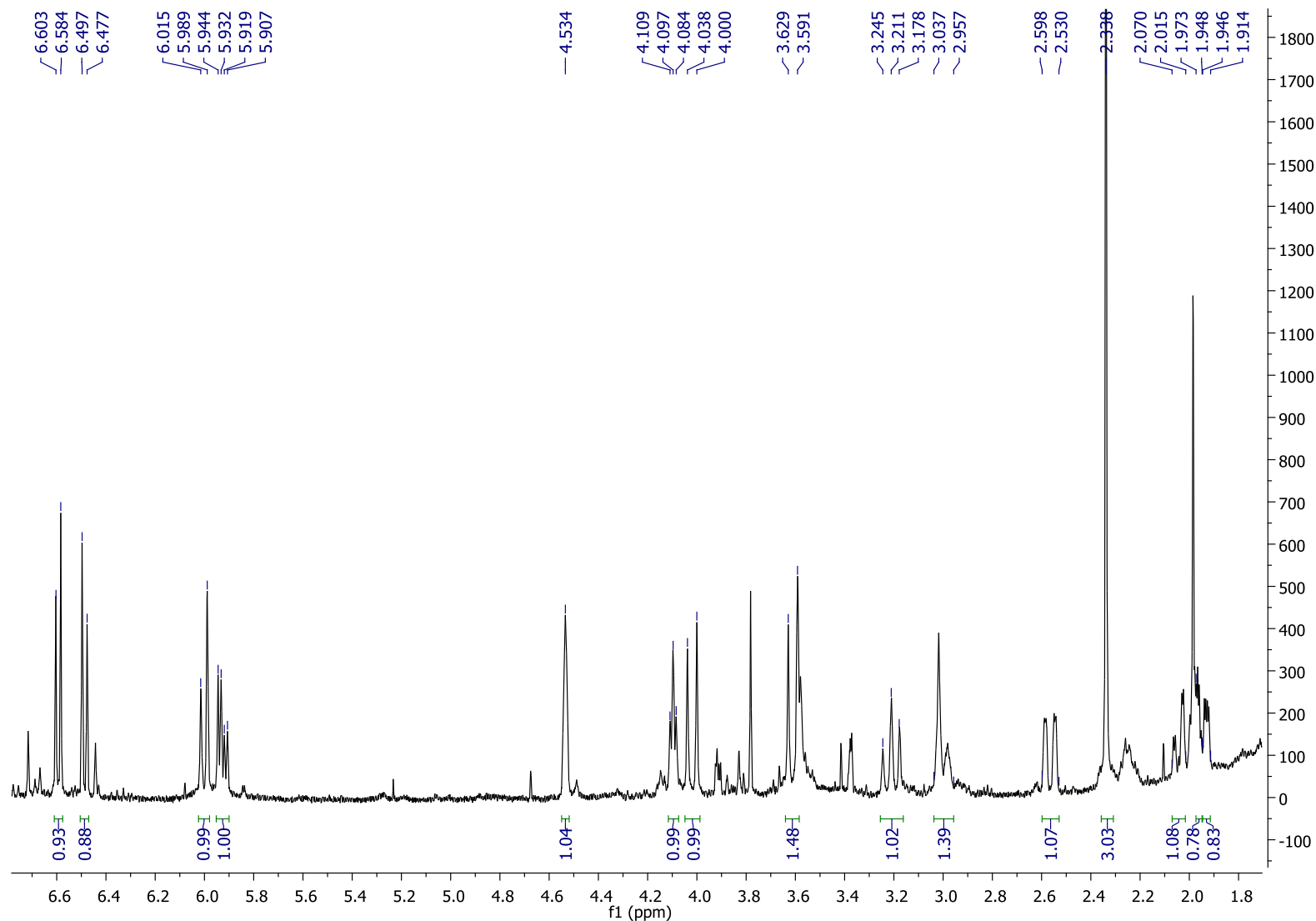
III.21. Mapa de Contornos gHSQC do composto **tazetina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).



III.22. Mapa de Contornos gHMBC do composto **tazetina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).

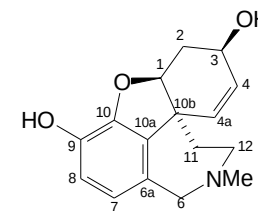


III.23. Espectro de gNOESY do composto **tazetina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



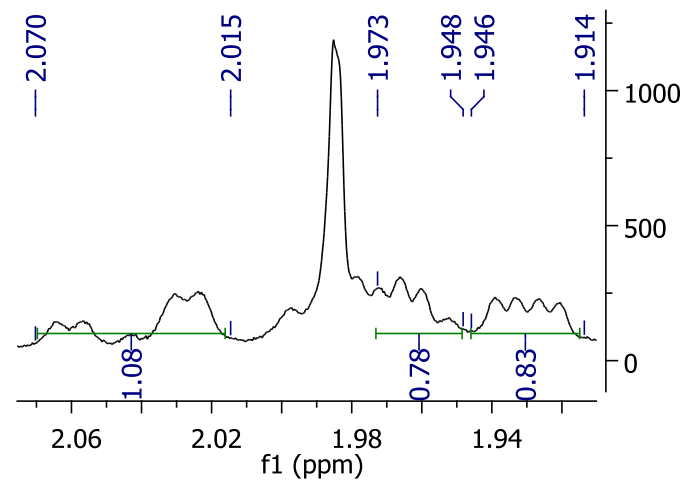
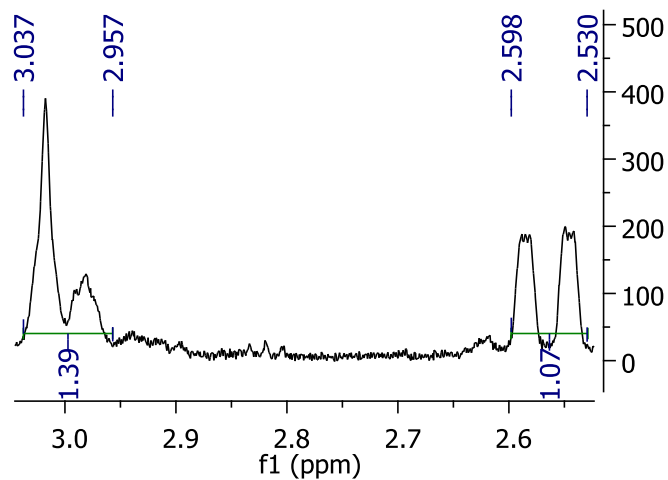
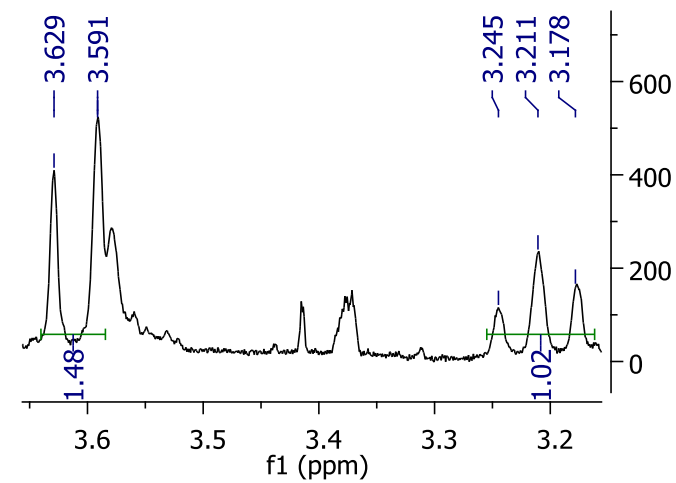
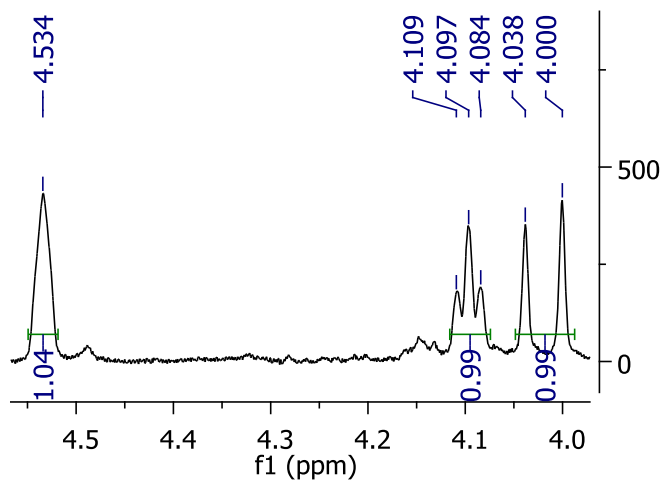
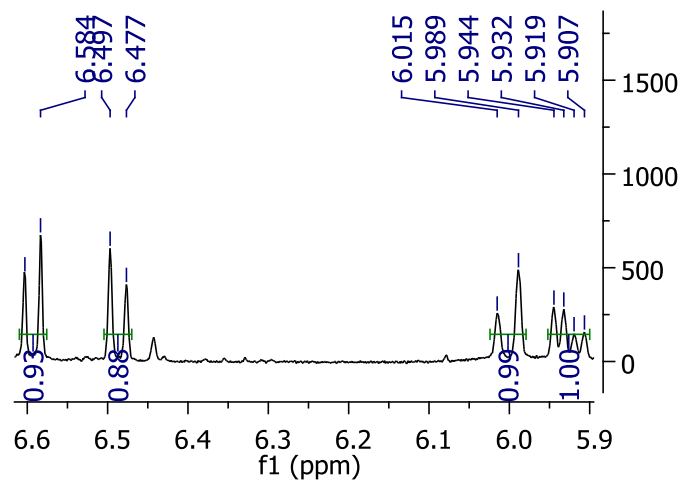
Parâmetros:

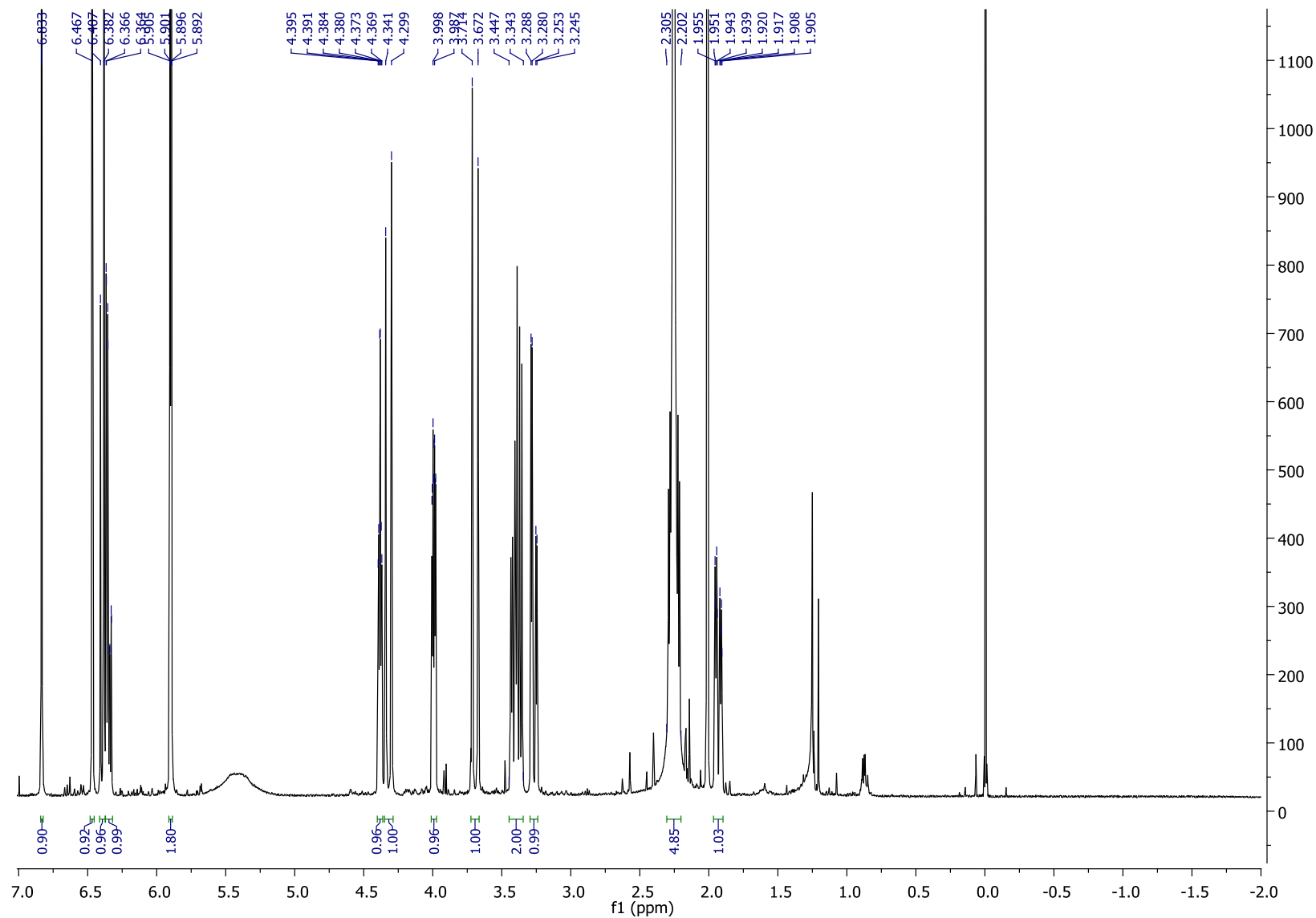
Pulse Sequence	s2pul
Number of Scans	512
Receiver Gain	56
Relaxation Delay	1.1661
Pulse Width	0.0000
Acquisition Time	3.8339
Acquisition Date	2016-07-06T03:15:53
Modification Date	2016-07-06T08:58:38
Spectrometer Frequency	399.73
Spectral Width	6410.3
Lowest Frequency	-825.6
Acquired Size	24576
Spectral Size	65536



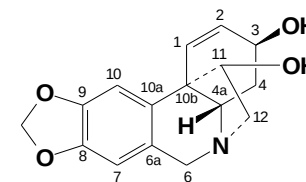
III.24. Espectro de RMN de ^1H do composto **sanguinina** (CDCl_3 , 400 MHz, 25°C) e suas expansões.

Expansões:



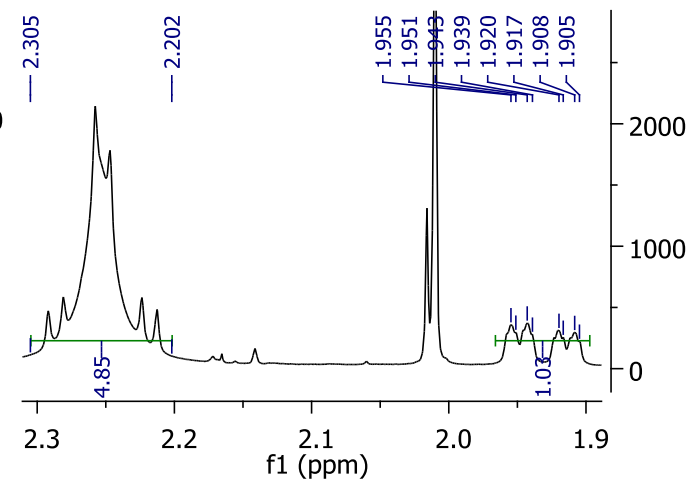
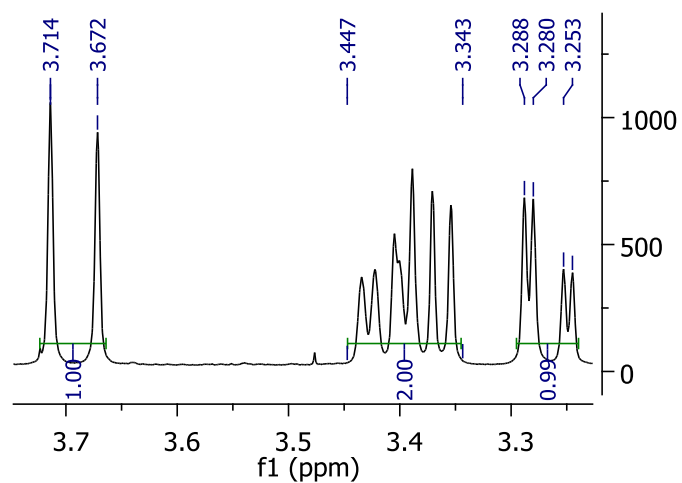
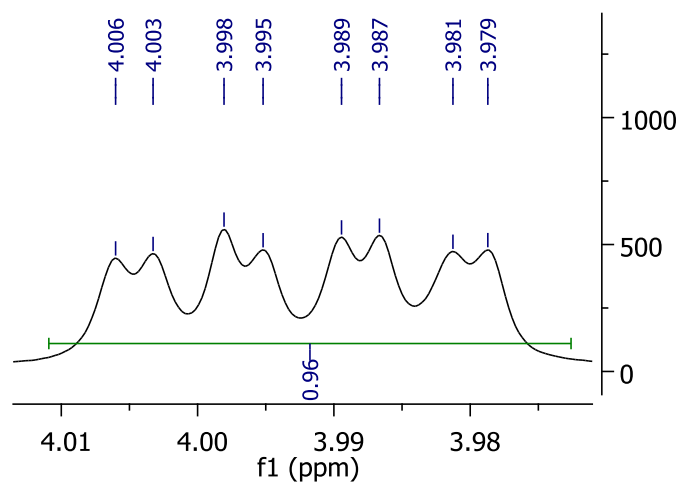
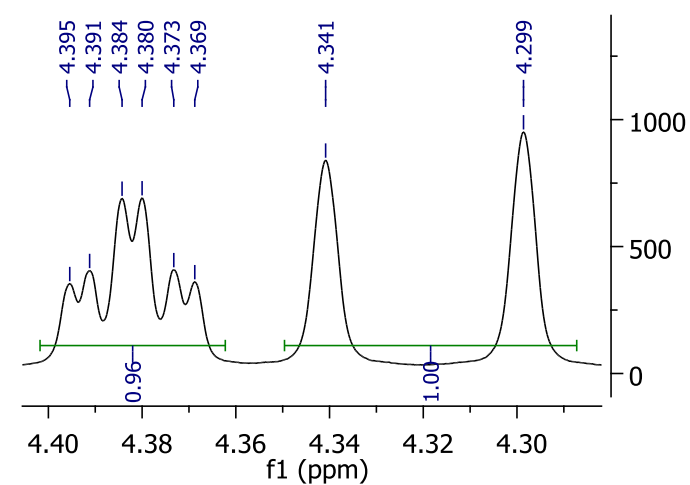
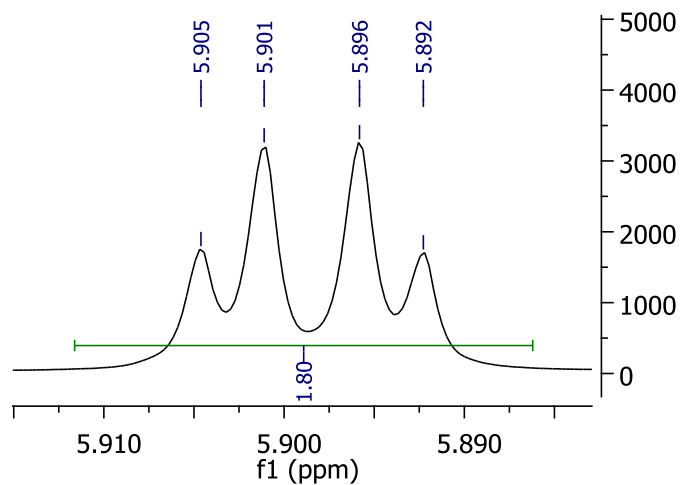
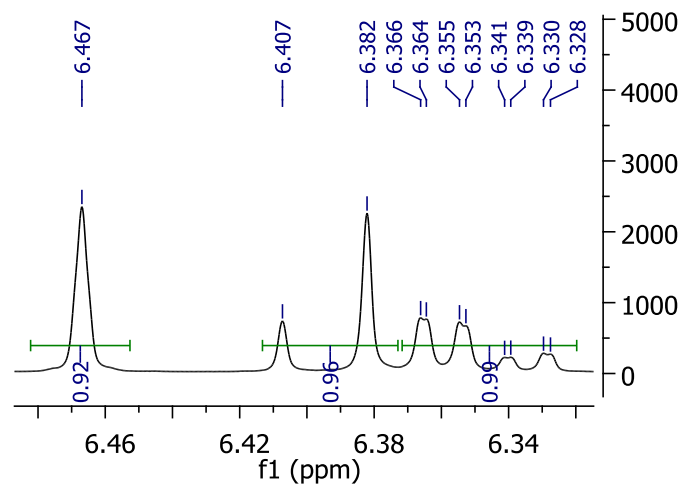


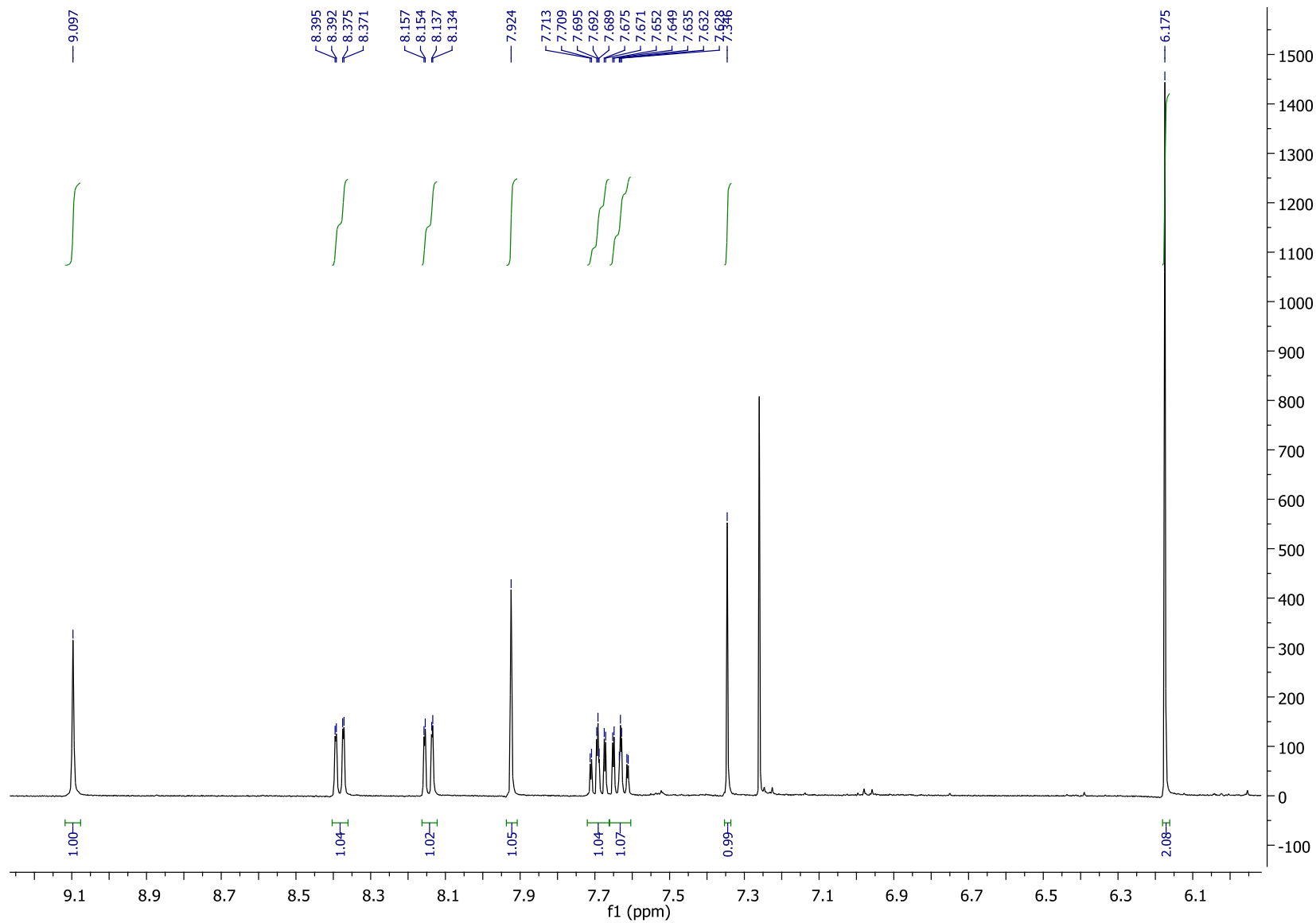
Parâmetros:
 Pulse Sequence s2pul
 Number of Scans 128
 Receiver Gain 48
 Relaxation Delay 1.1861
 Pulse Width 0.0000
 Acquisition Time 3.8339
 Acquisition Date 2016-03-09T15:35:07
 Modification Date 2016-03-09T16:45:52
 Spectrometer Frequency 399.73
 Spectral Width 6410.3
 Lowest Frequency -800.0
 Acquired Size 24576
 Spectral Size 65536



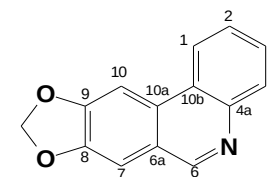
III.25. Espectro de RMN de ^1H do composto **11-hidroxivatina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.

Expansões:



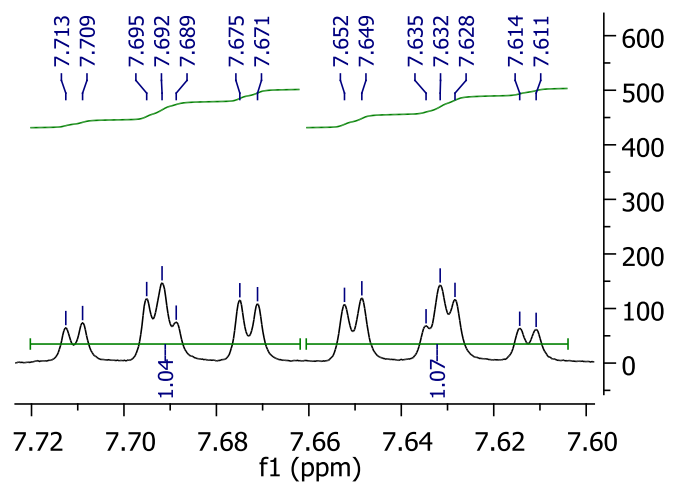
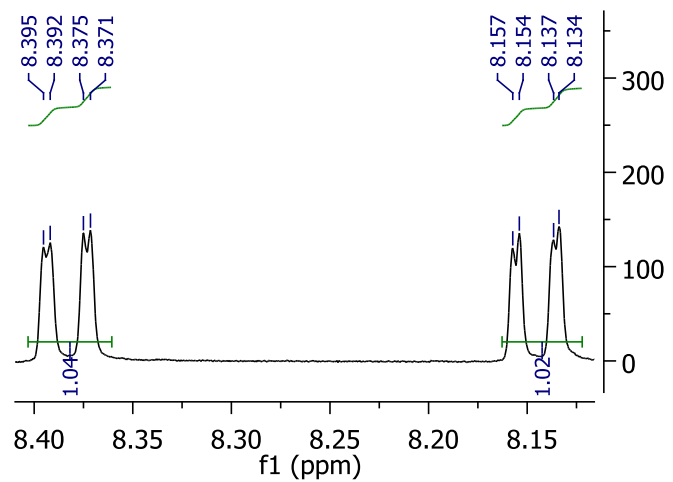


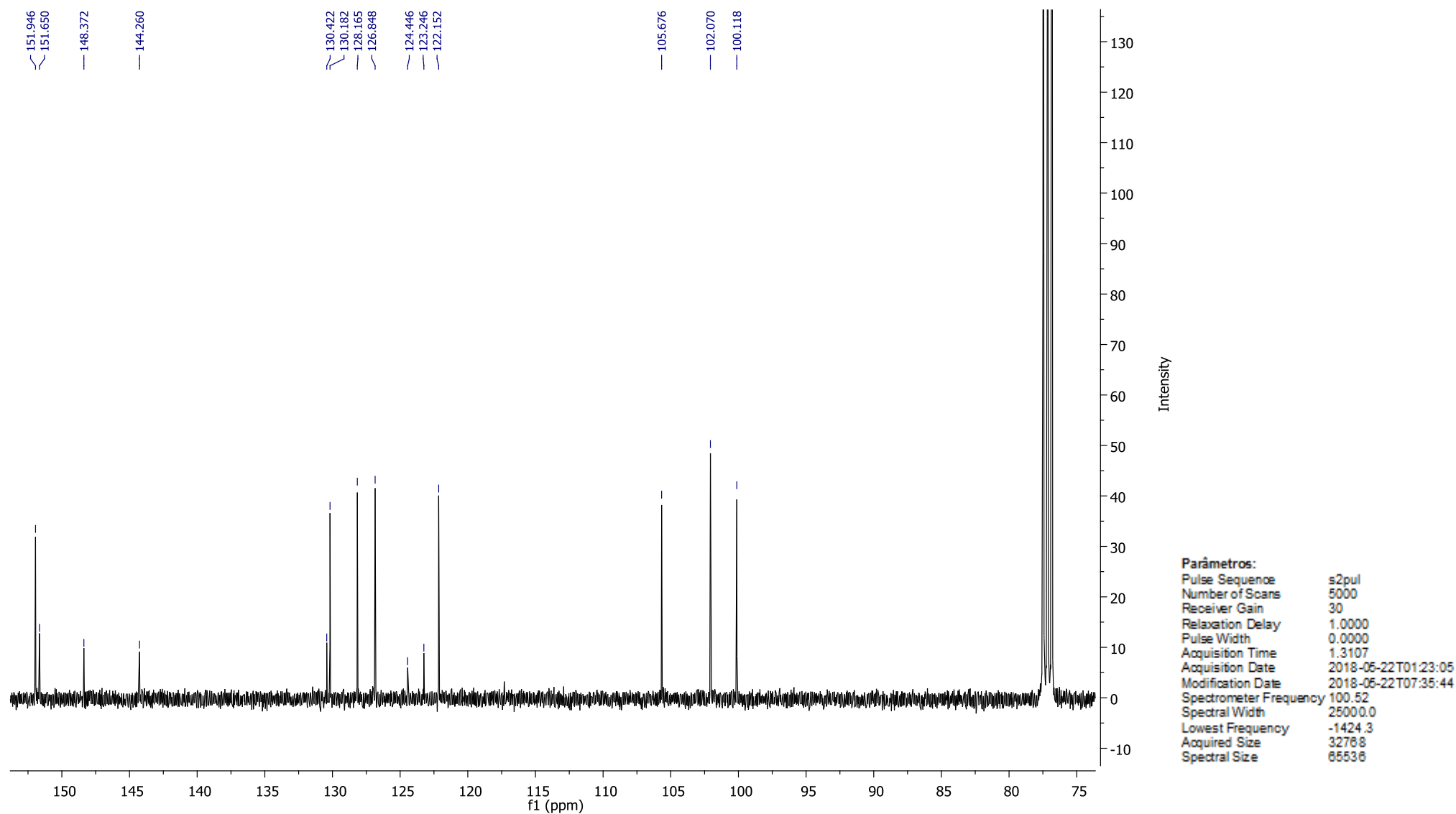
Parâmetros:
 Pulse Sequence s2pul
 Number of Scans 32
 Receiver Gain 52
 Relaxation Delay 1.1661
 Pulse Width 0.0000
 Acquisition Time 3.8339
 Acquisition Date 2018-05-22T01:20:15
 Modification Date 2018-05-22T04:23:02
 Spectrometer Frequency 399.73
 Spectral Width 6410.3
 Lowest Frequency -799.5
 Acquired Size 24578
 Spectral Size 65536



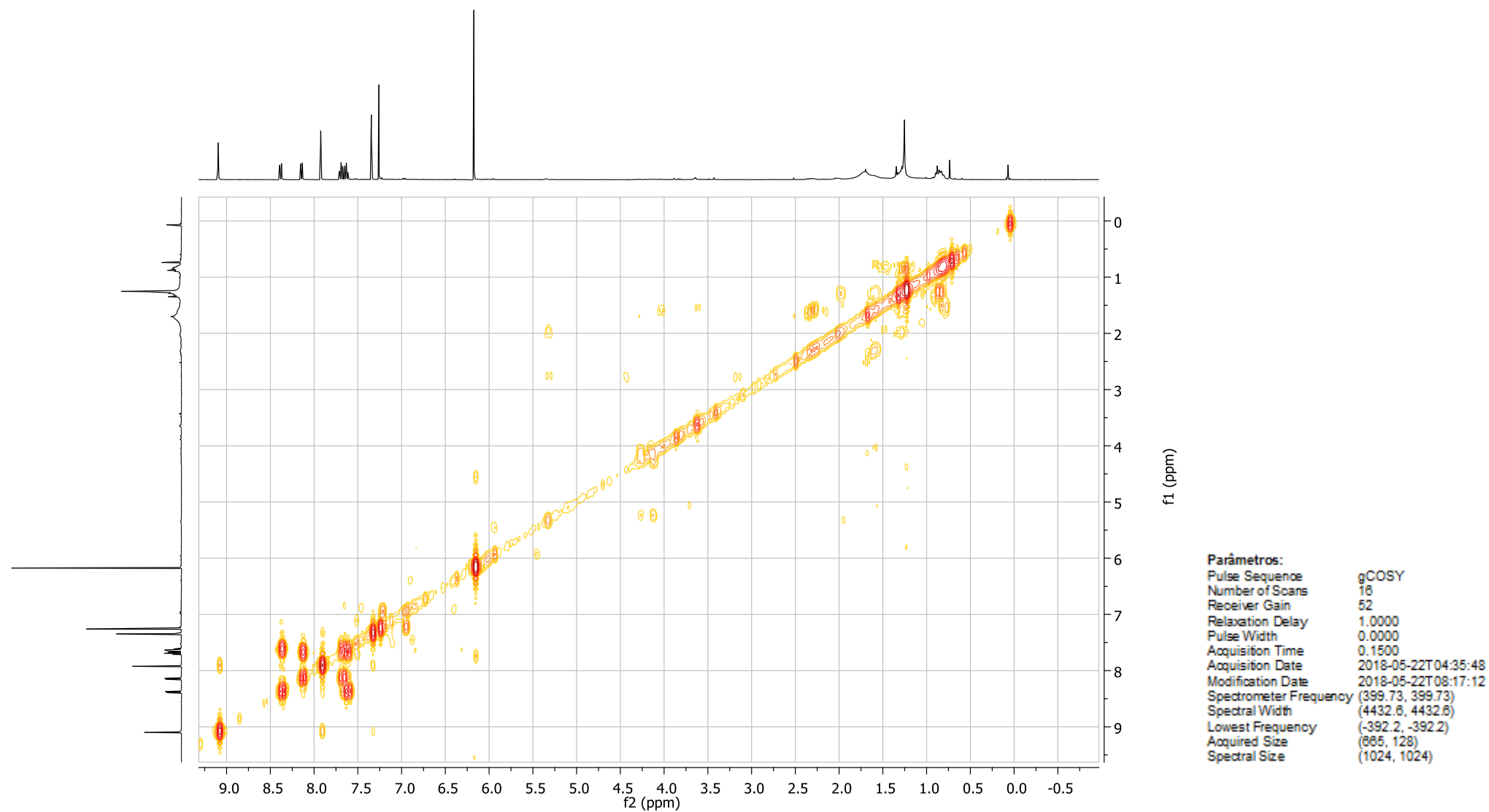
III.26. Espectro de RMN de ^1H do composto **trisfaeridina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C) e suas expansões.

Expansões:

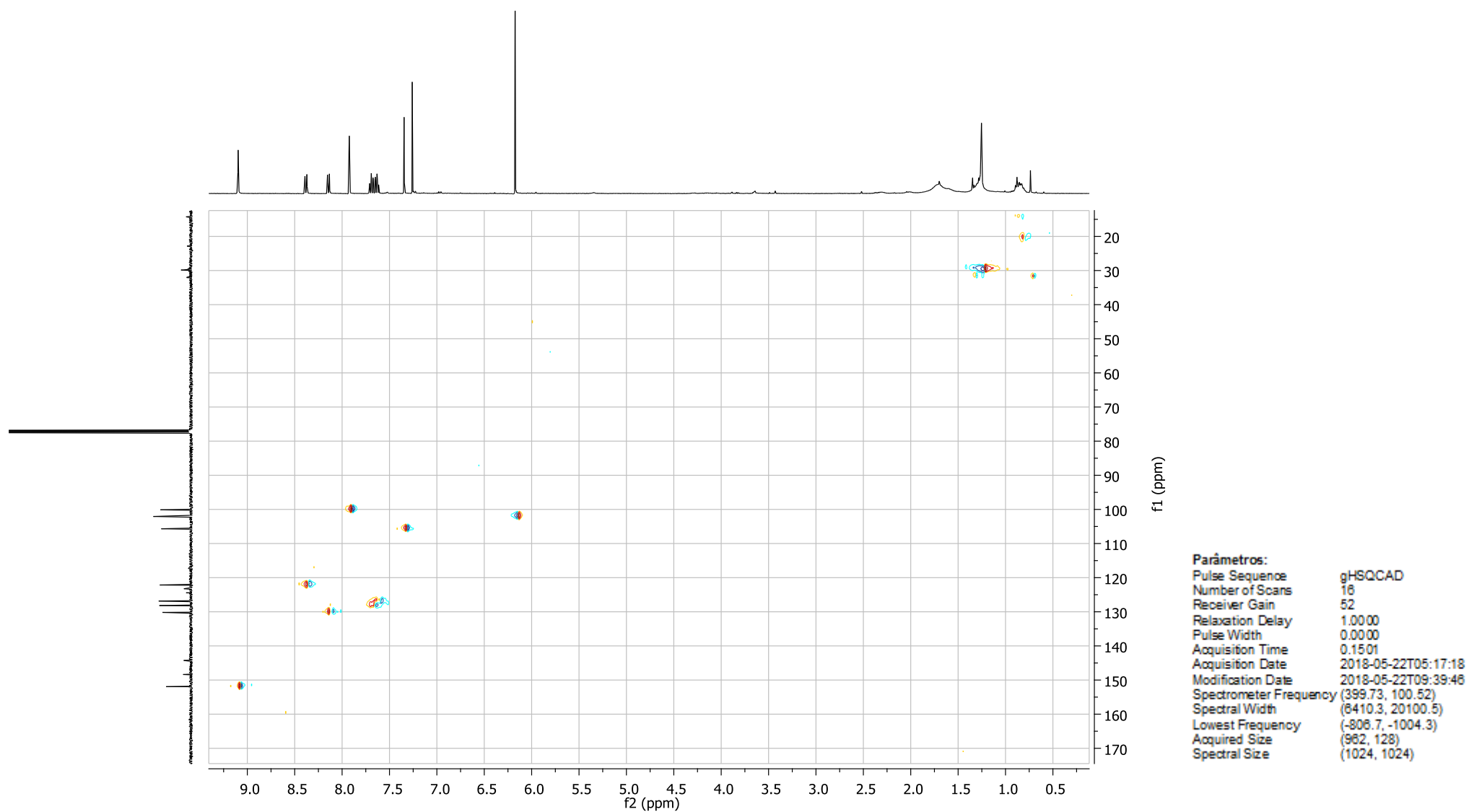




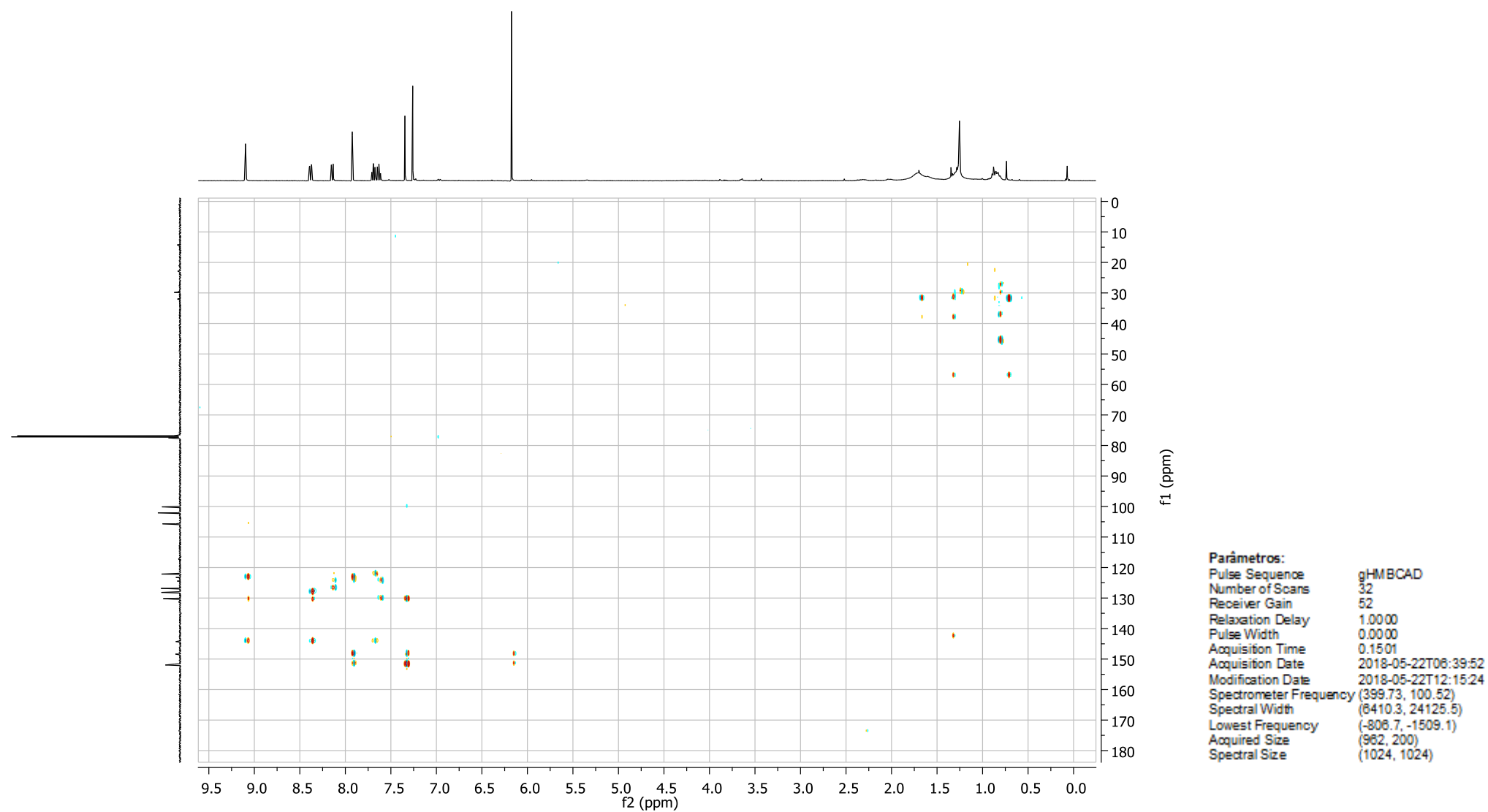
III.27. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **trisfaeridina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



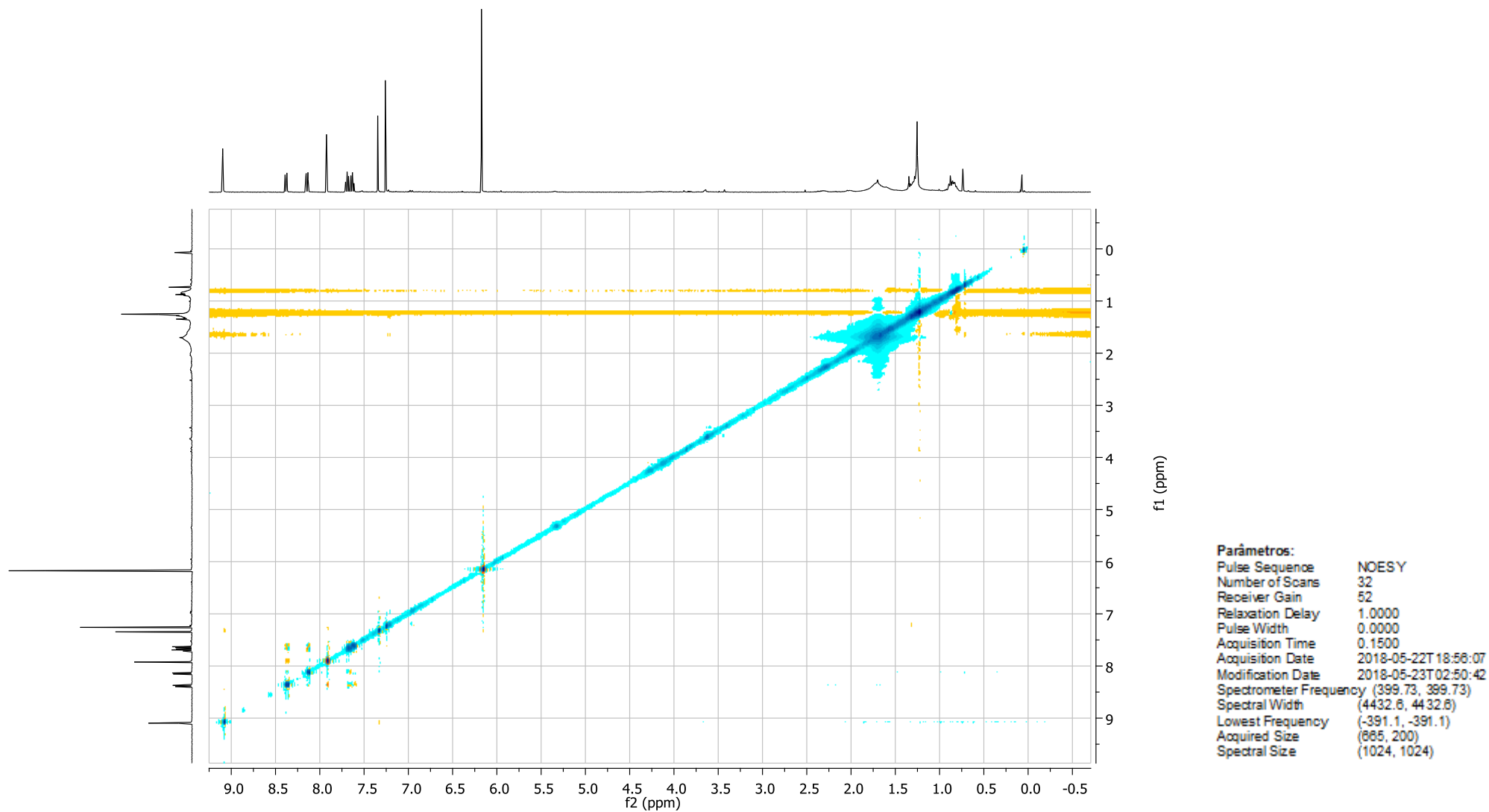
III.28. Espectro de gCOSY do composto **trisfaeridina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).



III.29. Mapa de Contornos gHSQC do composto **trisfaeridina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



III.30. Mapa de Contornos gHMBC do composto **trisfaeridina** (CDCl_3 , 400 MHz, 26°C).



III.31. Espectro de gNOESY do composto **trisfaeridina** (CDCl₃, 400 MHz, 26°C).